

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ARIANNE DE ASSIS ALVES

**DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES BIODEGRADÁVEIS CONSTITUÍDOS
DE COPOLÍMERO DOS ÁCIDOS LÁTICO E GLICÓLICO E LOSARTAN**

**BELO HORIZONTE – MG
FACULDADE DE FARMÁCIA – UFMG**

2013

ARIANNE DE ASSIS ALVES

**DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES BIODEGRADÁVEIS CONSTITUÍDOS
DE COPOLÍMERO DOS ÁCIDOS LÁTICO E GLICÓLICO E LOSARTAN**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior

**BELO HORIZONTE – MG
FACULDADE DE FARMÁCIA - UFMG**

2013

A474d Alves, Arianne de Assis
Desenvolvimento de implantes biodegradáveis constituídos de copolímero dos ácidos lático e glicólico e losartan./ Arianne de Assis Alves. - 2013
101 f. : il.

Orientador: Prof. Armando da Silva Cunha Júnior.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

1. Cirurgia de Filtração. 2. Glaucoma. 3. Losartan. 4. Fibroblastos. 5. Implante PLGA. I. Arianne de Assis Alves. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 617.7

FOLHA DE APROVAÇÃO

ARIANNE DE ASSIS ALVES

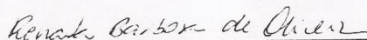
**"Desenvolvimento de implantes biodegradáveis
constituídos de copolímero dos ácidos lático e
glicólico e losartan"**

Dissertação, como requisito parcial para obter o título de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em sete de fevereiro de 2013.

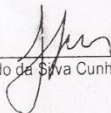
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Ricardo Geraldo de Sousa - UFMG



Profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira - UFMG



Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior - UFMG

*Dedico este trabalho à
minha família, em
especial aos meus
pais e à minha irmã.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por tantas oportunidades boas, por me guiar nessa caminhada e me conceder essa vitória.

Ao professor Armando por abrir as portas para mim e pela grande contribuição na minha formação acadêmica.

À minha mãe e ao meu pai, por serem minha melhor torcida, por tudo que me ensinaram, pelo amor, por acreditarem e confiarem em mim.

À minha família, em especial minha irmã, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando.

À Gabi pela inestimável ajuda, bons conselhos, apoio e amizade.

À Camila pelo exemplo de dedicação, pela amizade e infinitas conversas.

À Marcela e a Leilinha, pelo companheirismo e amizade.

À doutora Silvia Ligório Fialho, por abrir as portas da FUNED e pela grande colaboração no desenvolvimento desse trabalho. Também ao Guilherme, pela realização das análises de TG e DSC.

À Cintia e ao professor Alfredo Miranda Goes, do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas, pela contribuição nos testes *in vitro* com fibroblastos.

Ao professor Hélio Chiarini Garcia, do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela contribuição nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

À Gra e a Lili, pelo companheirismo e pela ajuda com as análises de TG e DSC.

À Paula e ao Zé, pelos momentos de descontração nos lanches da tarde e pela grande amizade.

À Clarice, a Érica e a Karina, por compartilharem o dia-a-dia na pós-graduação, tornando tudo mais descontraído.

À Ana Bárbara e a Carolzinha, pela amizade e pela ajuda nos estudos para prova do mestrado.

À Mariana, pela ajuda nas aulas de docência e pela amizade.

Aos colegas do LTF, em especial à Dani, Ju, Júlia, Lívia, Lorena, Michelle e Ricardo, pelas valiosas sugestões e ajuda no desenvolvimento desse projeto.

Aos colegas dos laboratórios de controle de qualidade, pela disponibilidade em ajudar e pelo companheirismo.

Aos antigos colegas do laboratório de Química Farmacêutica, ao professor Ricardo e à professora Renata, por contribuírem para minha formação acadêmica e pela amizade.

À pós-graduação, em especial ao Eduardo, pela prontidão e boa vontade.

À Capes, ao CNPq e à Fapemig pelo auxílio financeiro.

*"O futuro não é um lugar onde
estamos indo, mas um lugar
que estamos criando. O
caminho para ele não é
encontrado, mas construído, e
o ato de fazê-lo muda tanto o
realizador quanto o destino."*

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

O glaucoma é a segunda causa mundial de perda da visão e o fator de risco mais importante para o seu desenvolvimento é a pressão intraocular elevada. O tratamento do glaucoma na maioria dos pacientes é iniciado com medicamentos, mas vários continuam a perder a visão, sendo necessária a cirurgia filtrante. A cicatrização é um dos principais determinantes do sucesso da cirurgia filtrante no pós-operatório. Existem dois agentes fibróticos, o 5-fluorouracil e a mitomicina C, que são utilizados para minimizar essa complicação. No entanto, estes tratamentos são frequentemente associados a severas complicações. O losartan possui potencial atividade antiangiogênica e inibitória da proliferação de fibroblastos, sendo promissora sua utilização como adjuvante na cirurgia filtrante do glaucoma. A segurança e a eficácia das terapias sistêmicas e tópicas para doenças oculares são limitadas devido à baixa absorção ocular dos fármacos, a falta de especificidade aos tecidos-alvo, os efeitos adversos sistêmicos e baixa adesão ao tratamento. As injeções intravítreas, que poderiam contornar esses problemas, estão associadas a diversos efeitos adversos. Sistemas de liberação de fármacos com perfil de liberação prolongada têm sido desenvolvidos para superar essas limitações. Neste trabalho, implantes biodegradáveis constituídos de PLGA e losartan foram desenvolvidos e caracterizados por calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria, espectroscopia na região do infravermelho e microscopia eletrônica de varredura. Também foi determinado *in vitro* o perfil de liberação dos implantes e sua atividade antiangiogênica e inibitória da proliferação de fibroblastos. Foram obtidos implantes de PLGA e losartan com perfil de liberação prolongado. A atividade inibitória da proliferação de fibroblastos foi confirmada e a atividade antiangiogênica só foi observada no losartan em solução. Dessa forma, esses implantes têm potencial para o tratamento da cicatrização indesejável após cirurgia filtrante para o glaucoma.

Palavras chaves: Cirurgia de filtração, glaucoma, losartan, fibroblastos, implante PLGA.

ABSTRACT

Glaucoma is the second cause of vision loss around the world and it is mainly developed by elevated intraocular pressure. The glaucoma treatment in the majority of patients starts with drugs, but some of them continue losing vision, which becomes necessary the filtering surgery. The success of the surgery is determined by the post operative healing process. There are two fibrotic agents such as 5-fluorouracil and mitomycin C which are used to reduce the scars after the surgery. However, these treatments are often associated with serious complications. Losartan has become a promising drug to be used as an adjunct to glaucoma filtering surgery since it presents a potential antiangiogenic and inhibitory fibroblasts proliferation activity. The safety and efficacy of topical and systemic therapies for ocular diseases are limited due to poor ocular drug absorption, the absence of specificity to target tissues, systemic adverse effects and low treatment adherence by patients. The intravitreal injections could overcome these problems however they are associated with many complications. Systems for drug delivery with a prolonged release profile have been developed to overcome these limitations. In this work, biodegradable implants composed of PLGA and losartan were developed and characterized by differential scanning calorimetry, thermogravimetry, infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. It was also determined their in vitro release profile, their antiangiogenic activity and their inhibitory fibroblasts proliferation activity. The developed implants show prolonged release profile. It was confirmed the inhibitory fibroblast proliferation activity of the implants although the antiangiogenic activity was only observed with losartan in solution. Thus these implants have the potential for the treatment of undesirable scarring after glaucoma filtering surgery.

Keywords: Filtration surgery, glaucoma, losartan, fibroblasts, PLGA implant.

LISTA DE FIGURAS

1 Diagrama esquemático ilustrando o fluxo convencional do humor aquoso a partir do corpo ciliar até a malha trabecular.....	18
2 Esquema da cirurgia filtrante para glaucoma.....	21
3 Bolha formada (apontada pela seta) após cirurgia filtrante de glaucoma.....	22
4 Fibroblastos humanos da cápsula de Tenon cultivados em folhas de silicone polimerizado. Conforme a mobilidade e migração dos fibroblastos são criadas marcas superficiais de forças tracionais.....	24
5 Estrutura do losartan.....	25
6 Representação esquemática da potencial interação entre o peptídeo hormonal angiotensina II e fibroblastos cardíacos. Mecanismo de interação da AII marcado pelo círculo vermelho.....	28
7 Representação esquemática do mecanismo de erosão polimérica.....	30
8 Estrutura química do poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA) e poli(ácido láctico-co-ácido glicólico).....	31
9 Membrana corioalantóica do embrião de galinha. Imagem da MCA de um embrião de 10 dias (a); localização da MCA (em vermelho) ao redor do embrião de 12 dias e em contato direto com a casca do ovo (b); ilustração do corte transversal da MCA no 10°-12° dia de incubação (c).....	46
10 Pele da pálpebra superior de pacientes submetidos à blefaroplastia.....	48
11 Cultura de fibroblastos obtidos a partir da extração primária da pele da pálpebra de pacientes submetidos à cirurgia de blefaroplastia. Aumento de 40X.....	49
12 Esquema da placa utilizada no teste de inibição de fibroblastos pelos implantes contendo losartan. Placa utilizada para testes de proliferação celular e contagem de células.....	50
13 Esquema da placa utilizada no teste de curva padrão de losartan para inibição do crescimento de fibroblastos. Esse esquema foi utilizado para os testes de proliferação celular.....	50
14 Reação de oxi-redução do MTT em células metabolicamente ativas.....	52
15 Espectro na região ultravioleta/vísivel do losartan (50 µg/mL) diluído em PBS.....	54
16 Cromatograma obtido para (a) losartan (50 µg/mL) diluído em PBS.....	55
17 Cromatogramas obtidos para: implante branco (a), fase móvel (b), losartan 50 µg/mL (c) e PLGA 75:25 em PBS (d).....	56

18 Curva de calibração, equação da reta e R ² para o losartan em PBS nas concentrações de 1, 5, 25, 50, 75 e 100 µg/mL.....	57
19 Implante de PLGA contendo o fármaco losartan.....	62
20 Trocater Transcleral (Accurus [®] 25 – Gauge System, Alcon, Inc, EUA) (A) utilizado na padronização da espessura dos implantes e implante de PLGA contendo losartan (B)...	63
21 Micrografias referentes à amostra B0 em aumento de 150 vezes (A) e em aumento de 10.000 vezes (B).....	65
22 Micrografias referentes à amostra B5 em aumento de 300 vezes (A) e em aumento de 10.000 vezes (B). Micrografias referentes à amostra B8 em aumento de 300 vezes (C) e em aumento de 10.000 vezes (D). Poros indicados pelas setas.....	66
23 Micrografias referentes à amostra L0 em aumento de 150 vezes (A) e em aumento de 10.000 vezes (B).....	67
24 Micrografias referentes à amostra L5 em aumento de 300 vezes (A) e em aumento de 10.000 vezes (B). Micrografias referentes à amostra L8 em aumento de 300 vezes (C) e em aumento de 10.000 vezes (D). Poros indicados pelas setas.....	68
25 Micrografia referente à amostra L8 em aumento de 90000 vezes. Poro dentro de poro indicado pela seta.....	69
26 Curva de TG do losartan (a), do PLGA (b), da mistura física (c) e da mistura liofilizada (d) de PLGA e losartan em atmosfera dinâmica de N ₂	70
27 Curva de DSC do losartan puro (a), do PLGA (b), da mistura física contendo 75% de PLGA e 25% de losartan (c), da mistura liofilizada contendo 75% de PLGA e 25% de losartan (d) e da mistura binária de losartan e PLGA (e) em atmosfera dinâmica de N ₂ ...	72
28 Espectro de infravermelho da amostra de losartan.....	75
29 Espectro de infravermelho da amostra de PLGA.....	76
30 Espectro de infravermelho da mistura liofilizada de losartan e PLGA.....	77
31 Espectro de infravermelho da mistura física binária de losartan e PLGA.....	78
32 Porcentagem de liberação acumulada de losartan a partir dos implantes (valores representados como média ± desvio padrão, n = 5).....	80
33 Fotos das MCAs e imagens processadas referentes ao tratamento com PBS (A e B), implante de losartan 25% (C e D), losartan 250 µg/mL (E e F), losartan 500 µg/mL (G e H) e losartan 1000 µg/mL (I e J).....	83
34 Ensaio de angiogênese utilizando a membrana corioalantóica realizado com PBS (controle), losartan (250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL) e implante contendo 25% de losartan. Foram utilizados para cada grupo 8 embriões e os resultados expressos em média ± desvio padrão. * Significativamente diferente do grupo controle.....	84
35 Redução da proliferação de fibroblastos por exposição ao losartan após 24 (linha azul), 48 (linha verde) e 72 (linha vermelha) horas de exposição.....	86

36	Ensaio de inibição de fibroblastos por contagem realizado com células (controle), implantes de PLGA branco e contendo losartan (25%) para 24 horas de exposição.....	88
37	Ensaio de inibição de fibroblastos por contagem realizado com células (controle), implantes de PLGA branco e contendo losartan (25%) para 48 horas de exposição.....	88
38	Ensaio de inibição de fibroblastos por contagem realizado com células (controle), implantes de PLGA branco e contendo losartan (25%) para 72 horas de exposição. * Significativamente diferente do grupo controle.....	89
39	Ensaio de inibição de fibroblastos por proliferação celular realizado com células (controle), implantes de PLGA branco e contendo losartan (25%) para 24 horas de exposição.....	89
40	Ensaio de inibição de fibroblastos por proliferação celular realizado com células (controle), implantes de PLGA branco e contendo losartan (25%) para 48 horas de exposição. * Significativamente diferente do grupo controle.....	90
41	Ensaio de inibição de fibroblastos proliferação celular realizado com células (controle), implantes de PLGA branco e contendo losartan (25%) para 72 horas de exposição. * Significativamente diferente do grupo controle.....	91

LISTA DE TABELAS

1	Propriedades dos polímeros e copolímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico....	32
2	Diluições para construção das curvas analíticas para quantificação do losartan.....	40
3	Diluições para realização do teste de exatidão.....	41
4	Grupos de tratamentos utilizados no ensaio de angiogênese.....	46
5	Condições cromatográficas adotadas.....	54
6	Dados da construção da curva de calibração.....	57
7	Teste ANOVA.....	58
8	Dados dos cálculos dos limites de quantificação e detecção.....	58
9	Análise estatística intracorrida (Repetibilidade).....	59
10	Análise estatística intercorridas (Intermediária).....	60
11	Porcentagem de recuperação do losartan para a avaliação da exatidão do método... 	61
12	Dados de estabilidade da amostra de losartan.....	62
13	Peso médio com desvio padrão dos implantes de PLGA e losartan (25%).....	63
14	Teor médio com desvio padrão dos implantes de losartan e PLGA.....	64
15	Eventos térmicos das análises termogravimétricas de losartan, PLGA, mistura física e mistura liofilizada (PLGA + losartan).....	71
16	Eventos térmicos das análises de DSC para losartan, PLGA, mistura física e mistura liofilizada (PLGA 75% + losartan 25%) e mistura binária de losartan e PLGA.....	74
17	Bandas de absorção referentes à amostra de losartan.....	75
18	Bandas de absorção referentes à amostra de PLGA.....	76
19	Bandas de absorção referentes à mistura de losartan e PLGA liofilizada.....	77
20	Bandas de absorção referentes à mistura física binária de losartan e PLGA.....	78
21	Concentração média encontrada nos implantes utilizados nos testes de inibição de fibroblastos.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

All	Angiotensina II
AT1	Receptores da angiotensina tipo 1
CGRs	Células ganglionares da retina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMD	Concentração média determinada
CV	Coefficiente de variação
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Do inglês - <i>Differential scanning calorimetry</i>
FDA	Do inglês – <i>Food and Drug Administration</i>
LD	Limites de detecção
LQ	Limite de quantificação
MCA	Membrana corioalantóica
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PBS	Tampão fosfato salino
PIO	Pressão intraocular
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
rpm	Rotações por minuto
SRA	Sistema renina-angiotensina
TG	Termogravimetria
TGF- β	Do inglês - <i>Transforming growth factor beta</i>
UV	Ultravioleta
VEGF	Do inglês – <i>Vascular endothelial growth factor</i>

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Glaucoma.....	17
2.2 Esquemas de tratamento do Glaucoma.....	19
2.3 Cirurgia filtrante.....	20
2.4 Fibroblastos.....	23
2.5 Losartan.....	24
2.6 Mecanismo de ação do losartan e o sistema renina-angiotensina.....	26
2.7 Sistemas poliméricos de liberação controlada de fármacos.....	28
2.8 Aplicações do PLGA na oftalmologia.....	33
3 JUSTIFICATIVA.....	35
4 OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
5 PARTE EXPERIMENTAL.....	37
5.1 Materiais.....	37
5.2 Métodos.....	38
5.2.1 <u>Desenvolvimento e validação do método analítico</u>	38
5.2.1.1 <u>Desenvolvimento do método analítico</u>	38
5.2.1.2 <u>Validação do método analítico</u>	39
5.2.2 <u>Desenvolvimento dos implantes contendo losartan</u>	42
5.2.3 <u>Determinação do peso médio dos implantes</u>	42
5.2.4 <u>Determinação do teor de losartan nos implantes</u>	43
5.2.5 <u>Análise morfológica dos implantes por microscopia eletrônica de varredura</u>	43
5.2.6 <u>Termogravimetria</u>	44
5.2.7 <u>Calorimetria exploratória diferencial</u>	44
5.2.8 <u>Espectroscopia na região do infravermelho</u>	45

5.2.9 <u>Estudo de liberação <i>in vitro</i></u>	45
5.2.10 <u>Ensaio de angiogênese na membrana corioalantóica de embrião de galinha</u>	45
5.2.11 <u>Avaliação <i>in vitro</i> da atividade do losartan em fibroblastos</u>	47
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
6.1 Desenvolvimento e validação do método analítico.....	53
6.2.1 <u>Desenvolvimento do método analítico</u>	53
6.1.2 <u>Validação do método analítico</u>	55
6.2 Desenvolvimento dos implantes contendo losartan.....	62
6.3 Determinação do peso médio dos implantes.....	63
6.4 Determinação do teor de losartan nos implantes.....	64
6.5 Microscopia eletrônica de varredura	64
6.6 Termogravimetria.....	69
6.7 Calorimetria exploratória diferencial	71
6.8 Espectroscopia na região do infravermelho.....	74
6.9 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	79
6.10 Ensaio de angiogênese na membrana corioalantóica de embrião de galinha.....	82
6.11 <u>Avaliação <i>in vitro</i> da atividade do losartan em fibroblastos</u>	85
6.11.1 <u>Curva dose-resposta de losartan</u>	85
6.11.2 <u>Avaliação da inibição de fibroblastos pelos implantes contendo losartan</u>	87
7 CONCLUSÕES.....	93
RERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

O glaucoma é uma neuropatia óptica relacionada à idade, caracterizada pela perda de células ganglionares da retina (CGRs) e danos no nervo óptico que resultam na perda progressiva do campo visual (JOHNSON et al., 2011; SCHULTZ et al., 2009). A causa direta do glaucoma é desconhecida, mas vários fatores de risco importantes, incluindo a pressão intraocular (PIO) elevada, foram identificados (FU et al., 2009). Uma vez que um número de células nervosas é destruído, a perda de campo visual se desenvolve, o que pode envolver a visão central (SCHULTZ et al., 2009).

Devido ao envelhecimento da população e os resultados terapêuticos abaixo do ideal, essa doença aparece como a segunda causa de perda de visão irreversível no mundo, sendo que a principal causa é a degeneração macular relacionada à idade (JOHNSON et al., 2011; LAVIK et al., 2011; WEISMANN et al., 2011). Dados da Organização Mundial da Saúde indicam que 65 milhões de pessoas já foram diagnosticadas com glaucoma em todo o mundo, sendo que dessas 900 mil são brasileiras (BRASIL, 2012).

O tratamento do glaucoma pode ser cirúrgico ou medicamentoso, sendo que ambos agem reduzindo a PIO, o fator de risco mais importante para doença. Ele pode ser controlado com o uso de colírios antiglaucomatosos, entretanto a falta de adesão ao tratamento medicamentoso pode culminar com a perda da visão. A maioria dos pacientes inicia o tratamento com medicamentos, mas vários continuam a perder a visão, sendo necessária a cirurgia filtrante (CASTRO e MESQUITA, 2009; JOHNSON et al., 2011; LEE e HIGGINBOTHAM, 2005; QUIGLEY, 2011).

A cicatrização é um dos principais determinantes do sucesso da cirurgia filtrante no pós-operatório. Nos últimos vinte anos dois agentes antifibróticos, o 5-fluorouracil e a mitomicina C, mudaram o prognóstico da cirurgia filtrante, particularmente em doentes com múltiplos fatores de risco para o fracasso da

cirurgia. No entanto, estes tratamentos são frequentemente associados a severas complicações (LABBÉ et al., 2007).

Foram observadas evidências que sugerem a participação da angiotensina II (All) na resposta fibrótica. O sistema renina-angiotensina regula várias funções fisiológicas através dos receptores de angiotensina tipo 1 e tipo 2. Os receptores de All são encontrados em vários tecidos, sendo que foram encontrados receptores da angiotensina tipo 1 (AT1) nos tecidos do olho. O losartan é um antagonista dos receptores AT1, que bloqueia os efeitos da All. (ABADIR et al, 2001; MOEN e WAGSTAFF, 2005; MARSHALL et al., 2000; SJOLIE et al., 2011; ZHANG et al., 2003).

A segurança e a eficácia das terapias sistêmicas e tópicas para o tratamento de doenças oculares são limitadas devido à baixa absorção ocular de medicamentos, à falta de especificidade nos tecidos-alvo, aos efeitos adversos sistêmicos e a baixa adesão do paciente ao tratamento. Injeções intravítreas podem melhorar a liberação ocular de medicamentos, mas a necessidade de frequentes aplicações e possíveis efeitos adversos relacionados com a injeção limitam a utilização desse procedimento. Sistemas de liberação de fármacos com perfil de liberação prolongada têm sido desenvolvidos para superar essas limitações. Esses sistemas podem atingir concentrações terapêuticas prolongadas do fármaco nos tecidos oculares alvo, limitando a exposição sistêmica e as reações adversas, levando a uma melhoria na adesão do paciente ao tratamento (LEE et al., 2010).

Diante dessas observações, este trabalho objetivou o desenvolvimento e a caracterização de implantes biodegradáveis contendo losartan, visando à manutenção prolongada de níveis terapêuticos adequados desse fármaco na região ocular onde ocorre a cicatrização da cirurgia filtrante, assim como a avaliação desses sistemas quanto à atividade antiangiogênica e inibitória da proliferação de fibroblastos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

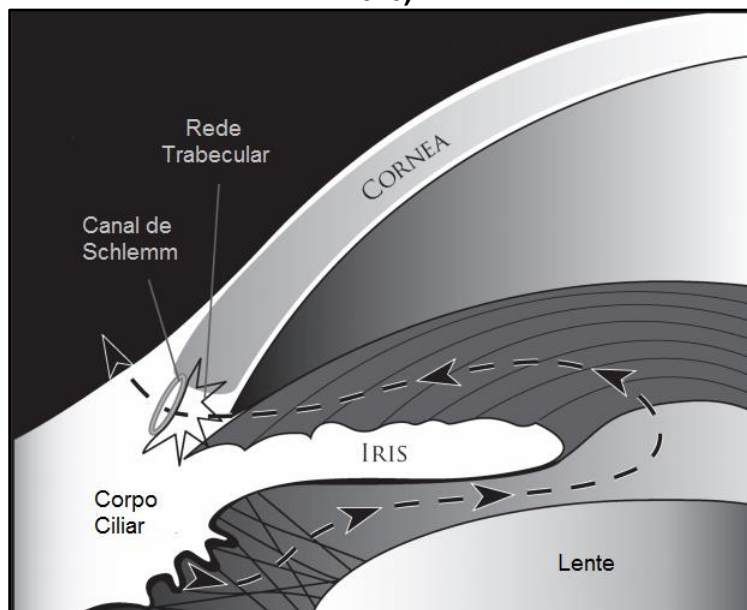
2.1 Glaucoma

Existem vários tipos diferentes de glaucoma, que são classificados em glaucoma de ângulo aberto e glaucoma de ângulo fechado. O glaucoma de ângulo fechado ocorre porque o humor aquoso não pode fluir através da pupila para a câmara anterior (bloqueio pupilar), o que aumenta a pressão atrás da íris, forçando-a anteriormente e ocluindo o ângulo da câmara anterior. Ele também pode resultar da dilatação da pupila e do estreitamento do ângulo da câmara anterior, que ocorre devido ao crescimento natural das lentes. O glaucoma de ângulo aberto é o tipo mais comum de glaucoma. Normalmente, a doença é assintomática nas fases iniciais e sua progressão é lenta. (LEE e HIGGINBOTHAM, 2005).

A PIO elevada é um fator de risco significativo para o glaucoma de ângulo aberto, embora alguns casos de glaucoma se desenvolvam na ausência de PIO elevada. No entanto, existem evidências de que redução da PIO reduz a progressão do glaucoma em aproximadamente 90% dos casos, incluindo os casos de glaucoma de pressão normal (LAVIK et al., 2011).

A secreção do humor aquoso e a regulação da sua saída são processos fisiológicos importantes para a manutenção da pressão intraocular na faixa normal. As duas estruturas principais relacionadas com a dinâmica do humor aquoso são o corpo ciliar e malha trabecular (os principais locais de fluxo do humor aquoso). O humor aquoso é produzido pelo corpo ciliar e flui (linha tracejada com pontas de seta) a partir da câmara posterior através da pupila para a câmara anterior (**Figura 1**). A partir daí, ele segue através da rede trabecular para dentro do canal de Schlemm e posteriormente é absorvido nas veias episclerais, através dos canais colectores (GOEL et al., 2010).

Figura 1 - Diagrama esquemático ilustrando o fluxo convencional do humor aquoso a partir do corpo ciliar até a malha trabecular (Fonte: Adaptado de GOEL et al., p. 53, 2010).



Uma vez que nem todos os pacientes com PIO aumentada sofrem de danos neuronais e nem todos os pacientes com neuropatia óptica glaucomatosa tem um aumento da PIO, o termo glaucoma refere-se a uma síndrome de perda de células ganglionares da retina e escavação da cabeça do nervo óptico com correspondente deficiência na função visual. Alterações morfológicas do nervo óptico no glaucoma têm sido descritas (SHAARAWY e FLAMMER, 2004).

Pacientes com glaucoma geralmente não têm quaisquer sintomas oculares ou sistêmicos. Nos últimos estágios da doença, quando o nervo óptico já apresenta danos avançados e há perda visual extensa, o paciente pode experimentar a gradual e progressiva piora da visão, geralmente maior em um olho do que no outro. O paciente também pode perceber uma dificuldade crescente com visão noturna. Nesses casos avançados, a perda visual do paciente é geralmente periférica, avançando progressivamente para perda da visão central. Ocasionalmente, um paciente com glaucoma pode ter um início súbito de visão reduzida ou desfocada, ter dor nos olhos e vermelhidão, ver halos ao redor das luzes, ter dores de cabeça e às vezes náuseas e vômitos relacionados a um aumento agudo da PIO (geralmente 30 mm Hg, podendo estender-se até mais de 80 mm Hg). Essa situação pode indicar um glaucoma

agudo de ângulo fechado ou um tipo inflamatório de glaucoma (LEE e HIGGINBOTHAM, 2005).

2.2 Esquemas de tratamento do Glaucoma

As opções de tratamento para pacientes com glaucoma incluem medicamentos, cirurgia a laser e cirurgia incisional (LEE e HIGGINBOTHAM, 2005). Esses tratamentos, farmacológico e cirúrgico, agem reduzindo a PIO, que é o fator de risco mais importante para o aparecimento e progressão da doença. No entanto, alguns pacientes com glaucoma continuam a perder a visão rapidamente devido à pressão intraocular incontrolável ou mesmo apesar do razoável controle terapêutico da PIO (JOHNSON et al., 2011). Como as células nervosas são irreversivelmente danificadas, a perda visual não pode ser recuperada. Assim, o objetivo do tratamento médico e cirúrgico não é apenas interromper a progressão da doença, mas também controlar eficazmente os fatores de risco para prevenir a perda da visão (SCHULTZ et al., 2009). Dessa forma, novos tratamentos adjuvantes do glaucoma, capazes de interromper a morte de CGRs e sua perda funcional, são necessários com urgência (JOHNSON et al., 2011).

Na prática clínica, a maioria dos pacientes começa o tratamento com colírios, sendo que os mais comuns são os análogos de prostaglandinas ou os β -bloqueadores (QUIGLEY, 2011). Nas últimas décadas, ocorreram vários avanços no tratamento médico do glaucoma. O primeiro ocorreu no final dos anos 1970, com a introdução de timolol e a mudança dos agentes colinérgicos (por exemplo, pilocarpina e carbachol) e agonistas adrenérgicos (por exemplo, epinefrina e dipivefrina) para os bloqueadores beta-adrenérgicos como terapia de primeira linha. No início de 1990, o timolol tornou-se referência para os dados comparativos de fase III em testes clínicos de investigação de medicamentos antiglaucomatosos. Entretanto, não foi demonstrado nos estudos que a redução da PIO por essas substâncias era suficiente para deter a progressão da doença ou para reverter uma situação de alto risco para a

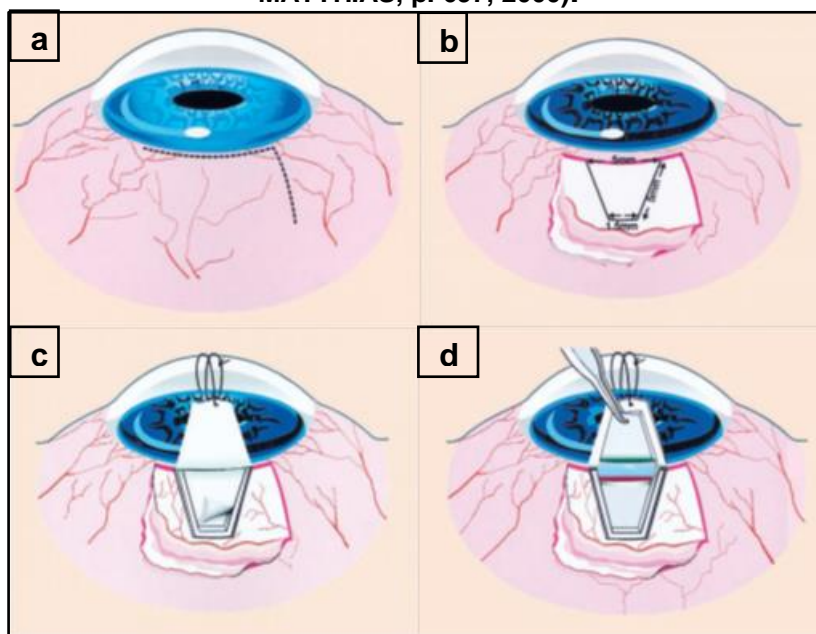
doença se manifestar. Em meados dos anos 1990 foi iniciada uma segunda fase de desenvolvimento de medicamentos tópicos para o tratamento de glaucoma, com a introdução de derivados da prostaglandina, alfa-adrenérgicos, e inibidores de anidrase carbônica (OBSTBAUM et al., 2004).

Embora esses tratamentos reduzam a perda gradual da visão ao longo do tempo de vida de muitos pacientes, aqueles com rápidas taxas de deterioração das células necessitam de tratamentos auxiliares para preservarem a visão. A adesão ao tratamento é fundamental, semelhante ao tratamento de outras doenças crônicas assintomáticas, como a hipertensão. Pesquisas relacionadas à adesão ao tratamento indicaram que apenas 60-70% de todas as doses de colírios são aplicadas por pacientes com glaucoma. Dessa forma, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada contendo fármacos para terapia dessa doença são de extrema importância (QUIGLEY, 2011).

2.3 Cirurgia filtrante

A cirurgia filtrante para o glaucoma pode ser definida como uma tentativa de reduzir a PIO pela formação cirúrgica de uma via de drenagem artificial do humor aquoso a partir da câmara anterior para o espaço subconjuntival. Diferentes tipos de cirurgia filtrante têm sido desenvolvidos desde as primeiras tentativas há quase 180 anos atrás (YU et al., 2009). Atualmente, a forma mais comum desse procedimento envolve a realização de uma incisão na conjuntiva (**Figura 2a**), dissecando o espaço subconjuntival aberto (**Figura 2b**) e fazendo uma incisão na esclera até à junção entre a córnea e a esclera (**Figuras 2c e 2d**) (KHAW et al, 1994).

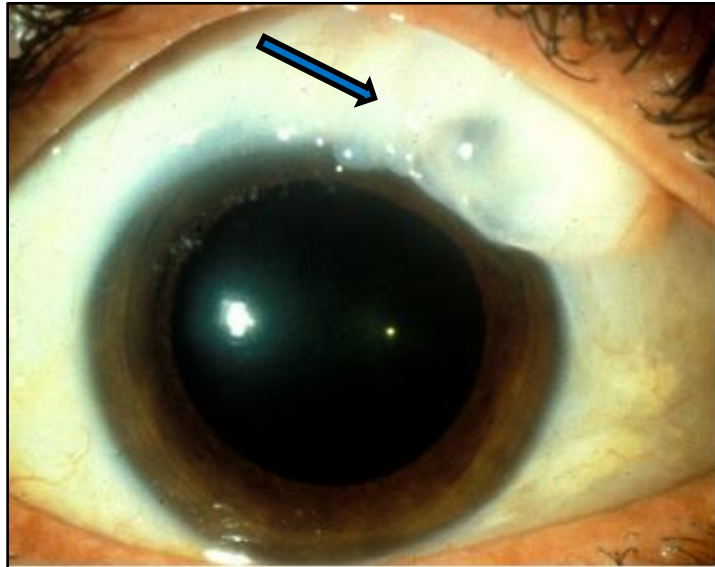
Figura 2 - Esquema da cirurgia filtrante para glaucoma (Fonte: Adaptação de DAHAN e MATTHIAS, p. 697, 2000).



O objetivo principal dessa cirurgia é a preservação da visão e a estabilização das alterações no campo visual. Destaca-se que na maioria das vezes ela é realizada apenas quando o tratamento medicamentoso ou a terapia com laser não é suficiente para controlar a PIO. No entanto, evidências recentes sugerem que a medicação tópica a longo prazo pode ter um efeito prejudicial sobre os tecidos oculares superficiais e sua capacidade futura para formar uma bolha funcional para drenagem, aumentando a chance de falha cirúrgica. (ALLAN et al., 1992; DAHAN e MATTHIAS, 2000).

A bolha formada pelo acúmulo de humor aquoso sob a conjuntiva e/ou a cápsula de Tenon, considerada como a base do controle da PIO na cirurgia filtrante de glaucoma, é constituída por um tecido instável e comprometido (**Figura 3**). Complicações relacionadas com a bolha podem ser graves e o cirurgião tem pouco controle sobre a aparência final da bolha de filtração após a cirurgia. Tais complicações requerem muito cuidado para evitar complicações que levam à perda da visão (DAHAN e MATTHIAS, 2000).

Figura 3 - Bolha formada (apontada pela seta) após cirurgia filtrante de glaucoma
(Fonte: ROCKWOOD et al., p. 213, 2008).



Os mecanismos pelos quais ocorre a drenagem do humor aquoso da bolha após cirurgia de filtração de glaucoma não foram completamente elucidados. Existe um conhecimento muito limitado das vias e mecanismos de drenagem do humor aquoso a partir da bolha. Mecanismos propostos para explicar a redução da PIO após cirurgia de filtração incluem a filtração transconjuntival, a reabsorção através das paredes das veias degeneradas e o movimento do humor aquoso para os vasos linfáticos superficiais da conjuntiva (DAHAN e MATTHIAS, 2000).

A cirurgia convencional tem duas áreas essenciais de controle deficiente a partir das quais provém a maior parte das complicações associadas: a variabilidade do tamanho da fístula - com escoamento excessivo ou insuficiente em alguns casos - e trauma dos tecidos adjacentes (estímulo inflamatório, cicatrização de feridas e fechamento da fístula) (ALLAN et al., 1992).

O sucesso na redução da PIO após cirurgia filtrante depende muito da natureza da resposta de cicatrização após a cirurgia. O processo e a resposta de cicatrização podem ser modulados em vários pontos. Entretanto, a maioria dos esforços para suprimir cicatrizes tem-se concentrado na célula de fibroblasto, que é a célula central do processo de cicatrização (KHAW et al, 1994).

Medicamentos adjuvantes, tópicos ou injetáveis, com atividade antifibrótica (mitomicina e fluorouracil) são frequentemente utilizados para restringir a cicatrização aumentada, evitando o fechamento do canal de escoamento (QUIGLEY, 2011). No entanto, estes agentes estão associados com complicações graves. A fim de maximizar seus benefícios e minimizar a taxa de complicações, o uso desses tratamentos deve ser cuidadosamente avaliado em relação aos fatores de risco do paciente para cicatrização (LABBÉ et al., 2007).

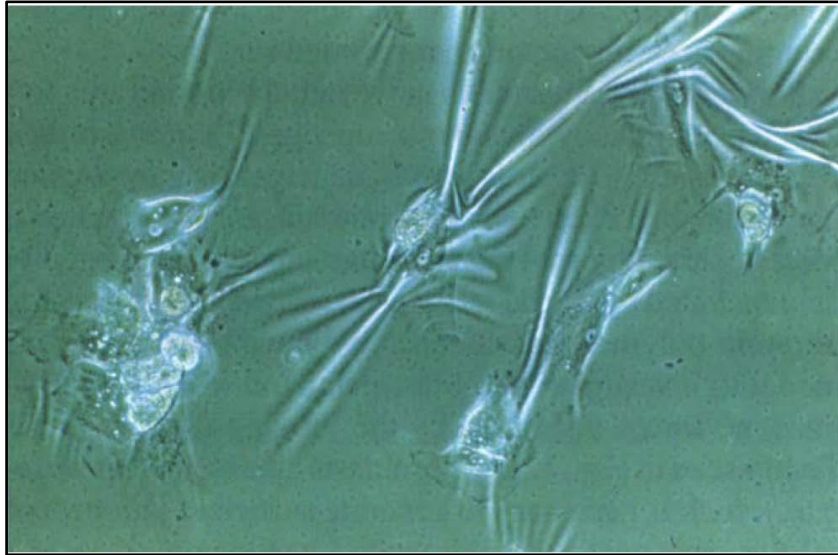
2.4 Fibroblastos (KHAW et al, 1994)

O fibroblasto tem papel central na reparação de feridas e cicatrizes de processos que ocorrem no segmento anterior do olho. A cirurgia filtrante de glaucoma é o melhor exemplo da importância do processo de cicatrização de feridas. Esse processo é o principal determinante do sucesso desse procedimento.

O local onde ocorre a cirurgia filtrante de glaucoma tem um ponto fundamental: é banhado pelo humor aquoso que emerge do olho através da fístula recentemente criada. O humor aquoso tem efeitos estimuladores sobre os fibroblastos *in vitro* e *in vivo*. Um exemplo é a agressiva cicatriz observada em pacientes após cirurgia de filtração, com formação de novos vasos no interior do olho. Nessa situação, o humor aquoso, que contém fatores estimulantes, induz a rápida cicatrização e posterior insucesso cirúrgico.

Células polimorfonucleares movem-se na área da ferida, seguidas por linfócitos e macrófagos. Em seguida, fibroblastos começam a migrar em direção às áreas de dano. Como eles migram, provavelmente causam contração da ferida. As forças geradas pelos fibroblastos em movimento são claramente vistas na **Figura 4**.

Figura 4 - Fibroblastos humanos da cápsula de Tenon cultivados em folhas de silicone polimerizado. Conforme a mobilidade e migração dos fibroblastos são criadas marcas superficiais de forças tracionais (Fonte: KHAW et al., p. 190, 1994).



Os fibroblastos secretam fibronectina, glicosaminoglicanos e tropocolágeno que são enzimaticamente reticulados para formar colágeno. O colágeno é o componente principal da matriz de feridas e é um fator importante na falha em cirurgias filtrantes experimentais em coelho e macaco.

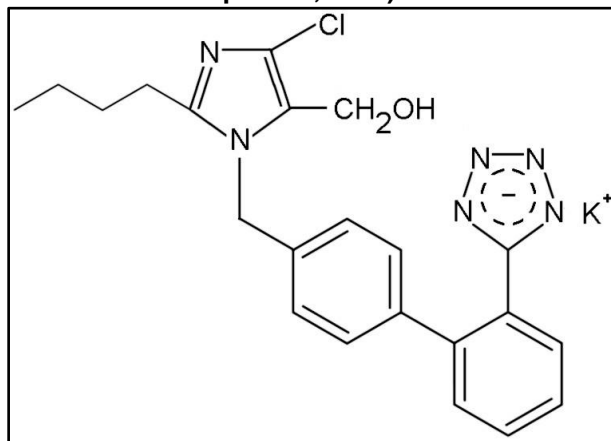
A falha da cirurgia filtrante está associada com uma densa cicatriz no espaço subconjuntival que fecha esse espaço e impede o fluxo aquoso. Essa obstrução por cicatriz no nível episcleral no lugar da fístula é a principal razão para o fracasso da cirurgia.

2.5 Losartan

O losartan potássico, de nome químico 2-butil-4-cloro-1-[p-(o-1H-tetrazol-5-il-fenil)-benzil] imidazol-5-metanol sal monopotássico (**Figura 5**) e fórmula molecular $C_{22}H_{22}ClKN_6O$, tem solubilidade aquosa de 3,3 mg/mL em pH 7,8, massa molecular de 461 e valor de $pK_a = 4,9$. O losartan é enquadrado na classe 3 do sistema de classificação biofarmacêutica, devido a sua elevada

solubilidade e baixa permeabilidade (MARTINDALE, 1999; BONFILIO et al., 2010).

Figura 5 - Estrutura do losartan (Fonte: The United States Pharmacopeia, USP 29-NF24, p. 1280, 2007).



O losartan potássico (registro CAS-124750-99-8), apresenta-se como um pó branco ou quase branco, cristalino e higroscópico, sendo muito solúvel em água e álcool metílico, solúvel em álcool isopropílico e ligeiramente solúvel em acetonitrila (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2011).

O losartan foi aprovado em muitos países para o tratamento da hipertensão e da nefropatia em pacientes com diabetes do tipo 2. É indicado também para redução do risco de acidente vascular cerebral em pacientes com hipertensão e hipertrofia ventricular esquerda. Esse fármaco é um antagonista reversível do receptor AT1, seletivo e competitivo, que bloqueia os efeitos da AII. Receptores AT1 são encontrados em muitos tecidos, incluindo o músculo liso vascular, glândulas supra-renais, os rins e no coração. A angiotensina II também estimula o crescimento do músculo liso (MOEN e WAGSTAFF, 2005).

A angiotensina II é responsável por todas as ações conhecidas do sistema renina-angiotensina (SRA). As ações primárias de AII são vasoconstrição e retenção de sódio e água (SIMPSON e MCCLELLAN, 2000).

2.6 Mecanismo de ação do losartan e o sistema renina-angiotensina

O losartan é convertido em um metabolito ativo, E3174, o qual é de 15 a 20 vezes mais potente no bloqueio do AT1. Depois de ser administrado oralmente, o losartan é rapidamente absorvido, atingindo a concentração de pico plasmático dentro de uma hora, enquanto a concentração de pico plasmático do metabolito ativo E3174 ocorre cerca de 4 horas após a administração. O fármaco sofre metabolismo de primeira passagem significativo, com cerca de 14% da dose convertida em E3174 (SIMPSON e MCCLELLAN, 2000).

O transporte através dos tecidos oculares é dependente da estrutura química do fármaco. Moléculas hidrofóbicas têm tendência a acumular-se mais no vítreo, enquanto as moléculas hidrofílicas, como o losartan, tendem a mostrar maiores concentrações no humor aquoso (LAVIK et al., 2011)

Foi demonstrada a presença de um SRA em tecidos oculares e que a angiotensina II aumenta a exsudação de vasos da retina, assim como estimula a formação de novos vasos sanguíneos na retina pela modulação positiva da atividade do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e outros fatores de crescimento. Estudos em modelos animais sugerem que o bloqueio SRA pode estar associado a efeitos protetores sobre a retina. Alguns estudos clínicos de curto prazo também demonstraram efeito benéfico do bloqueio SRA sobre a permeabilidade da retina (SJOLIE et al., 2011).

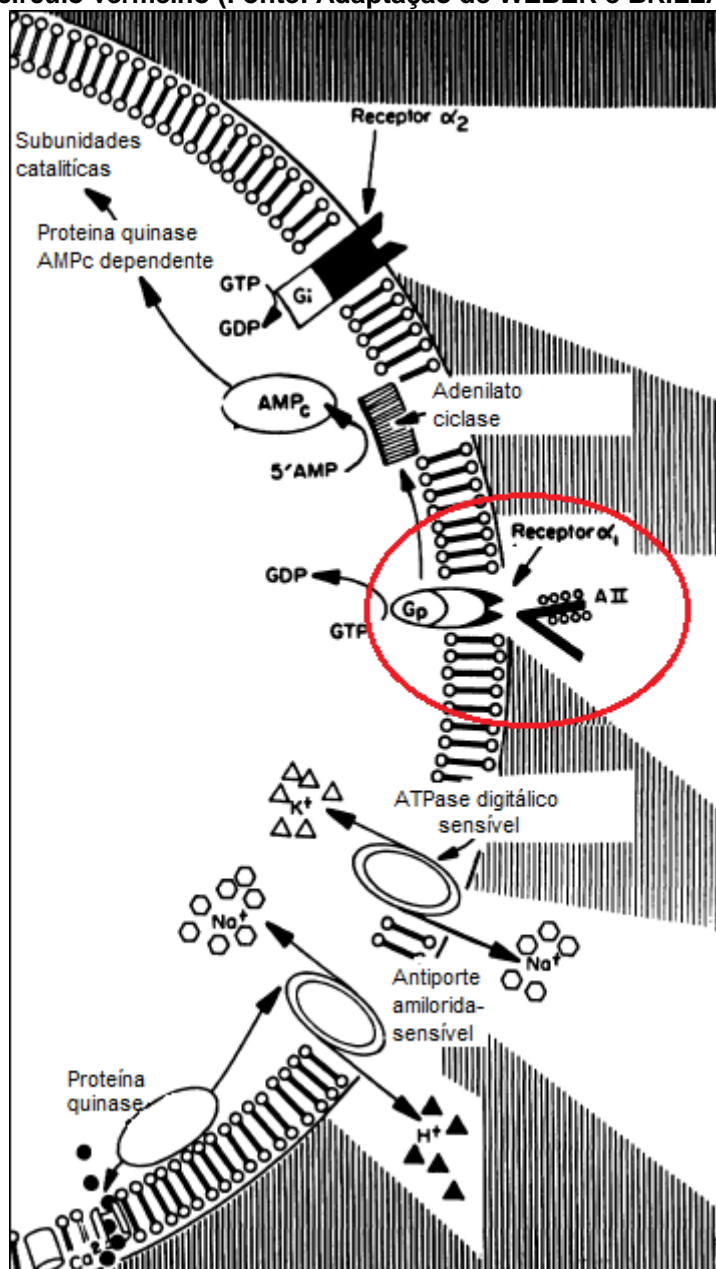
Lonchamp et al. (2001) mostraram um efeito protetor do losartan na neovascularização induzida por ciclos de hiperóxia e normóxia em camundongos recém-nascidos. Os resultados sugerem um papel para o sistema renina-angiotensina neste modelo. As retinas desses animais foram tratadas com um antagonista do receptor AT1 (losartan 10 mg/kg administrado por via subcutânea durante 5 dias) e mostraram uma redução da proliferação de células endoteliais em comparação com animais controle hipóxicos tratados apenas com água (LONCHAMPT et al., 2001).

Outro estudo que corrobora com a atividade ocular do losartan foi o realizado por Zhang e colaboradores (2007). Eles observaram que a expressão da molécula de adesão celular vascular-1 induzida por All é inibida pelo losartan em culturas de células endoteliais retinianas humanas. Isso demonstra que o antagonismo da All pode inibir respostas inflamatórias em células da retina.

Também existem evidências que sugerem um papel importante da All na resposta fibrótica quando ocorre lesão de um tecido. Essas evidências incluem a capacidade de antagonistas dos receptores da All e da enzima conversora de angiotensina em atenuar a fibrose cardíaca e renal em vários modelos animais. Tais efeitos são observados na ausência de alterações na circulação de componentes do SRA levando a acreditar que isso resulta de uma inibição local do SRA nos tecidos, com base na qual a produção de All é independente da circulação de precursores (MARSHALL et al., 2000).

Foram relatadas propriedades mitogênicas da All em culturas de células 3T3 de camundongos Swiss de uma linhagem celular de fibroblastos de murinos não-tumorigênicos. Respostas a longo prazo exigem horas ou dias, isso inclui a divisão celular da cultura de células 3T3. Na **Figura 6** está representada a interação da angiotensina II com um receptor da superfície celular dos fibroblastos. Uma série de eventos celulares sucessivos, representados nessa figura, sugerem os mecanismos responsáveis por respostas de curta e longa duração (WEBER e BRILLA, 1991).

Figura 6 - Representação esquemática da potencial interação entre o peptídeo hormonal angiotensina II e fibroblastos cardíacos. Mecanismo de interação da AII marcado pelo círculo vermelho (Fonte: Adaptação de WEBER e BRILLA, p. 1861, 1991).



2.7 Sistemas poliméricos de liberação controlada de fármacos

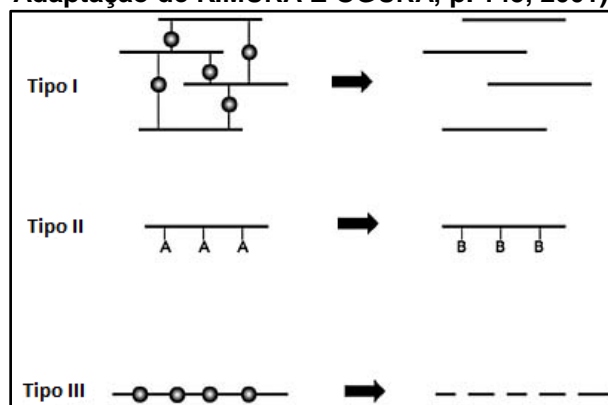
Polímeros biodegradáveis têm se tornado cada vez mais populares. Recentemente vários materiais poliméricos novos foram sintetizados e utilizados na preparação de sistemas de liberação de fármacos. Esses polímeros são degradados *in vivo* por via enzimática ou não-enzimática,

produzindo subprodutos biocompatíveis. Dessa forma, torna-se possível evitar a remoção cirúrgica do dispositivo de liberação esgotado. Independentemente de sua origem e classe química, todos os polímeros biodegradáveis devem possuir algumas características comuns, como estabilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, facilidade de fabricação em larga escala, receptividade à esterilização e flexibilidade para produzir sistemas com diferentes perfis de liberação. Biocompatibilidade polimérica e ausência de toxicidade são parâmetros fundamentais no desenvolvimento de um sistema de liberação de medicamentos, especialmente aqueles projetados para a aplicação sistêmica (LI e JASTI, 2005).

Dois tipos de sistemas de liberação controlada utilizam polímeros biodegradáveis. O primeiro sistema possui um núcleo contendo o fármaco rodeado por uma membrana biodegradável que controla a taxa de liberação, sendo essa constante e previsível. Nesse sistema a degradação significativa da membrana envolvente ocorre depois que a liberação do fármaco foi concluída. Alterar a natureza ou espessura da membrana polimérica biodegradável pode modificar a taxa de liberação do fármaco. O segundo sistema é um dispositivo biodegradável monolítico, que tem o fármaco disperso em um polímero. A liberação do fármaco pode ocorrer por difusão, degradação do polímero ou uma combinação desses dois mecanismos. Se a degradação do polímero é muito mais lenta que a difusão do fármaco, a liberação inicial depende da difusão do fármaco a partir do polímero (KIMURA E OGURA, 2001; YASUKAWA et al., 2005).

A erosão polimérica (degradação) pode ser definida como a conversão de um material inicialmente insolúvel em água em um material solúvel em água. Os vários mecanismos de erosão polimérica podem ser classificados em três tipos, representados na **Figura 7**.

Figura 7 - Representação esquemática do mecanismo de erosão polimérica (Fonte: Adaptação de KIMURA E OGURA, p. 145, 2001).



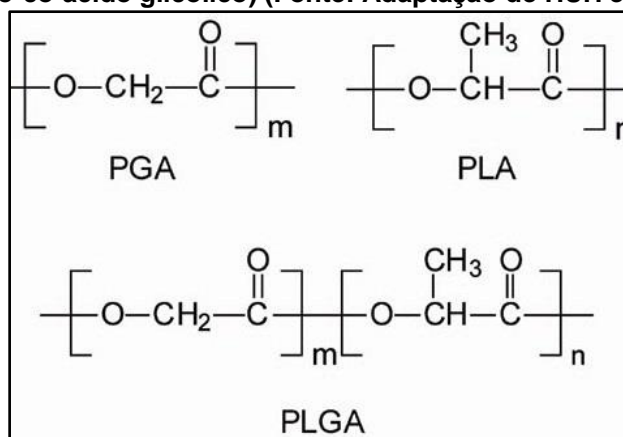
Na erosão tipo I, macromoléculas solúveis em água são ligadas para formar uma rede tridimensional. Quando essas redes são colocadas em um ambiente aquoso podem inchar apenas na medida permitida pela densidade das ligações cruzadas. A erosão destes sistemas pode ocorrer pela clivagem das ligações cruzadas ou solubilização em água da cadeia principal (KIMURA E OGURA, 2001).

Na erosão tipo II, macromoléculas insolúveis em água são convertidas em macromoléculas solúveis em água por hidrólise, ionização ou protonação de cadeias secundárias (KIMURA E OGURA, 2001).

Na erosão do tipo III, macromoléculas de elevada massa molecular, insolúveis em água, são convertidas em pequenas moléculas solúveis em água por uma clivagem hidrolítica das ligações lábeis na cadeia principal do polímero. Como a principal aplicação destes sistemas é a administração sistêmica de fármacos via implantação subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, entre outras, todos os produtos de degradação devem ser completamente atóxicos. Os polímeros utilizados com essa finalidade incluem poliésteres alifáticos, poliamida, policianoacrilatos, polianidridos, poliacetais, e poliortoésteres. Entre esses, o poli (ácido láctico) (PLA), o poli (ácido glicólico) (PGA) e seu copolímero (PLGA) são os mais populares (KIMURA E OGURA, 2001).

O PLGA (**Figura 8**) tem comprovada biocompatibilidade, biodegradabilidade, taxa de liberação manipulável e recebeu aprovação do Food and Drug Administration (FDA) como material implantável. Além disso, os produtos de degradação do PLGA, ácidos lático e glicólico, são metabolizados por meio do ciclo de Krebs em dióxido de carbono e água (MANSOOR et al., 2009).

Figura 8 - Estrutura química do poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido lático) (PLA) e poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (Fonte: Adaptação de HUH et al., p. 45, 2003).



A possibilidade de alterar o tempo de biodegradação do polímero, modificando o teor de ácido lático e de ácido glicólico utilizados durante a síntese (**Tabela 1**), tornou o PLGA atrativo para o uso na produção de vários dispositivos biomédicos desde a década de 70. A taxa de biodegradação do PLGA e a massa molecular afetam as características de liberação do fármaco nos sistemas de liberação, dando assim a composição do polímero um importante papel na personalização das características do implante (LEE et al., 2010).

Tabela 1 - Propriedades dos polímeros e copolímeros derivados dos ácidos lático e glicólico (Fonte: Adaptação de FIALHO et al., p.893, 2003).

Polímero ou copolímero	Temperatura de transição vítrea (°C)	Temperatura de fusão (°C)	Tempo de degradação aproximado (meses)*
PLGA 50:50	45-50	amorfo	2
PLGA 75:25	60	amorfo	2-4
PLGA 85:15	45	amorfo	5
D,L-PLA	57-59	amorfo	12-16
L-PLA	60-67	172-174	18-24
PGA	36	230	2-4

* O tempo de degradação pode variar de acordo com a área superficial, porosidade e massa molecular do sistema.

Polímeros termoplásticos, como o PLGA, amolecem e derretem sobre aquecimento podendo ser moldados em implantes, utilizando técnicas como moldagem a quente, moldagem por injeção, moldagem por compressão e extrusão (FIALHO e SILVA-CUNHA, 2005).

O desenvolvimento de implantes biodegradáveis destinados à aplicação intraocular ocorre, principalmente, com o emprego de dois métodos de fabricação: compressão e moldagem a quente. Primeiramente, o polímero e o fármaco podem ser dissolvidos em uma mistura de água destilada e acetonitrila. Depois a solução resultante é liofilizada para obter uma massa homogênea. Essa massa é utilizada para o desenvolvimento dos implantes por compressão ou técnicas de moldagem a quente. Para técnica de moldagem a quente, a massa homogênea previamente preparada pode ser moldada em hastes, utilizando um sistema adequado de moldagem, aquecendo a uma temperatura de 100 a 120°C. Para obter o máximo de uniformidade, os sistemas poliméricos devem ser submetidos a um controle de qualidade após a preparação (FIALHO e SILVA-CUNHA, 2005).

2.8 Aplicações do PLGA na oftalmologia

Sistemas de liberação de fármacos baseados em polímeros biodegradáveis são promissores para o tratamento de doenças oculares. A versatilidade dos polímeros biodegradáveis permite a construção de sistemas de liberação sob medida para a liberação do fármaco para o tratamento de uma variedade de doenças oculares dos segmentos anterior e posterior do olho. Estudos clínicos estão em andamento avaliando a eficácia e segurança dos sistemas de liberação em uma série de doenças oculares (LEE et al., 2010). Sistemas de liberação poliméricos permitem uma liberação contínua e controlada do fármaco, otimizando assim sua biodisponibilidade e diminuindo possíveis efeitos adversos. Em particular, polímeros biodegradáveis têm sido extensivamente estudados para sistemas de liberação ocular de fármacos para que um procedimento cirúrgico não seja necessário para remover o dispositivo vazio, após o tratamento (FIALHO et al., 2008).

Dentre os polímeros biodegradáveis, sistemas constituídos de PLGA têm sido implantados experimentalmente em vários tecidos do olho e têm demonstrado ser bem tolerados (LEE et al., 2010).

Um sistema de liberação de dexametasona para o tratamento de inflamação após cirurgia de catarata, o Surodex® (Oculex Pharmaceuticals, Inc, EUA) foi avaliado clinicamente. Esse implante foi preparado com PLGA e continha 60 µg de dexametasona. O sistema foi capaz de promover liberação do fármaco por um período de, aproximadamente, 7 a 10 dias. Os estudos clínicos revelaram ainda que o implante foi bem tolerado e efetivo contra a inflamação (FIALHO e SILVA-CUNHA, 2007). Recentemente, um implante polimérico feito com matriz de PLGA para liberação intravítrea de dexametasona, o OZURDEX (Allergan, EUA), foi aprovado pelo FDA para o tratamento de casos de oclusão de vasos da retina em pacientes com retinopatia diabética (SHAH et al., 2010).

Hashizoe e colaboradores (1994) desenvolveram um implante biodegradável contendo doxorrubicina para o tratamento de vitreorretinopatia proliferativa

experimental em coelhos e a taxa de liberação do fármaco no humor vítreo foi avaliada. Esse sistema composto de PLGA e contendo 1% de doxorrubicina, implantado via *pars plana* (parte do corpo ciliar onde não existem estruturas importantes para o olho), promoveu a liberação do fármaco diretamente no vítreo e não alterou a transparência do meio ocular.

Herrero-Vanrell e colaboradores (2009) desenvolveram e caracterizaram micropartículas de PLGA contendo os agentes neuroprotetores fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (GDNF), destinadas a aplicação intraocular como potencial tratamento para o glaucoma. Esse sistema forneceu uma liberação controlada de GDNF e BDNF bioativos por um período de tempo prolongado.

3 JUSTIFICATIVA

O glaucoma, apontado como segunda causa de cegueira mundial, é uma doença neurodegenerativa que afeta as CGRs e seus axônios. Possui tratamento medicamentoso e cirúrgico, sendo que ambos visam reduzir a PIO, que é o principal fator de risco para a doença. A cirurgia filtrante tem se mostrado eficaz na redução da PIO. A maior complicação dessa cirurgia é a proliferação excessiva de fibroblastos, que resulta em formação cicatricial. O losartan apresenta atividade inibitória de fibroblastos, sendo promissor um sistema de liberação contendo esse fármaco no tratamento do glaucoma. Sistemas de liberação prolongada podem promover concentrações terapêuticas do fármaco por um período maior nos tecidos oculares alvo, limitando a exposição sistêmica e levando a uma melhor adesão do paciente ao tratamento. Dessa forma, o desenvolvimento de implantes para veiculação do losartan surge como uma alternativa relevante para inibir a formação cicatricial indesejável após a cirurgia filtrante para tratamento do glaucoma.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Este projeto teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema de veiculação do fármaco losartan em uma matriz polimérica constituída de PLGA, visando o seu emprego para inibição da proliferação de fibroblastos, após cirurgia filtrante para tratamento do glaucoma.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Validação do método analítico de quantificação do losartan;
- 2) Desenvolvimento e caracterização dos sistemas de liberação contendo losartan;
- 3) Avaliação do perfil de liberação *in vitro* dos sistemas obtidos;
- 4) Avaliação da atividade *in vitro* do fármaco a partir do sistema desenvolvido.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Materiais

- Losartan, teor 100,54% – Vasudha Pharma Chem, Índia.
- Polímero poli (D,L-lático-co-glicólico) na proporção 75:25 [PLGA 75:25; viscosidade inerente (v.i.) = 0,50 – 0,70 dl/g] - Resomer® RG 755 S, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co; Ingelheim, Alemanha.
- Fosfato de sódio bibásico anidro – Synth, Brasil.
- Fosfato de potássio monobásico anidro – Synth, Brasil.
- Cloreto de sódio – Synth, Brasil.
- Água ultra pura Milli-Q.
- Metanol – J. T. Baker, grau cromatográfico, USA.
- Acetonitrila – J. T. Barker, grau cromatográfico, EUA.
- Liofilizador (E-C MODULYO, E-C Apparatus Inc. EUA).
- Ovos embrionados, da espécie *Gallus domesticus* e da linhagem Ross, foram adquiridos junto à empresa Rivelli, localizada no município de Mateus Leme – MG.
- Meio de cultura DMEM (*Dulbeco's Modified Eagle Medium*) - Sigma
- Colagenase - Gibco
- Soro fetal bovino - Gibco
- Tripsina - Invitrogen
- Reagente de Tuerck - Vertec
- Solução de MTT (*Tetrazólio 3-(4,5)dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromide*) - Invitrogen

5.2 Métodos

5.2.1 Desenvolvimento e validação do método analítico

Para validação do método analítico de quantificação do losartan, foram utilizados espectrofotômetro SHIMADZU UV-160A e equipamento para registo de cromatografia a líquido de alta eficiência Waters®, equipado com bomba modelo 515, injetor automático modelo 717 plus, detector Waters® 486 UV-VIS. A coluna empregada foi a RP-18 de 4,6 mm de diâmetro, 250 mm de comprimento e tamanho de partículas de 5 µm (ACE® - 121-2546).

Visando assegurar a confiabilidade dos resultados, o método desenvolvido foi devidamente validado segundo os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão, preconizados na resolução 899 de 29/05/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2003).

5.2.1.1 Desenvolvimento do método analítico

Primeiramente foi realizada uma varredura de uma solução do fármaco em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-160A). A amostra de losartan testada foi diluída em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 até a concentração final de 50 µg/mL, sendo a varredura programada na faixa entre 200 a 400 nm, com o objetivo de determinar o comprimento de absorbância máxima do fármaco.

Os experimentos para validação do método foram realizados após a definição das melhores condições cromatográficas de análise.

A fase móvel foi adaptada da descrita na Farmacopeia Americana (The United States Pharmacopeia, 2007) e o volume de injeção foi de 10 µL. As amostras

foram filtradas em membrana de 0,45 mm e a fase móvel foi desgaseificada por 30 minutos.

5.2.1.2 Validação do método analítico

Seletividade

A seletividade do método foi determinada pela completa separação do pico correspondente ao losartan dos picos dos interferentes. Esses interferentes foram: os componentes da fase móvel, o PBS¹ e o PLGA, além dos produtos de degradação de implantes compostos apenas pelo polímero PLGA 75:25. Esses implantes foram incubados em um meio contendo PBS a 37°C sob agitação mecânica de 30 rpm e, após 7 dias, o tampão foi coletado e os produtos de degradação do polímero foram analisados.

Linearidade

A preparação da curva de linearidade foi realizada a partir de seis concentrações diferentes, cada uma em triplicata, seguida do tratamento estatístico dos dados para determinação da equação da reta e determinação do coeficiente de correlação (R^2). Para a construção das curvas analíticas foram preparadas três soluções estoque de losartan na concentração de 250 µg/mL: pesou-se exatamente 25 mg losartan que foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com PBS. Por meio de diluições subsequentes da solução estoque de losartan, foram obtidas as soluções nas concentrações teóricas para a construção da curva analítica. As diluições foram realizadas conforme **Tabela 2**.

¹ Composição: Fosfato de sódio bibásico anidro (0,595 g), fosfato de potássio monobásico (0,0475 g), cloreto de sódio (2,0 g) e água destilada (quantidade suficiente para 250 mL).

Tabela 2 – Diluições para construção das curvas analíticas para quantificação do losartan.

Solução	Alíquotas da solução estoque de losartan (mL)	Balões utilizados para diluição (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)
1	2,0 e 5,0	50 e 50	1
2	1,0	50	5
3	1,0	10	25
4	2,0	10	50
5	3,0	10	75
6	4,0	10	100

Limites de detecção e quantificação

Utilizando os dados obtidos na curva de calibração foram determinados os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Por meio da divisão entre o desvio padrão dos coeficientes lineares das três curvas de calibração do ensaio de linearidade pela média dos coeficientes angulares das curvas, multiplicados por 3,0 e 10,0 foram calculados o LQ e o LD, respectivamente. As equações estão representadas abaixo:

$$LQ = 3 \frac{DP \cdot b}{a}$$

$$LD = 10 \frac{DP \cdot b}{a}$$

Onde, b = coeficiente linear e a = coeficiente angular

Precisão

A precisão foi estabelecida por meio do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV), que indica a relação percentual entre o desvio padrão absoluto e as médias dos dados, ferramenta estatística utilizada para a comparação entre duas ou mais corridas analíticas diferentes. Para o seu cálculo, foi utilizada a equação representada a seguir.

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Onde

CMD = concentração média determinada

DP = desvio padrão

DPR = desvio padrão relativo

DPR < ou = a 5%

A concentração média foi determinada avaliando-se as áreas dos picos obtidos de seis análises do losartan na concentração de 50 µg/mL. Para o preparo de cada solução pesou-se 5 mg de losartan que em seguida foram diluídos com PBS em balões volumétricos de 100 mL.

Exatidão

Para avaliação da exatidão foi realizada a comparação do valor encontrado com o valor esperado de uma solução do analito com concentração conhecida. A solução foi preparada por diluição do losartan em PBS pH 7,4 contendo produtos de degradação do implante sem o fármaco (**Tabela 3**). Foram realizadas 3 determinações e o resultado foi expresso pela seguinte equação:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Tabela 3 – Diluições para realização do teste de exatidão.

Solução	Quantidade de losartan pesada (mg)	Alíquota da primeira solução (mL)	Balões utilizados para diluição (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)
1	10	1	100 e 100	1
2	5	x	100	50
3	10	x	100	100

Estabilidade

A estabilidade do fármaco nas condições utilizadas para o teste de liberação *in vitro* foi avaliada. O losartan foi diluído com PBS pH 7,4 em balão volumétrico de 100 mL até uma concentração final de 50 µg/mL e a amostra foi colocada em incubadora mantida a 37 °C e com rotação de 30 rpm. Após 7 dias, a amostra da solução de losartan em PBS foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e comparada com uma solução padrão na concentração de 50 µg/mL. A análise foi realizada em triplicata. Como a RE 899/2003 não estabelece uma faixa de recuperação foi utilizada a faixa estabelecida pela European Commission (2002), de 80 a 110%.

5.2.2 Desenvolvimento dos implantes contendo losartan

Os implantes contendo 25% de losartan foram preparados de acordo com o método desenvolvido por Fialho e Silva-Cunha (2005). Inicialmente, 100 mg de losartan foram solubilizados em 2 mL de água destilada e 400 mg de PLGA foram solubilizados em 5 mL de acetonitrila. Em seguida a solução de losartan foi incorporada ao PLGA e foram adicionados mais 7 mL de acetonitrila até obtenção de uma solução límpida. Essa solução foi transferida para frascos de 10 mL, congelada em nitrogênio líquido e liofilizada por 24 horas (Liofilizador E-C MODULYO, E-C Apparatus Inc. EUA). Obteve-se uma massa homogênea, que foi moldada a quente na temperatura entre 100 e 120°C em forma de bastões com aproximadamente 0,45 mm de diâmetro e 6 mm de comprimento.

5.2.3 Determinação do peso médio dos implantes

O peso médio dos implantes foi calculado utilizando os valores de peso de 10 implantes. O resultado foi expresso em função da média \pm desvio padrão (DP).

5.2.4 Determinação do teor de losartan nos implantes

A quantidade de losartan presente nos implantes foi determinada com o emprego do método de CLAE desenvolvido e validado anteriormente. Cada implante foi colocado em um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com acetonitrila. A concentração dessa solução foi doseada e a porcentagem de losartan nos implante foi calculada em função do peso de cada implante. Os resultados foram expressos em função da média \pm desvio padrão (DP).

5.2.5 Análise morfológica dos implantes por microscopia eletrônica de varredura

Foram realizadas análises morfológicas dos implantes imediatamente após o preparo e de implantes retirados do estudo de liberação *in vitro* após intervalos de 5 e 8 dias de incubação. Após serem retirados do meio, os implantes foram ligeiramente secos em papel absorvente e então colocados em dessecador a vácuo com sílica por 72 horas.

Em seguida, aplicou-se cola de prata (condutora de elétrons) na superfície dos *stubs* (suportes de alumínio) utilizados para fixação das amostras. Após a secagem da cola, os implantes foram fixados utilizando cola branca. Os suportes foram deixados em dessecador por 48 horas até a metalização.

As amostras foram metalizadas no metalizador do Laboratório de Microanálises (Departamento de Física – Instituto de Ciências Exatas/Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)) por 60 segundos, sendo a taxa de deposição de 15 nm de ouro. Elas foram então guardadas em dessecador até o dia em que foi realizada a microscopia.

As microscopias foram realizadas no Centro de Microscopia da UFMG. Foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão por efeito de campo (Quanta 200 - FEG - FEI – 2006) na voltagem de 5,0 kV e uma distância de trabalho entre 15,4 e 34,7 mm. Voltagens maiores não foram utilizadas pois destruíam os implantes, provavelmente devido a sensibilidade térmica do polímero. As imagens obtidas foram processadas utilizando os programas Adobe Photoshop versão 6.0 e Adobe Illustrator versão 9.01 (Adobe Systems Incorporated, 2000, EUA).

5.2.6 Termogravimetria

Foram analisadas por termogravimetria (TG) as amostras de losartan, PLGA 75:25, mistura física (25% de losartan + 75% PLGA) e mistura liofilizada (25% de losartan + 75% PLGA). Foram pesados 5,4214 mg de losartan, 5,3460 mg de PLGA, 5,7140 mg da mistura física e 5,5211 mg da mistura liofilizada.

As amostras foram colocadas em cadinhos de alumina (Al_2O_3) e analisadas em termobalança modelo TGA/SDTA 851e (Mettler Toledo GmbH, Brasil) sob atmosfera dinâmica de nitrogênio como gás de arraste com fluxo de 50 mL/min. O aquecimento foi realizado da temperatura ambiente a 600°C na razão de aquecimento de 10°C por minuto.

5.2.7 Calorimetria exploratória diferencial

Para confirmar os resultados obtidos por TG as amostras de losartan, PLGA 75:25, misturas físicas (50% de losartan + 50% PLGA e 25% de losartan + 75% PLGA) e mistura liofilizada (25% de losartan + 75% PLGA) foram analisadas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). As amostras foram pesadas (entre 2 e 3 mg) e seladas em um cadinho de alumínio. Em seguida foram

submetidas a um aquecimento de 25 a 350 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio de 50 mL/min e taxa de aquecimento de 10°C/min utilizando o calorímetro modelo DSC 822e (Mettler Toledo GmbH, Brasil)

5.2.8 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrômetro Spectrum One Perkin Elmer. Foram realizadas varreduras no intervalo de 650 a 4000 cm⁻¹.

5.2.9 Estudo de liberação *in vitro*

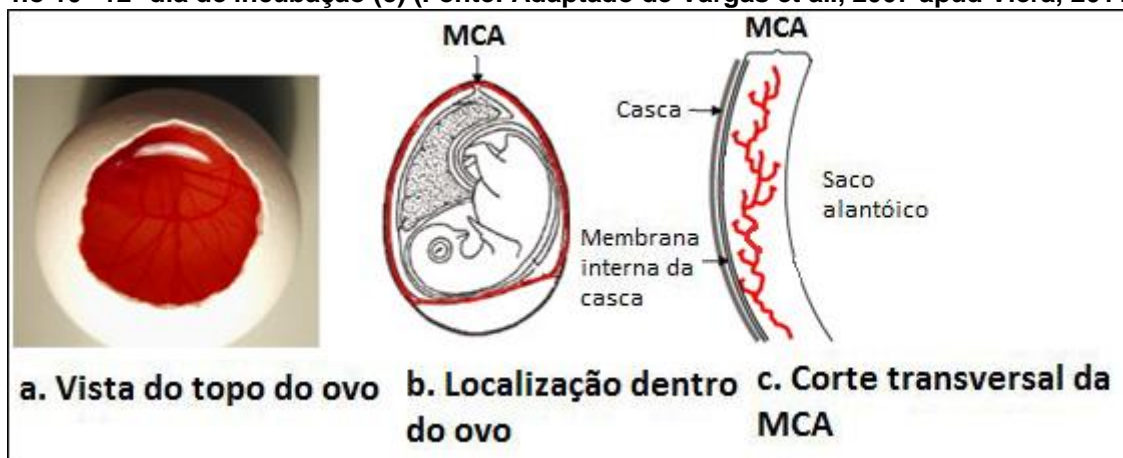
Os implantes (n=5) constituídos de PLGA e losartan foram colocados em incubadora, sob agitação de 30 r.p.m. e temperatura de 37°C (simulando as condições fisiológicas), dentro de frascos contendo 2 mL de PBS. Todo o meio foi retirado nos dias de coleta e substituído por nova solução de PBS. As amostras foram analisadas pelo método de CLAE desenvolvido e validado anteriormente. Depois do último dia de coleta (93 dias) os implantes foram solubilizados em acetonitrila para análise.

5.2.10 Ensaio de angiogênese na membrana corioalantóica de embrião de galinha

A atividade antiangiogênica do losartan e do implante de PLGA contendo este fármaco, foi avaliada por meio do ensaio da membrana corioalantóica (MCA) empregando o método descrito por Burt e colaboradores (1995) e Knoll e colaboradores (1999), adaptada por Vieira (2011).

Ovos de galinha embrionados foram abertos no 3º dia de desenvolvimento através de uma pequena incisão na região da câmara de ar da casca dos ovos, com posterior retirada de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro da casca. Em seguida a membrana interna da casca foi retirada, deixando exposta a MCA (Figura 9).

Figura 9 – Membrana corioalantóica do embrião de galinha. Imagem da MCA de um embrião de 10 dias (a); localização da MCA (em vermelho) ao redor do embrião de 12 dias e em contato direto com a casca do ovo (b); ilustração do corte transversal da MCA no 10º-12º dia de incubação (c) (Fonte: Adaptado de Vargas et al., 2007 apud Viera, 2011)



A abertura na casca foi selada com fita adesiva, para evitar o ressecamento da MCA. Os ovos foram colocados em suporte e mantidos em incubadora automática digital (Premium Ecológica®) à temperatura de 37°C e 60% de umidade relativa do ar. No 5º dia de desenvolvimento embrionário os ovos foram separados em grupos de acordo com a Tabela 4 e os ovos não viáveis, com morte do embrião, foram descartados.

Tabela 4 – Grupos de tratamentos utilizados no ensaio de angiogênese.

Grupo	Tratamento
1	Solução de PBS pH 7,4 (grupo controle)
2	Solução de losartan 250 µg/mL
3	Solução de losartan 500 µg/mL
4	Solução de losartan 1000 µg/mL
5	Implantes constituídos de PLGA e losartan (25%)

Em seguida, nos grupos 1, 2, 3 e 4 foram aplicados sobre a MCA 20 μ L das soluções descritas na **Tabela 4**. No grupo 5, com auxílio de uma pinça, foram aplicados os implantes sobre a MCA. No 6º dia de desenvolvimento dos embriões 20 μ L das soluções tratamento foram aplicados novamente nos grupos 1, 2, 3 e 4. O grupo 5 foi apenas monitorado. Para cada grupo foram utilizados oito embriões.

No 7º dia de incubação a MCA dos ovos foi fixada com solução de formaldeído a 3,7% por 10 minutos. Em seguida, as MCAs foram extraídas e fotografadas com a câmera Motic Cam acoplada ao estereomicroscópio Motic, sendo as imagens obtidas pelo *software* Motic Images Plus 2.0. As imagens obtidas foram processadas utilizando o programa ImageJ versão 1.45 para a quantificação dos vasos sanguíneos.

Os dados foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA One-way) e pelo pós-teste de Bonferroni, sendo que $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.2.11 Avaliação *in vitro* da atividade do losartan em fibroblastos

A atividade inibitória do crescimento de fibroblastos promovida pelo losartan foi avaliada em células isoladas a partir da pele da pálpebra superior de pacientes submetidos à blefaroplastia (cirurgia para remoção de excesso de pele da região palpebral), de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Certificado de apresentação para apreciação ética - 02887512.6.0000.5149). Os testes foram realizados em parceria com o Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas sob a responsabilidade do professor Alfredo Miranda Goes e Dawidson Assis Gomes.

Isolamento e cultivo dos fibroblastos

Logo após a remoção da pele da pálpebra, esta foi transferida para tubos de polietileno de 50 mL contendo 20 mL de meio de cultura DMEM sem soro. Em capela de fluxo laminar, a pele foi lavada 3 vezes nesse mesmo meio, seguida de uma lavagem em PBS (pH 7,4). A pele foi, então, transferida para placa de cultura (**Figura 10**) e cortada com bisturi em pedaços de aproximadamente 1 cm².

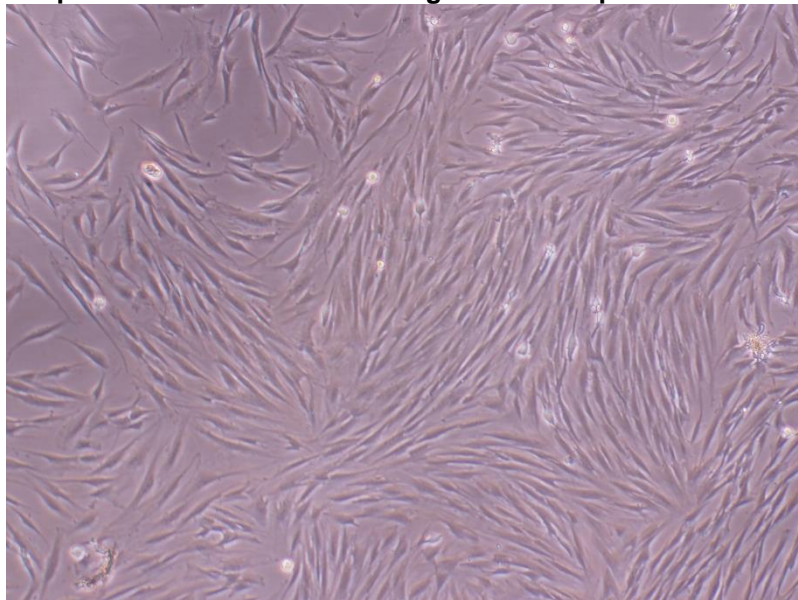
Figura 10 - Pele da pálpebra superior de pacientes submetidos à blefaroplastia.



Os pedaços de pele foram transferidos para um tubo contendo solução de colagenase 0,1% em PBS e incubados por duas horas, em estufa 37°C, atmosfera úmida e 5% de CO₂. Durante esse período o tubo contendo o tecido foi agitado vigorosamente em intervalos sucessivos de 15 minutos. Ao fim desse processo, adicionou-se DMEM contendo 10% soro fetal bovino (SFB) ao preparado para inativar a solução de colagenase. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 1400 rpm por 10 minutos. O precipitado obtido foi solubilizado em meio de cultura basal, transferido para garrafa de cultura celular T-25 e mantido em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após 24 horas, a cultura de fibroblastos foi visualizada por microscópio para verificar se as

células já se apresentavam aderidas à superfície plástica e se exibiam morfologia fibroblastóide (**Figura 11**).

Figura 11 - Cultura de fibroblastos obtidos a partir de extração primária da pele da pálpebra de pacientes submetidos à cirurgia de blefaroplastia. Aumento de 40X.



Plaqueamento das células

O meio de cultura foi retirado das garrafas de cultivo de fibroblastos e as mesmas foram lavadas 2 vezes com 7 mL de PBS e tratadas com 1 mL de tripsina por 5 minutos a 37°C. Após a ação da tripsina, esta foi inativada com meio de cultura DMEM contendo 10% SFB, sendo o volume final de 10 mL. Então, as células foram obtidas após centrifugação a 1400 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet contendo as células foi disperso em 1 mL de DMEM 10% SFB. Uma alíquota do meio foi retirada e diluída em reagente de Tuerck para determinação do número de células obtidas, por meio de contagem em Câmara de Neubauer. A concentração celular foi ajustada para $5,0 \times 10^4$ células/poço em meio DMEM 10% SFB e as células foram distribuídas em placas de poliestireno de 24 poços, em triplicata, que foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Após 24 horas, foi feita a retirada do meio de cultura das placas e cada poço recebeu uma nova alíquota de 1 mL meio DMEM 10% SFB, acrescida ou não de um tratamento específico, conforme mostrado nos esquemas das **Figuras 12 e 13**. As

concentrações utilizadas foram escolhidas com base na literatura e em nossos estudos preliminares.

Tratamentos

Os tratamentos foram aplicados de acordo com o esquema abaixo:

Figura 12 - Esquema da placa utilizada no teste de inibição de fibroblastos pelos implantes contendo losartan. Placa utilizada para testes de proliferação celular e contagem de células.

Controle células	Controle células	Controle células			
Implante branco	Implante branco	Implante branco			
Implante contendo losartan	Implante contendo losartan	Implante contendo losartan			

Figura 13 - Esquema da placa utilizada no teste de curva padrão de losartan para inibição do crescimento de fibroblastos. Esse esquema foi utilizado para os testes de proliferação celular.

Solução de losartan 0,00025 µg/mL	Solução de losartan 0,00025 µg/mL	Solução de losartan 0,00025 µg/mL	Solução de losartan 0,0025 µg/mL	Solução de losartan 0,0025 µg/mL	Solução de losartan 0,0025 µg/mL
Solução de losartan 0,025 µg/mL	Solução de losartan 0,025 µg/mL	Solução de losartan 0,025 µg/mL	Solução de losartan 0,25 µg/mL	Solução de losartan 0,25 µg/mL	Solução de losartan 0,25 µg/mL
Solução de losartan 2,5 µg/mL	Solução de losartan 2,5 µg/mL	Solução de losartan 2,5 µg/mL	Solução de losartan 25 µg/mL	Solução de losartan 25 µg/mL	Solução de losartan 25 µg/mL
Solução de losartan 250 µg/mL	Solução de losartan 250 µg/mL	Solução de losartan 250 µg/mL			

Os implantes utilizados nos testes de inibição foram esterilizados por irradiação, utilizando uma dose de 20 KGy, no Centro de Desenvolvimento e Tecnologia Nuclear.

Após o término dos testes, cujos tratamentos foram feitos com os implantes contendo losartan, o meio de cultura foi coletado e, posteriormente, a concentração do fármaco foi doseada por CLAE.

Contagem das células em Câmara de Neubauer

Após os períodos de incubação com os respectivos tratamentos, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, as células foram contadas em Câmara de Neubauer. Após tripsinização dos poços, a tripsina foi inativada com meio DMEM 10% SFB e o conteúdo de cada poço foi transferido para tubos eppendorf. As amostras foram homogeneizadas e uma alíquota foi retirada de cada tubo e misturada ao reagente de Tuerck, seguida de nova homogeneização e transferência de 10 µL para cada quadrante da Câmara de Neubauer. O número de células contadas nos quatro quadrantes foi aplicado à fórmula:

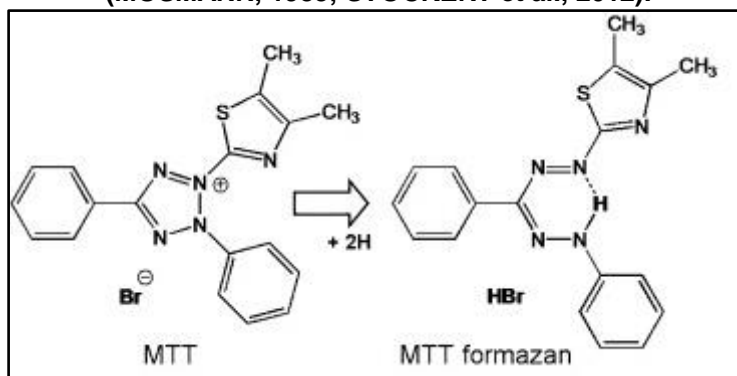
$$\frac{\text{Número de células} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{Número de campos}} = \text{número de células/mL}$$

Ensaio de proliferação celular

Foi realizado o ensaio de proliferação celular seguindo-se o esquema descrito nas **Figuras 12 e 13**. Após os tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas, foi feita a remoção do meio de cultura de cada poço e foram adicionados 170 µL de solução de MTT (5 mg/mL) com nova alíquota de 210 µL de DMEM 10% SFB às placas, que foram incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂, durante 2 horas. Foi observada uma coloração roxa, devido à formação de cristais de formazan, que é um precipitado insolúvel. Esses cristais, que foram visualizados em microscópio, são formados a partir de uma reação de oxi-redução do MTT realizada por células metabolicamente ativas (**Figura 14**) (MOSMANN, 1983; STOCKERT et al., 2012). Em seguida, foram adicionados 210 µL de 10% SDS-HCl em cada poço e a placa foi incubada a 37°C overnight para a solubilização dos cristais de formazan. Foram retirados de cada poço 100 µL e transferidos para uma placa de 96 poços, sendo o procedimento efetuado em triplicata para cada poço. A leitura da placa foi efetuada a 595 nm em leitor de ELISA (Elx800, Bio-Tek Instruments, Vermont, EUA). Os valores de densidade óptica foram corrigidos, subtraindo-se o valor da densidade

óptica dos poços sem células, contendo somente a solução de MTT + meio de cultura + 10% SDS.

Figura 14 – Reação de oxi-redução do MTT em células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983; STOCKERT et al., 2012).



Foi calculada a porcentagem de proliferação que corresponde à razão entre a densidade óptica das células na presença de cada estímulo (implantes com ou sem losartan e concentrações de losartan solúvel da curva padrão) e a densidade óptica das células na ausência de estímulo (células incubadas somente com meio de cultura), multiplicada por 100. A porcentagem de proliferação foi determinada a partir da equação abaixo:

$$\% \text{proliferação} = \frac{\text{D.O.}_{.595} \text{ de células na presença de estímulo}}{\text{D.O.}_{.595} \text{ de células na ausência de estímulo}} \times 100$$

Onde, $\text{D.O.}_{.595}$ = densidade óptica a 595 nm.

Análise estatística usada para os testes “in vitro”

Para a análise de dois ou mais grupos utilizou-se o teste ANOVA. A comparação das médias foi feita por meio do Teste de Bonferroni. Foi adotado um nível de significância de $P < 0,05$. O programa utilizado foi o GraphPad Prism versão 5.0 para Windows.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento e validação do método analítico

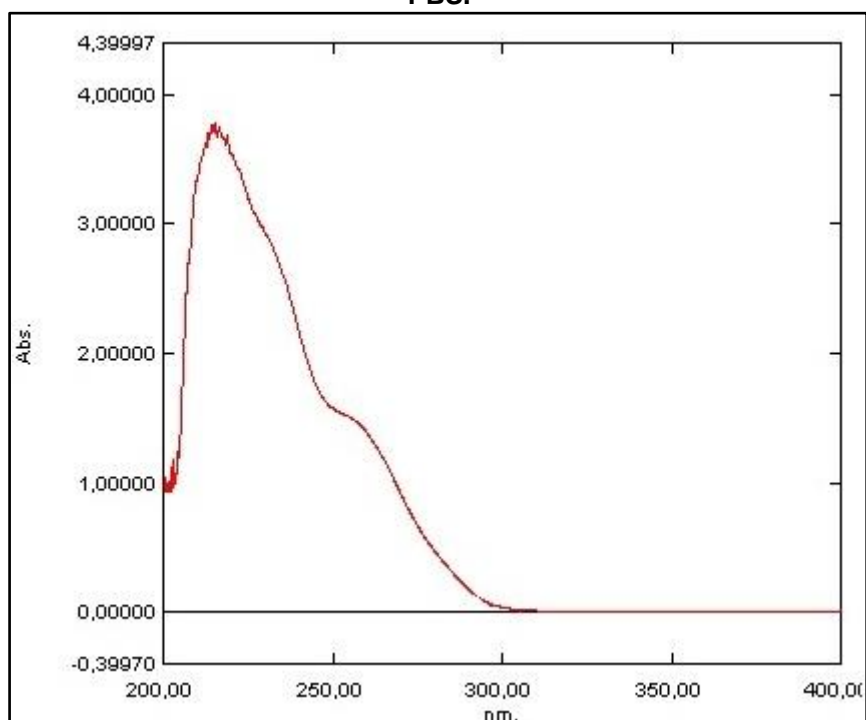
6.2.1 Desenvolvimento do método analítico

Dentre as técnicas de doseamento disponíveis para o losartan, descritas em compêndios oficiais, desataca-se a CLAE com detecção por ultravioleta (UV). Essa foi a técnica escolhida para quantificação do losartan presente nos implantes durante o teste de liberação *in vitro*.

Determinação do comprimento de onda

De acordo com a varredura realizada em espectrofotômetro, o comprimento de onda de maior absorção do fármaco e sem interferência da absorção dos solventes da fase móvel foi 230 nm (**Figura 15**). Portanto, este foi o comprimento de onda selecionado para as análises em CLAE.

Figura 15 - Espectro na região ultravioleta/visível do losartan (50 µg/mL) diluído em PBS.

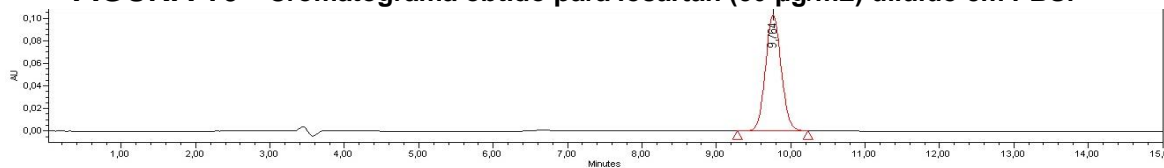


As condições cromatográficas de análise definidas durante o desenvolvimento do método estão demonstrados na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Condições cromatográficas adotadas.

Fase móvel	Fluxo da fase móvel (mL/minuto)	Modo do fluxo	Comprimento de onda no UV (nm)	Temperatura da coluna
Metanol; água; ácido fosfórico (60; 40; 0,5% v/v)	0,8	Isocrático	230	Ambiente (23°C ± 2)

De acordo com a **Figura 16**, o tempo de retenção do pico correspondente ao losartan foi de 9,8 minutos.

FIGURA 16 - Cromatograma obtido para losartan (50 µg/mL) diluído em PBS.

6.1.2 Validação do método analítico

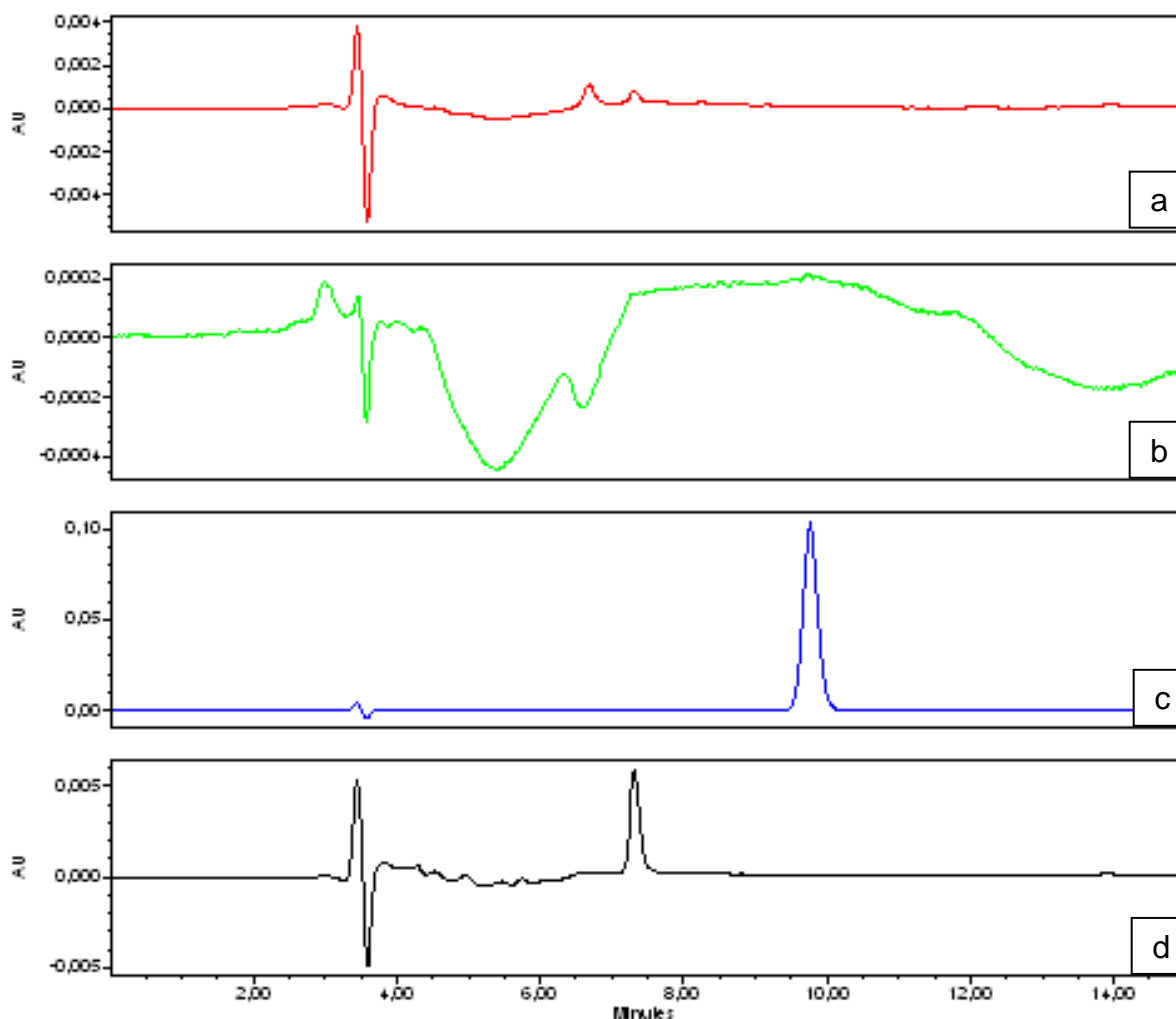
Quando ocorrem mudanças significativas na utilização do método ou na matriz é necessário realizar a validação. Baseado no método descrito por Maio e colaboradores (2005) e na farmacopeia americana (2007), foi desenvolvido e validado o método de quantificação do losartan nos implantes.

Seletividade

De acordo com a Resolução RDC nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA, a seletividade é a capacidade de medir exatamente um composto na presença de outros componentes como impurezas e produtos de degradação. Para a análise da seletividade, devem-se identificar substâncias indesejáveis que podem estar presentes no momento da quantificação e avaliar se ocorrem alterações e interferências na análise da substância de interesse.

Foram comparados os cromatogramas obtidos nas seguintes condições: fase móvel, fármaco diluído em PBS, PLGA solubilizado em PBS e produtos de degradação do polímero PLGA 75:25 (**Figura 17**).

FIGURA 17 - Cromatogramas obtidos para: implante branco (a), fase móvel (b), losartan 50 µg/mL (c) e PLGA 75:25 em PBS (d).



A análise dos cromatogramas indica uma boa separação do fármaco e dos possíveis interferentes uma vez que os picos presentes no meio contendo PBS, PLGA e os produtos de degradação do PLGA não interferem no pico obtido para quantificação do fármaco, comprovando assim a seletividade do método.

Linearidade

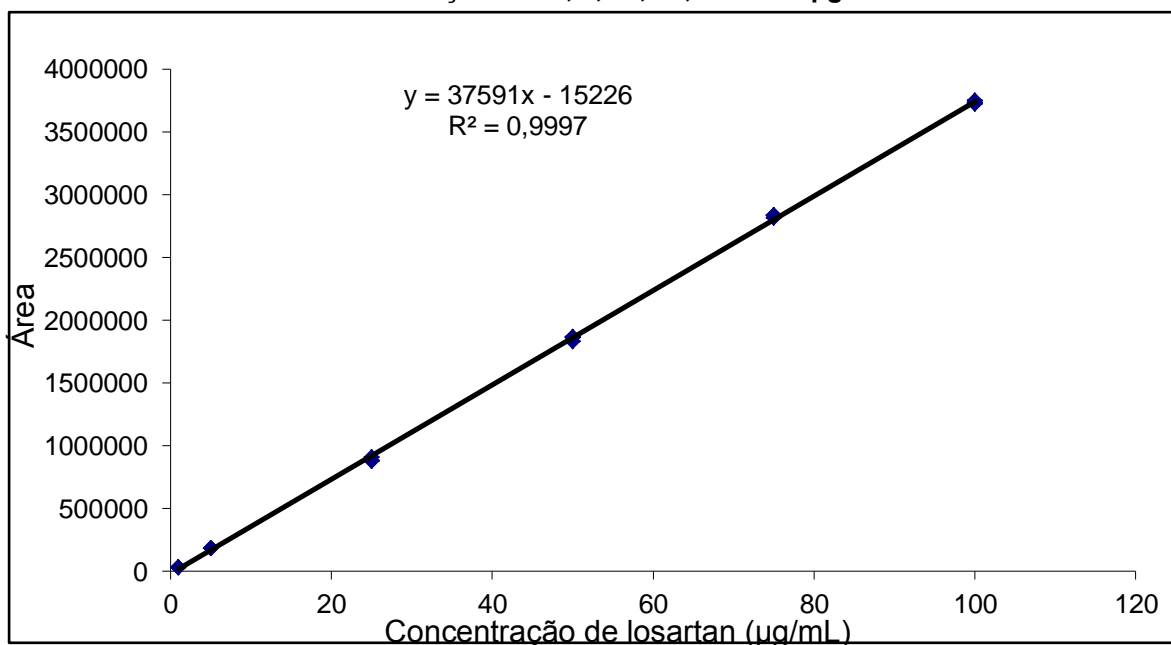
A linearidade de um método analítico é a capacidade deste em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

A curva de calibração do losartan em PBS, construída a partir das médias das áreas das concentrações de 1, 5, 25, 50, 75 e 100 µg/mL, o coeficiente de correlação linear (R^2) e equação da reta estão representados na **Figura 18**. Os dados utilizados na construção da curva estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Dados da construção da curva de calibração.

Concentração (µg/mL)	Média das áreas ± DPR	DPR (%)
1	34604 ± 50	0,14
5	185521 ± 1364	0,74
25	890741 ± 14393	1,62
50	1853553 ± 18912	1,02
75	2830054 ± 10131	0,35
100	3737527 ± 13484	0,36

FIGURA 18 - Curva de calibração, equação da reta e R^2 para o losartan em PBS nas concentrações de 1, 5, 25, 50, 75 e 100 µg/mL.



A curva construída apresentou linearidade, uma vez que a média dos resultados de concentração das amostras, no intervalo de 1 a 100 µg/mL apresentaram-se proporcionais. O coeficiente de correlação encontrado para a

curva média foi de 0,9997, de acordo com o preconizado pela RE 899 de 2003 da ANVISA.

Os resultados foram tratados estatisticamente pelo teste de Ryan-Joiner, confirmando a normalidade dos dados. Dessa forma, foi possível utilizar o teste ANOVA, pelo qual foi verificada a regressão linear significativa e o desvio da linearidade não significativo ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Teste ANOVA.

	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Media dos Quadrados	F
Regressão	1	$3,33 \times 10^{13}$	$3,33 \times 10^{13}$	62219,15*
Resíduo	16	$8,56 \times 10^9$	$5,35 \times 10^8$	-
Total	17	$3,33 \times 10^{13}$	-	-

* Valor significativo ($\alpha = 0,05$)

Limite de detecção e quantificação

Foram obtidos os seguintes valores de coeficiente de linearidade para as três curvas (**Tabela 8**):

Tabela 8 – Dados dos cálculos dos limites de quantificação e detecção.

curva	Coeficiente de linearidade
1	13696
2	13351
3	18630

Utilizando esses valores foram calculados os limites de quantificação e detecção de acordo com as equações descritas anteriormente. A menor concentração de losartan em solução que apresentou um pico quantificável

com exatidão e precisão foi de 0,79 $\mu\text{g/mL}$. Com relação ao limite de detecção o valor encontrado foi de 0,24 $\mu\text{g/mL}$.

Precisão

A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas, sendo a precisão intracorrida (repetibilidade) a concordância dos resultados dentro de um curto período de tempo com mesmo analista e a mesma instrumentação. A precisão intercorridas (intermediária) é a concordância dos resultados no mesmo laboratório, mas em dias diferentes.

Para análise das precisões foram realizadas seis pesagens do fármaco e posterior diluição PBS para a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. A análise foi feita em um dia e repetida após dois dias para fins de comparação. Os resultados estão apresentados nas **Tabelas 9 e 10**.

Tabela 9 - Análise estatística intracorrida (Repetibilidade).

	Amostra	Concentração observada ($\mu\text{g/mL}$)	Área
Dia 1	1	50,9	1894834
	2	49,7	1851681
	3	48,9	1819287
	4	52,9	1971244
	5	49,2	1830811
	6	52,2	1946522
	Média		1885729
	DPR		3,33

Tabela 10 - Análise estatística intercorridas (Intermediária).

Dia 2	Amostra	Concentração observada ($\mu\text{g/mL}$)	Área
	1	51,5	1916932
	2	52,5	1956010
	3	50,7	1887510
	4	51,4	1915815
	5	51,4	1914987
	6	53,4	1989664
	Média		1930153
	DPR		1,89

O cálculo do DPR para avaliar os resultados intra-corrida e inter-corridas mostraram-se satisfatórios e os desvios foram baixos, menores que 5%.

Exatidão

A exatidão avalia a proximidade dos resultados obtidos pela metodologia em estudo com o valor real. A exatidão deve ser realizada após determinação da curva de linearidade, com triplicata de determinações, em concentrações baixa, média e alta do analito.

A exatidão desse método foi avaliada a partir dos resultados de recuperação do losartan em concentrações equivalentes aos níveis baixo (1 $\mu\text{g/mL}$), médio (50 $\mu\text{g/mL}$) e alto (100 $\mu\text{g/mL}$). Cada concentração foi determinada em triplicata, calculada a partir da comparação com uma solução padrão de losartan e o resultado expresso pela média obtida. As porcentagens de recuperação do losartan estão apresentadas na **Tabela 11**.

Tabela 11 – Porcentagem de recuperação do losartan para a avaliação da exatidão do método.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração observada (µg/mL)	Concentração média observada (µg/mL)	Recuperação (%)
1	0,99	1,01	101
	1,01		
	1,04		
50	50,01	50,14	100
	50,16		
	50,25		
100	100,90	101,00	101
	100,95		
	101,16		

De acordo com os dados apresentados acima o método apresentou exatidão adequada, sendo que permitiu a recuperação das concentrações baixa, média e alta dentro do limite estabelecido de 98,0 a 102,0%.

Estabilidade

De acordo com a **Tabela 12**, a solução de losartan em PBS atingiu 94% da concentração inicial, após 7 dias. A estabilidade foi considerada adequada visto que no teste de liberação a amostra de tampão é renovada no máximo a cada 7 dias e a recuperação está dentro da faixa estabelecida de 80 a 110%.

Tabela 12 - Dados de estabilidade da amostra de losartan.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Concentração média observada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
50	1522899	47,1	94
	1914960		
	1818438		

Pode-se concluir que o método analítico proposto para detecção e quantificação do losartan por CLAE mostrou-se seletivo, exato, preciso e linear no intervalo de concentração entre 1 e 100 $\mu\text{g/mL}$, sendo adequado para a quantificação do losartan em testes de liberação *in vitro*.

6.2 Desenvolvimento dos implantes contendo losartan

Os implantes desenvolvidos apresentaram aspecto macroscópico homogêneo, compacto e formato cilíndrico, com aproximadamente 0,45 mm de diâmetro e 6 mm de comprimento (**Figura 19**).

Para a padronização do diâmetro dos sistemas foi utilizado o Trocater Transescleral (Accurus® 25 – Gauge System, Alcon, Inc, EUA) (**Figura 20**) e para padronização do comprimento foi utilizado um paquímetro.

Figura 19 – Implante de PLGA contendo o fármaco losartan.

Figura 20 – Trocater Transcleral (Accurus® 25 – Gauge System, Alcon, Inc, EUA) (A) utilizado na padronização da espessura dos implantes e implante de PLGA contendo losartan (B).



6.3 Determinação do peso médio dos implantes

O peso individual dos implantes, a média e o desvio padrão estão descritos na **Tabela 13**.

Tabela 13 - Peso médio com desvio padrão dos implantes de PLGA e losartan (25%)

Implante	Peso (mg)
1	1,72
2	1,65
3	1,67
4	1,72
5	1,63
6	1,72
7	1,76
8	1,68
9	1,73
10	1,69
Média	1,70
DP	0,04

6.4 Determinação do teor de losartan nos implantes

O teor de fármaco em cada implante, o teor médio e o desvio padrão estão descritos na **Tabela 14**.

Tabela 14 - Teor médio com desvio padrão do fármaco nos implantes de losartan e PLGA.

Implante	Teor (%)
1	23,9
2	22,4
3	21,6
4	21,7
5	22,1
6	21,7
7	23,1
8	20,5
Média	22,1
DP	1,0

6.5 Microscopia eletrônica de varredura

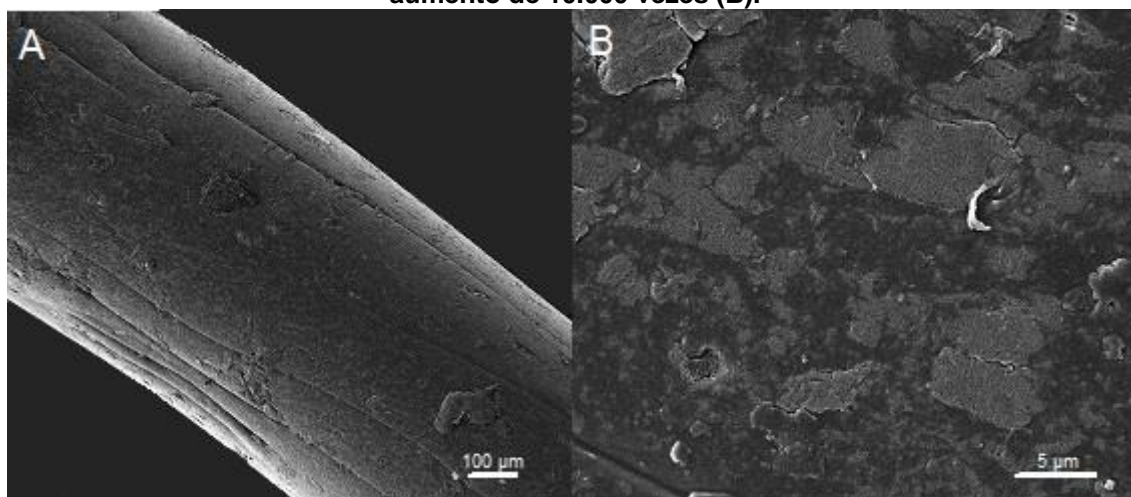
A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um método de obtenção de uma imagem ampliada e tridimensional da amostra a partir da interação de um feixe de elétrons que colide com a amostra.

A morfologia da superfície de sistemas poliméricos tem um papel importante no seu processo de degradação e de liberação dos fármacos nele presentes (BYRRO et al., 2009). Ela pode esclarecer os aspectos superficiais dos implantes desenvolvidos e possibilitar uma avaliação, quanto ao aspecto morfológico, dos diferentes perfis de liberação. A MEV também foi realizada

com o objetivo de verificar o comportamento da matriz polimérica após diferentes períodos de incubação em meio de liberação e observar a formação de poros ou fissuras na superfície dos implantes.

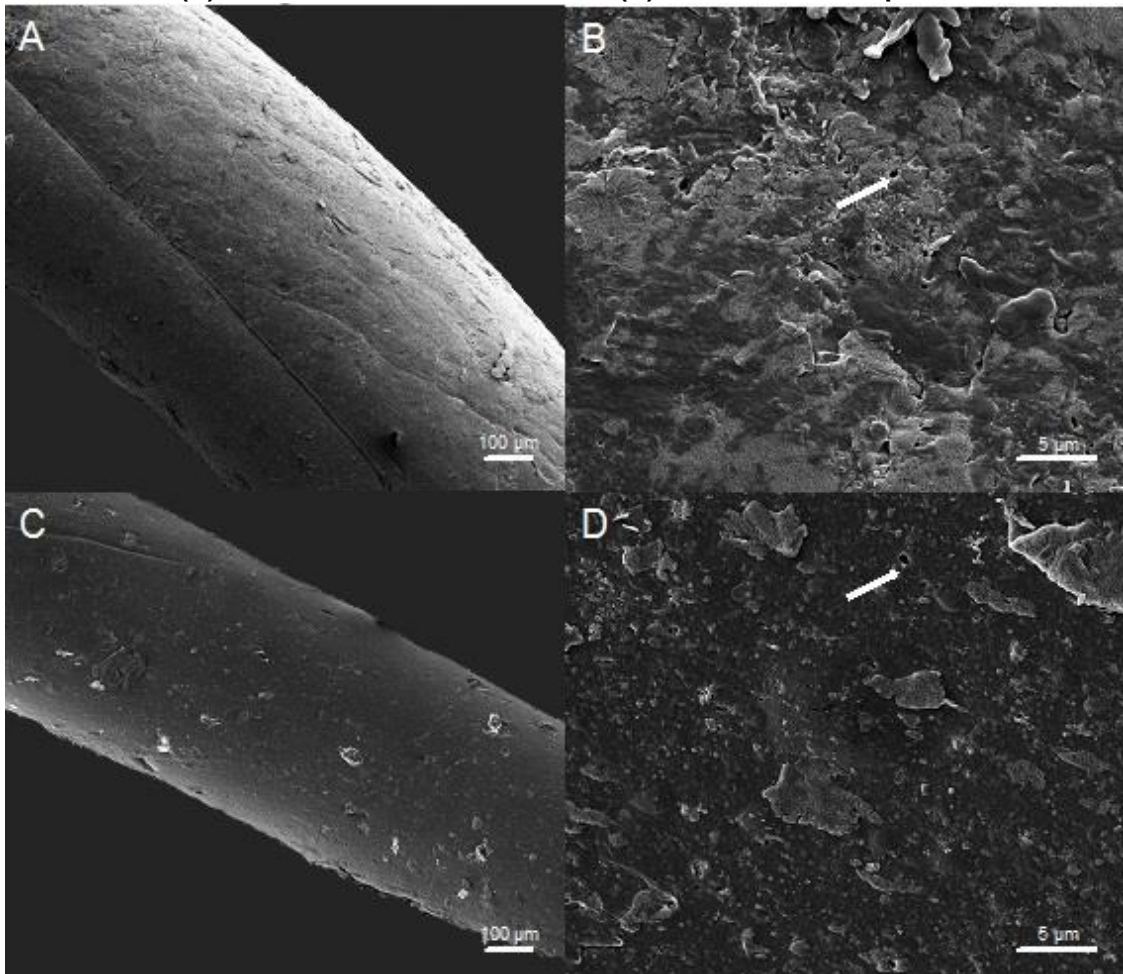
A **Figura 21** mostra a imagem obtida do implante de PLGA sem incubação (B0) em aumento de 150X(A) e aumento de 10000X(B). Pode-se observar que a superfície do implante não apresenta poros e possui apenas pequenas fissuras.

Figura 21 - Micrografias referentes à amostra B0 em aumento de 150 vezes (A) e em aumento de 10.000 vezes (B).



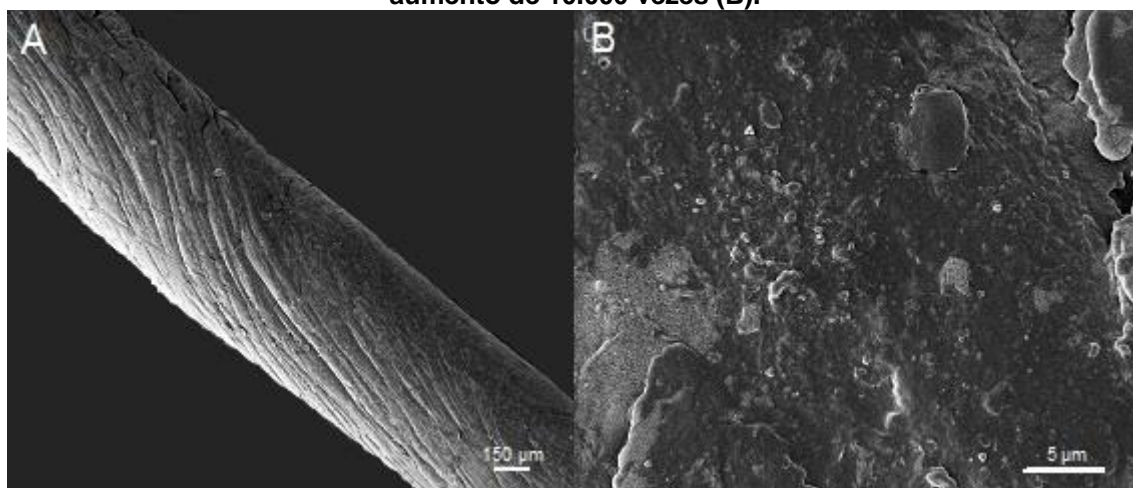
A **Figura 22** apresenta as MEV do implante de PLGA após 5 dias de incubação (B5) em aumentos de 300X (A) e 10000X (B) e do implante de PLGA após 8 dias de incubação (B8) também em aumentos de 300X (C) e 10000X (D). Pode-se observar que a superfície do implante B5 apresenta alguns poros. No implante B8 também são observados poros, mas não é possível afirmar que estão em maior quantidade que em B5, apesar do maior tempo de incubação. Também é possível verificar uma superfície mais lisa em B8 quando comparada a B5, que apresentou mais camadas na superfície. Isso indica maior degradação do implante de PLGA incubado por 8 dias quando comparado ao incubado por 5 dias.

Figura 22 - Micrografias referentes à amostra B5 em aumento de 300 vezes (A) e em aumento de 10.000 vezes (B). Micrografias referentes à amostra B8 em aumento de 300 vezes (C) e em aumento de 10.000 vezes (D). Poros indicados pelas setas.



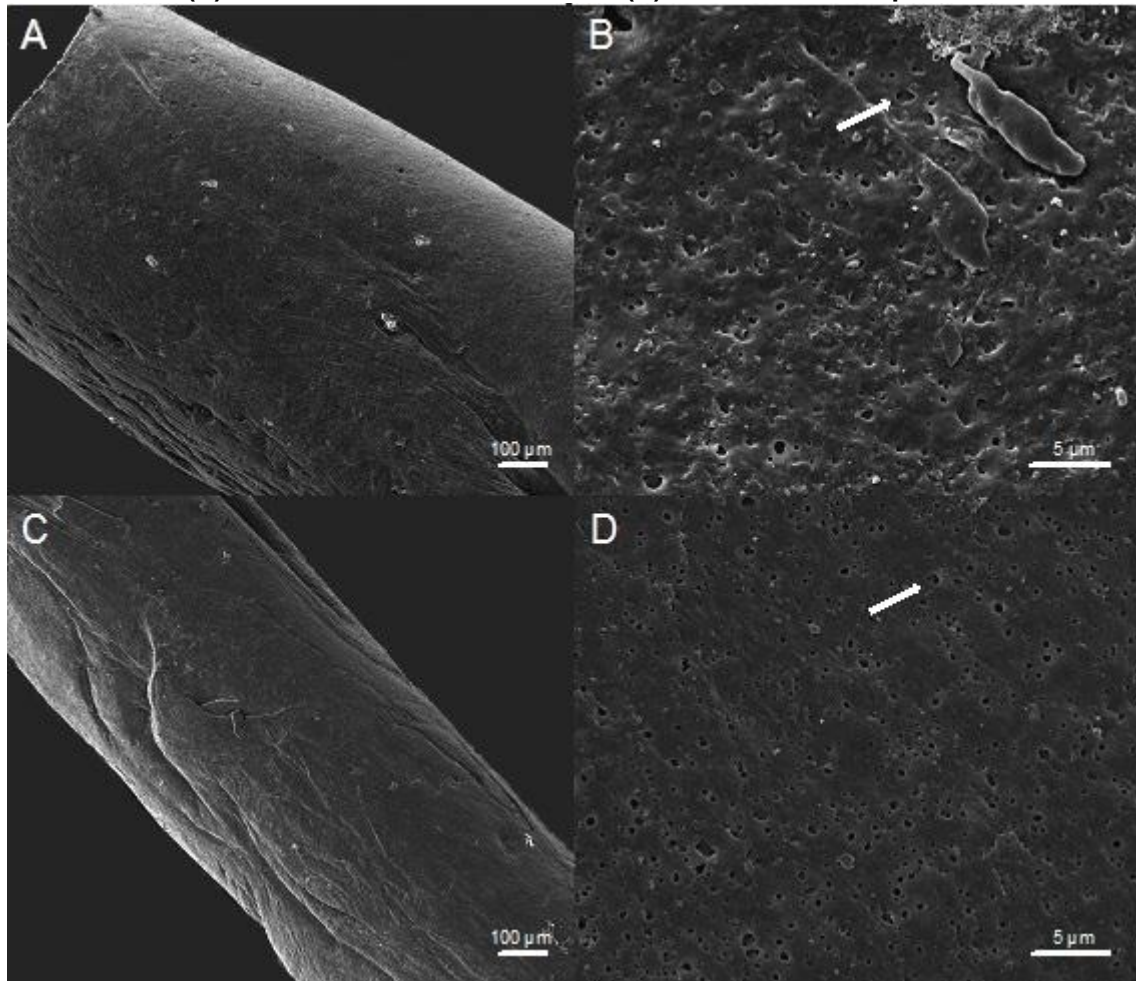
A **Figura 23** mostra a imagem obtida do implante composto de PLGA e losartan sem incubação (L0) em aumento de 150X(A) e aumento de 10000X(B). Pode-se observar que, assim como no implante de PLGA puro, a superfície do implante contendo fármaco não apresentou poros. Entretanto, é possível visualizar maiores fissuras. Sugere-se que isso ocorre devido ao modo de preparo, pois na moldagem a superfície dos sistemas contendo losartan tem maior contato com o calor devido a sua menor moldabilidade.

Figura 23 - Micrografias referentes à amostra L0 em aumento de 150 vezes (A) e em aumento de 10.000 vezes (B).



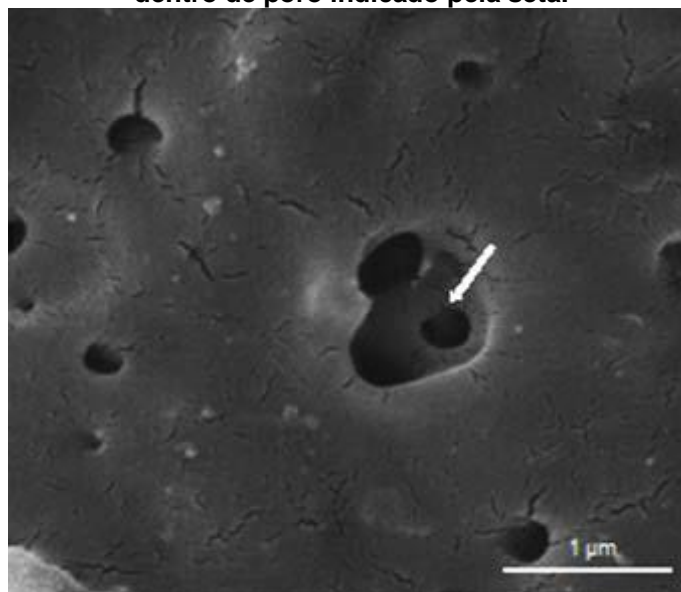
A **Figura 24** apresenta as fotos dos implantes de PLGA + losartan incubados por 5 (L5) e 8 (L8) dias, em aumentos de 300X (A e C) e 10000X (B e D). Pode-se observar que a superfície dos implantes apresenta poros e fissuras. De acordo com essas imagens é possível afirmar que L8 possui mais poros na superfície que L5, o que é compatível com o maior tempo de incubação. Os poros apresentaram-se homogeneamente dispersos. De acordo com os tipos de erosão polimérica descritos anteriormente, segundo Kimura e Ogura (2001), a difusão do fármaco por meio de canais e poros formados durante a degradação da matriz polimérica pode indicar uma hidrólise do tipo III.

Figura 24 - Micrografias referentes à amostra L5 em aumento de 300 vezes (A) e em aumento de 10.000 vezes (B). Micrografias referentes à amostra L8 em aumento de 300 vezes (C) e em aumento de 10.000 vezes (D). Poros indicados pelas setas.



Foram obtidas ampliações do material até 90000X, sendo possível visualizar poros dentro dos poros superficiais, formando canais (**Figura 25**). Esses canais, formados pela água, permitem a difusão do fármaco, conectando a superfície ao interior da matriz polimérica dos implantes.

Figura 25 - Micrografia referente à amostra L8 em aumento de 90000 vezes. Poro dentro de poro indicado pela seta.



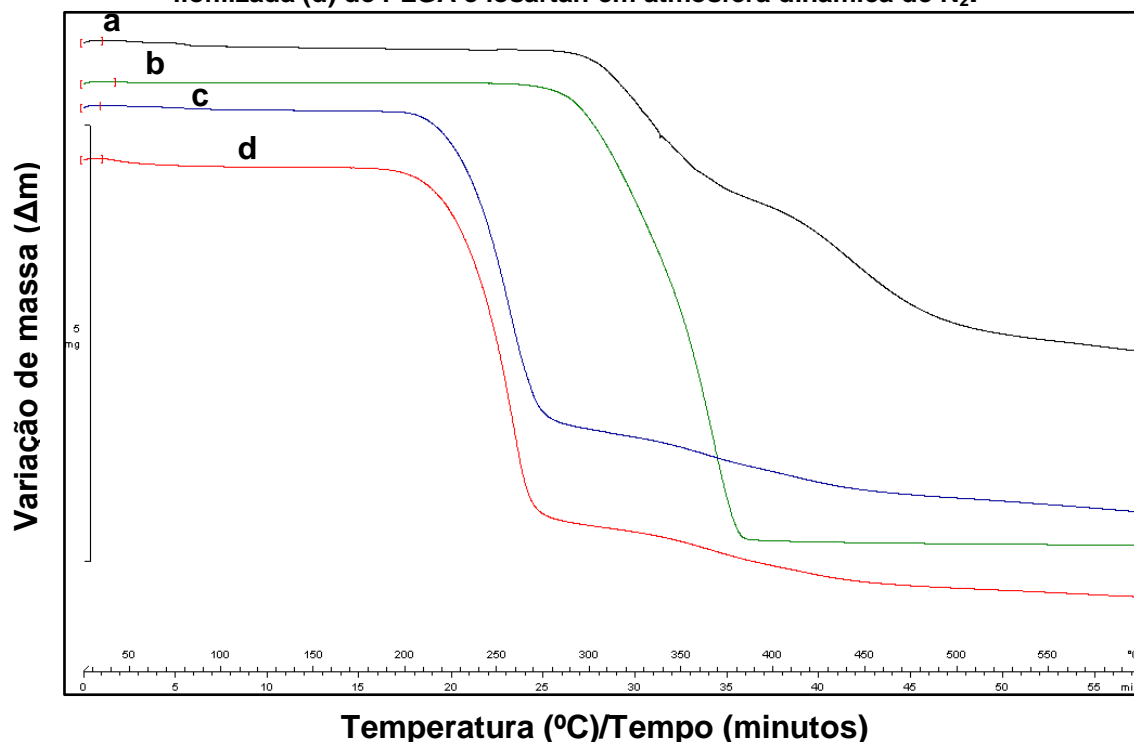
Concluindo, os implantes compostos por PLGA e losartan apresentaram uma superfície mais porosa que os implantes compostos apenas por PLGA, indicando maior grau de degradação dos mesmos. Também foi possível observar que nos implantes que apresentaram poros, estes estavam homogeneamente distribuídos.

6.6 Termogravimetria

As análises de TG foram utilizadas para avaliar a estabilidade do PLGA 75:25 e do losartan durante o processo de produção do implante, no qual ocorre um aquecimento a uma temperatura máxima de 120°C.

Na **Figura 26a** é possível observar uma perda de massa de 29,8% a partir de aproximadamente 276°C, correspondente à degradação do losartan. Sugere-se que a degradação ocorra em duas etapas, devido a segunda grande perda de massa (28,7%) observada na temperatura de 393°C. Após o aquecimento foi observada uma massa residual de 2,43 mg, sendo a massa inicial de 5,86 mg.

Figura 26 - Curva de TG do losartan (a), do PLGA (b), da mistura física (c) e da mistura liofilizada (d) de PLGA e losartan em atmosfera dinâmica de N₂.



Analisando a curva de TG do PLGA 75:25 (**Figura 26b**) observa-se a decomposição térmica em apenas um evento que ocorreu a partir de 265,6°C com perda total (98,3%) em até aproximadamente 542°C.

Na **Figura 26c**, a curva correspondente a mistura física demonstra uma decomposição em duas etapas, a primeira iniciando aproximadamente em 189°C e finalizando em 313 °C, com 70,7 % de perda de massa. A segunda etapa iniciando em aproximadamente 314 °C e finalizando em 599,5 °C, com 17,1 % de perda de massa. A curva correspondente a mistura liofilizada apresentou perfil semelhante, com uma primeira decomposição ocorrendo entre aproximadamente 184 °C e 294 °C com 72,9 % de perda de massa e a segunda decomposição entre 297 °C e 598°C com 14,8 % de perda de massa.

Pode-se observar nas **Figuras 26d e 26e** uma diminuição da estabilidade térmica tanto do PLGA quanto do losartan, visto que houve uma diminuição da temperatura em que ocorre o início da decomposição na amostra com fármaco (188,8 °C) quando comparada à temperatura de início de decomposição do PLGA puro (265,6°C). Esse fato é observado tanto na curva correspondente a

mistura física quanto na curva da mistura liofilizada. Sugere-se que isso ocorra devido a desestabilização das cadeias poliméricas de PLGA pela interposição das moléculas de losartan entre elas. Essa desestabilização pode ocorrer devido à interação do átomo de hidrogênio, presente no grupo funcional hidróxila do losartan, com o átomo de oxigênio presente no grupo funcional carbonila do PLGA, provavelmente por interação de hidrogênio. Esses dados podem ser melhor visualizados na **Tabela 15**.

Tabela 15 – Eventos térmicos das análises termogravimétricas de losartan, PLGA, mistura física e mistura liofilizada (PLGA + losartan)

Amostra	Início do evento térmico (°C)	Perda de massa (%)
Losartan	276	29,8
	393	28,7
PLGA	265,6	98,3
Mistura física (losartan + PLGA)	188,8	70,7
	313,7	17,1
Mistura liofilizada (losartan + PLGA)	183,7	72,9
	297,2	14,8

A análise de TG também demonstra que não foram observados eventos térmicos em baixas temperaturas na curva da mistura liofilizada, isso sugere que o preparo da mistura liofilizada foi adequado, sem a presença de solvente residual. Além disso, as curvas de TG do PLGA e do losartan demonstram que o início da degradação acontece em temperaturas superiores à aplicada para o preparo dos implantes.

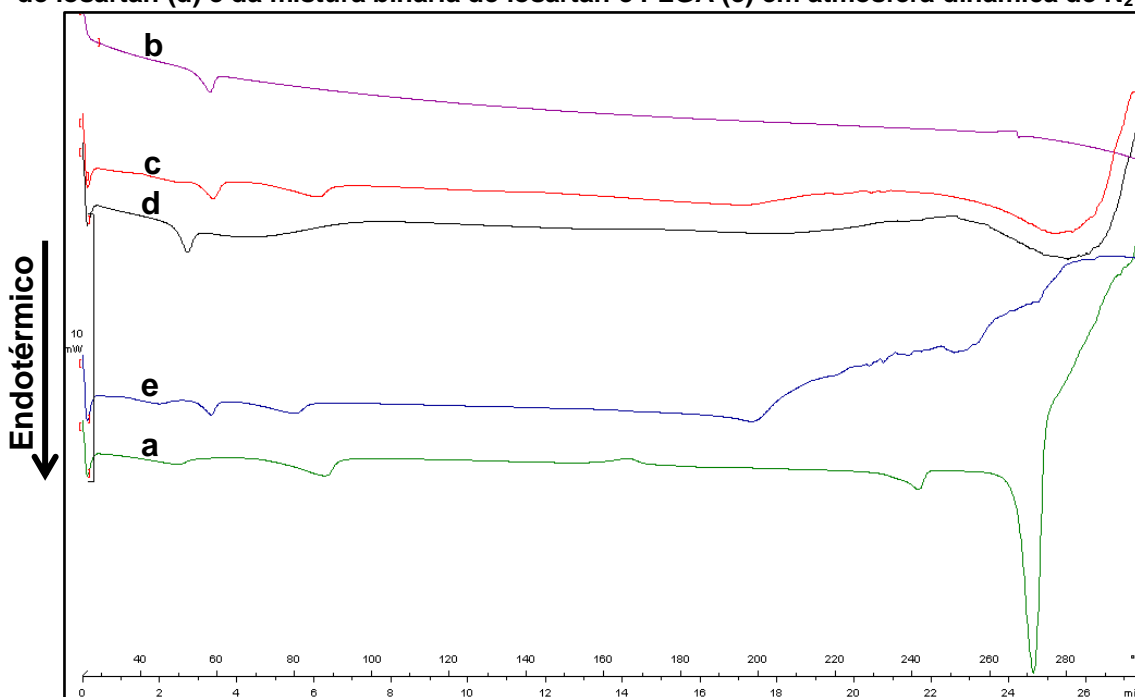
6.7 Calorimetria exploratória diferencial

O DSC fornece informações quantitativas e qualitativas sobre mudanças endotérmicas, exotérmicas e na capacidade de calor como uma função da

temperatura e do tempo (por exemplo, temperatura de transição vítrea, fusão e pureza). Ela pode ser utilizada para avaliar a compatibilidade entre fármaco e excipientes e a possibilidade de interação entre eles. Presume-se que as propriedades térmicas das misturas serão a soma dos componentes individuais, caso não existam interações entre os componentes (CLAS et al., 1999).

Na **Figura 27a**, correspondente ao losartan, é possível observar em 270°C um pico endotérmico correspondente ao ponto de fusão, que está de acordo com o descrito por Raghavan e colaboradores (1993), seguido da decomposição em aproximadamente 280°C. A decomposição é confirmada pela perda de massa observada na curva de TG. Também é descrito na literatura o pico com “onset” em 235°C como transição polimórfica da forma I para forma II do losartan. (RAGHAVAN et al., 1993; WU et al., 1993).

Figura 27 - Curva de DSC do losartan puro (a), do PLGA (b), da mistura física contendo 75% de PLGA e 25% de losartan (c), da mistura liofilizada contendo 75% de PLGA e 25% de losartan (d) e da mistura binária de losartan e PLGA (e) em atmosfera dinâmica de N₂.



A amostra de PLGA puro (**Figura 27b**) exibe um evento endotérmico, que se inicia em 55°C, correspondente à temperatura de transição vítrea. Não foi observado ponto de fusão, visto que o PLGA apresenta natureza amorfa. Isso está de acordo com o descrito por Mainardes e colaboradores (2006).

Na **Figura 27c** é possível observar que o pico correspondente à transição vítrea do PLGA permanece na mistura física de PLGA e losartan (75 e 25%, respectivamente), com o evento endotérmico iniciando em aproximadamente 55°C. O pico característico da fusão do losartan não foi identificado na curva correspondente à mistura física.

Na **Figura 27d**, correspondente a mistura liofilizada, o mesmo perfil da mistura física é observado, sendo que o pico correspondente à transição vítrea do PLGA foi observado em aproximadamente 50°C. Essas observações indicam alguma forma de interação entre as duas substâncias, levando a perda de estabilidade da mistura losartan/PLGA em altas temperaturas. Para confirmar a suspeita, descartando a possibilidade do desaparecimento do pico de fusão do losartan ser devido a sua menor proporção na mistura, foi realizada análise de uma mistura física binária de losartan e PLGA, visualizada na **Figura 27e**. De acordo com essa análise, as suspeitas de interação foram confirmadas, tendo em vista que o pico de fusão do losartan também não foi observado na curva correspondente à mistura binária. Considerando os grupos funcionais do PLGA e do losartan é possível que essa interação seja devido a ligações de hidrogênio. Entretanto, essa perda de estabilidade não influenciou no desenvolvimento dos sistemas, sendo que o losartan foi liberado dos implantes e o pico correspondente foi detectado inalterado por CLAE em até 3 meses de liberação. Os dados de DSC podem ser melhor visualizados na **Tabela 16**.

Tabela 16 – Eventos térmicos das análises de DSC para losartan, PLGA, mistura física e mistura liofilizada (PLGA 75% + losartan 25%) e mistura binária de losartan e PLGA.

Amostra	Temperatura de onset (°C)	Atribuição
Losartan	235	Transição polimórfica
	270	Ponto de fusão
	280	Decomposição
PLGA	55	Transição vítrea
Mistura física (losartan 25% + PLGA 75%)	55	Transição vítrea (PLGA)
	250	Decomposição
Mistura liofilizada (losartan 25% + PLGA 75%)	50	Transição vítrea (PLGA)
	250	Decomposição
Mistura binária (losartan + PLGA)	55	Transição vítrea (PLGA)
	200	Decomposição

6.8 Espectroscopia na região do infravermelho

A radiação infravermelha na faixa aproximada de 10.000 cm^{-1} a 100 cm^{-1} converte-se, quando absorvida por uma molécula orgânica, em energia de vibração molecular. Embora o espectro no infravermelho seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independente da estrutura da molécula. É justamente a presença dessas bandas características de grupos que permite a obtenção, por meio do exame do espectro e consulta a tabelas, de informações estruturais úteis e identificação de estruturas (SILVERSTEIN et al., 2006).

Pela análise do espectro no infravermelho de uma mistura de duas ou mais substâncias é possível verificar a presença, ausência ou aparecimento de grupos funcionais quando comparado a substância pura. Isso possibilita

identificar se ocorrem interações entre misturas e caracterizar substâncias puras.

Na **Figura 28** é possível observar o espectro no infravermelho do losartan. As respectivas atribuições dos grupos funcionais estão descritas na **Tabela 17**. As bandas de absorção no infravermelho correspondem as descritas no Spectral Database for Organic Compounds (site acessado em 25/01/2012) para esse fármaco.

Figura 28 - Espectro de infravermelho da amostra de losartan.

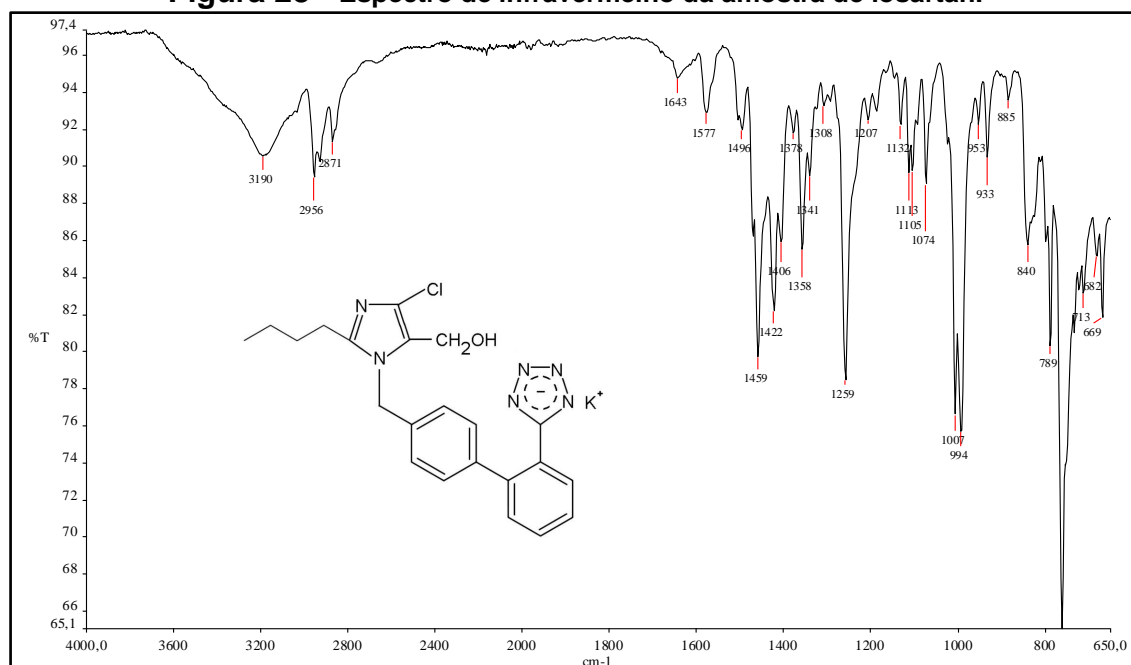


Tabela 17 - Bandas de absorção referentes à amostra de losartan.

Número de onda (cm ⁻¹)		Atribuição
Literatura	Experimental	
3198	3190	O-H em ligação intermolecular
2957	2956	
2871	2871	
1577	1577	N-H amina secundária
1450	1459	C=C aromático
1259	1259	C-N aromático
1132	1132	C-O de álcool
841	840	C-H aromático
789	789	C-H aromático
669	669	C-Cl

Na **Figura 29** é possível observar o espectro no infravermelho do PLGA e as atribuições das respectivas bandas de absorção estão descritas na **Tabela 18**, segundo Porjazosca e colaboradores (2004).

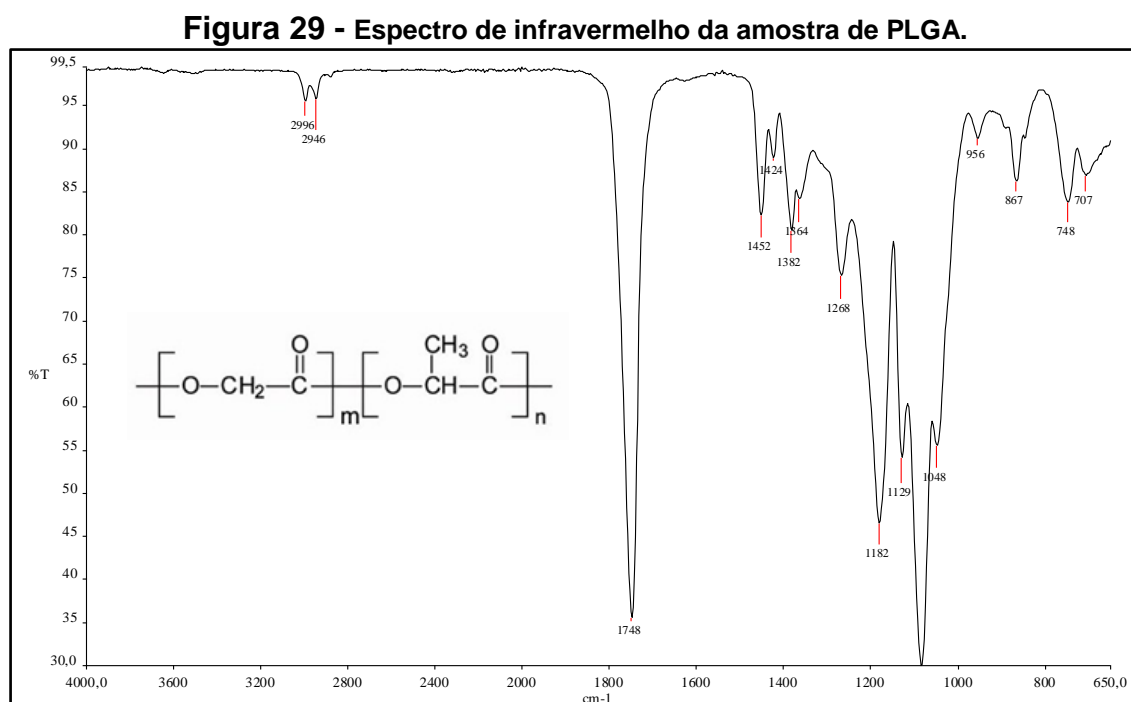


Tabela 18 - Bandas de absorção referentes à amostra de PLGA.

Número de onda (cm ⁻¹)		Atribuição
Literatura	Experimental	
2997	2996	CH ₂
2965	2946	CH ₃
1759	1748	C=O éster
1450-1360	1456	CH ₃
1450-1360	1424	CH ₃
1450-1360	1382	CH ₃
1450-1360	1364	CH ₃
1.300-1.050	1182	C-O éster
750	748	C-H

O espectro correspondente à mistura de losartan e PLGA liofilizada está representado na **Figura 30**, com as atribuições das respectivas bandas de absorção na **Tabela 19**. É possível observar apenas as bandas correspondentes ao PLGA. Isso ocorre possivelmente pela proporção de

losartan presente na mistura, apenas 25%, o que leva a diminuição da intensidade das bandas correspondentes ao fármaco no espectro no infravermelho. Em relação às bandas correspondentes ao PLGA no espectro da mistura de losartan e PLGA liofilizada, não é observada qualquer mudança espectral significativa. Com a finalidade de se confirmar essa hipótese, foi realizada a análise de uma mistura física binária (contendo 50% de PLGA e 50% losartan) (**Figura 31 e Tabela 20**).

Figura 30 - Espectro de infravermelho da mistura liofilizada de losartan e PLGA.

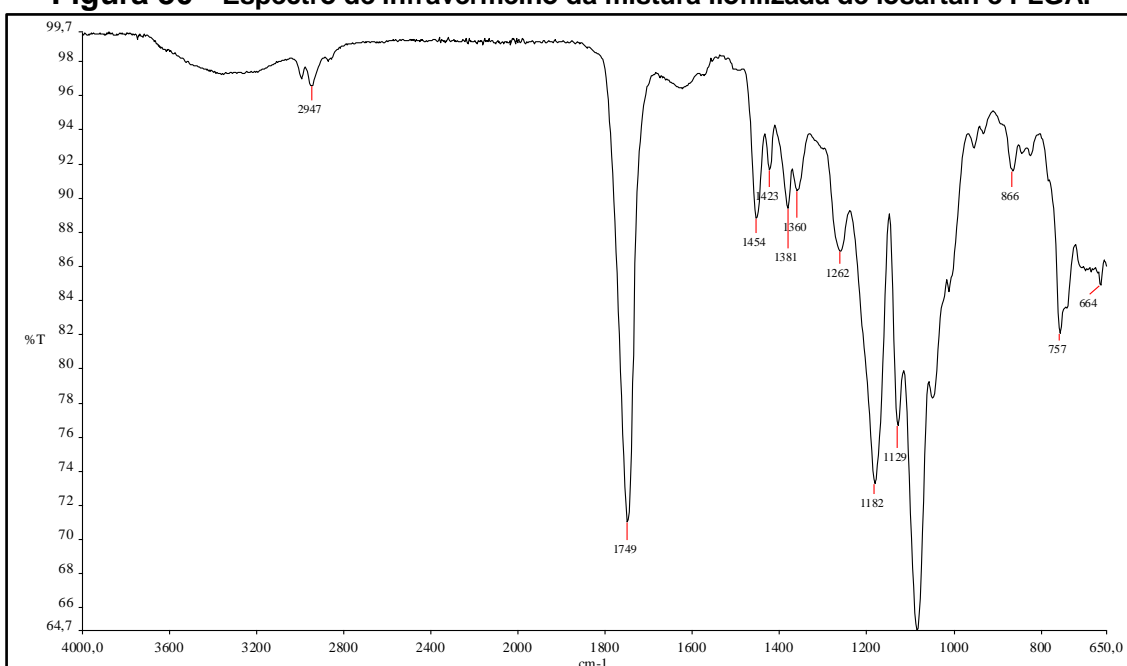
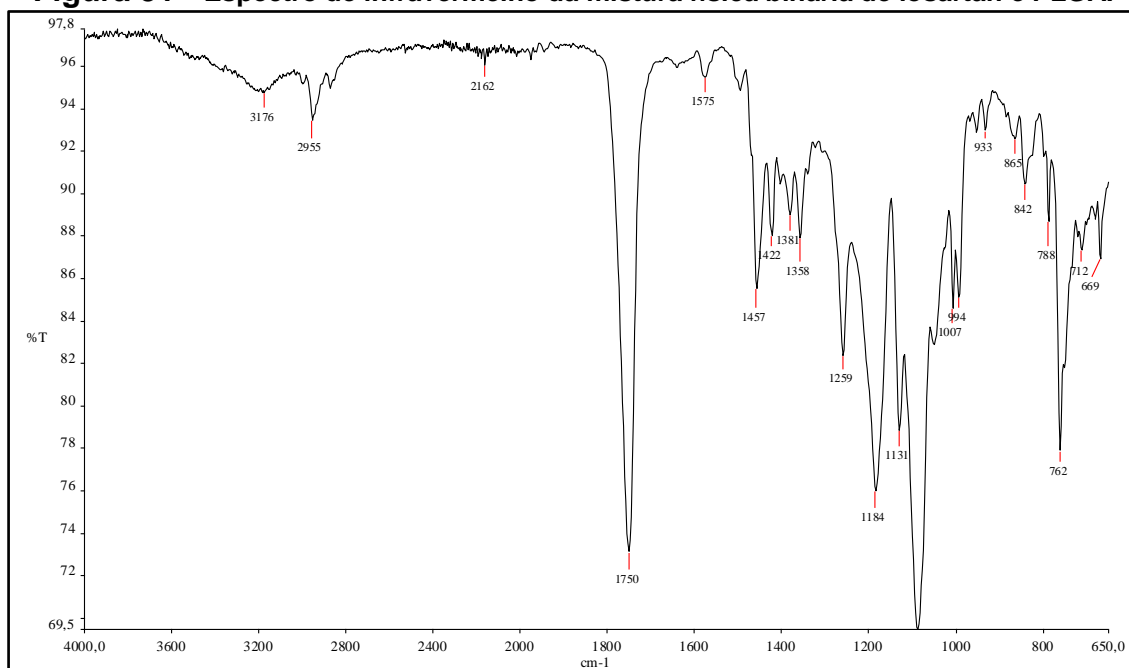


Tabela 19 - Bandas de absorção referentes à mistura de losartan e PLGA liofilizada.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
2947	CH ₃
1749	C=O éster
1454	CH ₃
1423	CH ₃
1381	CH ₃
1182	C-O éster
757	CH ₃

Figura 31 - Espectro de infravermelho da mistura física binária de losartan e PLGA.**Tabela 20 - Bandas de absorção referentes à mistura física binária de losartan e PLGA.**

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Substância correspondente
3176	O-H em ligação intermolecular	Losartan
2955	C-H alifático	Losartan
1750	C=O éster	PLGA
1575	N-H amina secundária	Losartan
1457	CH ₃	PLGA
1259	C-N aromático	Losartan
1422	CH ₃	PLGA
1381	CH ₃	PLGA
1131	C-O de álcool	Losartan
842	C-H aromático	Losartan
788	C-H aromático	Losartan
669	C-Cl	Losartan

De acordo com a **Figura 31**, a hipótese do desaparecimento das bandas correspondentes aos grupos funcionais do losartan na mistura liofilizada devido a sua presença em menor proporção foi confirmada. É possível observar na **Tabela 20** as atribuições das bandas de absorção para grupos correspondentes ao PLGA e ao losartan. Isso sugere que não houve interação química entre as duas substâncias.

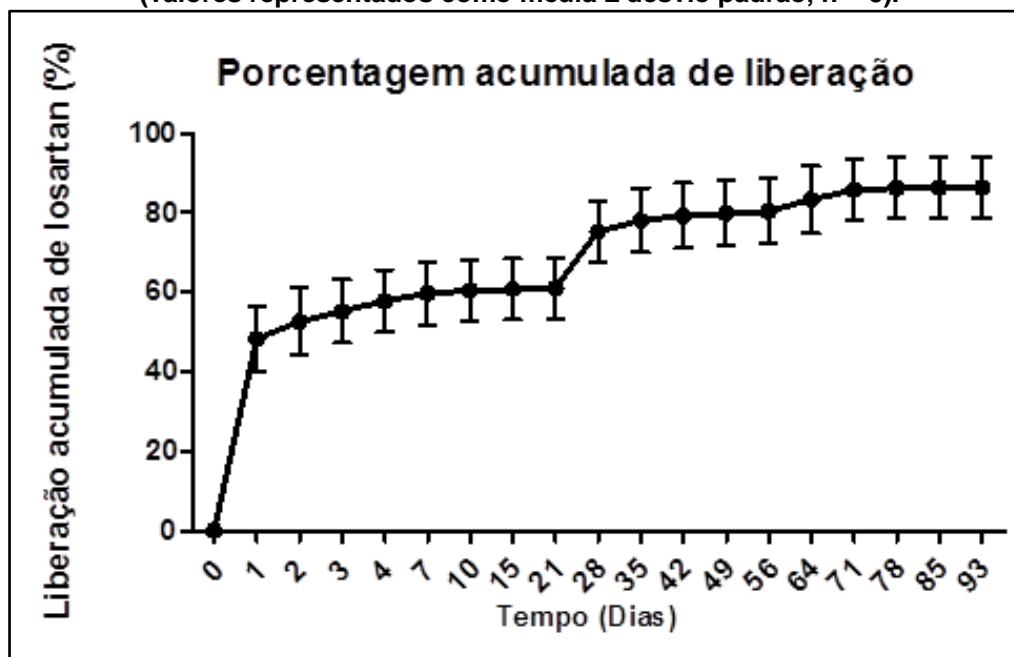
6.9 Estudo de liberação *in vitro*

O teste foi realizado obedecendo às condições *sink*, que preconiza a utilização de um volume não inferior a 3 vezes o necessário para formar uma solução saturada do fármaco, sendo que a solubilidade do losartan em água é 3,3 mg/mL (BONFILIO et al., 2010). O peso médio com desvio padrão dos implantes utilizados no teste de liberação foi de $1,70 \pm 0,04$ mg. Dessa forma, foi utilizado um frasco contendo 2 mL de PBS para determinação da liberação de cada implante.

De acordo com o teste de determinação do teor de losartan nos implantes, a porcentagem de fármaco contida em cada implante foi padronizada em 22,1% p/p. Já o peso médio, conforme citado acima, foi de 1,70 mg. Assim, 22,1% de cada implante correspondem a 375,7 μ g de losartan em cada implante, sendo essa a quantidade máxima que poderia ser liberada de cada implante e que foi utilizada nos cálculos do teste de liberação *in vitro*.

Considerando-se os dados descritos foi possível construir um gráfico expressando a liberação acumulada de losartan em função do tempo em dias (**Figura 32**).

Figura 32 - Porcentagem de liberação acumulada de losartan a partir dos implantes (valores representados como média \pm desvio padrão, n = 5).



De acordo com o gráfico houve uma significativa liberação de losartan a partir dos implantes.

Esses dados indicam um perfil de liberação trifásico. Nos primeiros dias observa-se uma grande liberação do fármaco (aproximadamente 50%), uma parte possivelmente em função da quantidade depositada na superfície dos implantes. Nos dias seguintes é visualizada uma segunda etapa, controlada pela velocidade de degradação do polímero, na qual ocorre menor e constante liberação do fármaco por mecanismos de difusão pelos poros inicialmente presentes na matriz e pelos novos canais formados durante o processo de degradação do polímero. Por fim ocorrem inchaço e erosão do polímero (a partir de 21 dias), originando uma terceira etapa onde a taxa de liberação do fármaco aumenta devido à desintegração da matriz polimérica. Este resultado foi semelhante aos descritos sobre a liberação de outros fármacos em matrizes de polímeros biodegradáveis (FREDENBERGA et al., 2011; KUNOU et al., 1995).

De acordo com Lee e colaboradores (2010) a liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos construídos de PLGA ocorre em três etapas:

- **“Burst”**: ocorre liberação do fármaco a partir da superfície do implante, criando um curto período de liberação elevada.
- **Difusão e quebra das cadeias**: ocorre liberação do fármaco por difusão, que é controlada pela solubilidade inerente do fármaco no meio de incubação. Ocorre a quebra aleatória do polímero por clivagem hidrolítica, o que aumenta a porosidade e área de superfície para a difusão do fármaco.
- **Biodegradação e perda de massa**: nessa etapa a liberação do fármaco é associada com a biodegradação da matriz polimérica, a perda de massa do implante e um “burst” final em alguns sistemas de liberação.

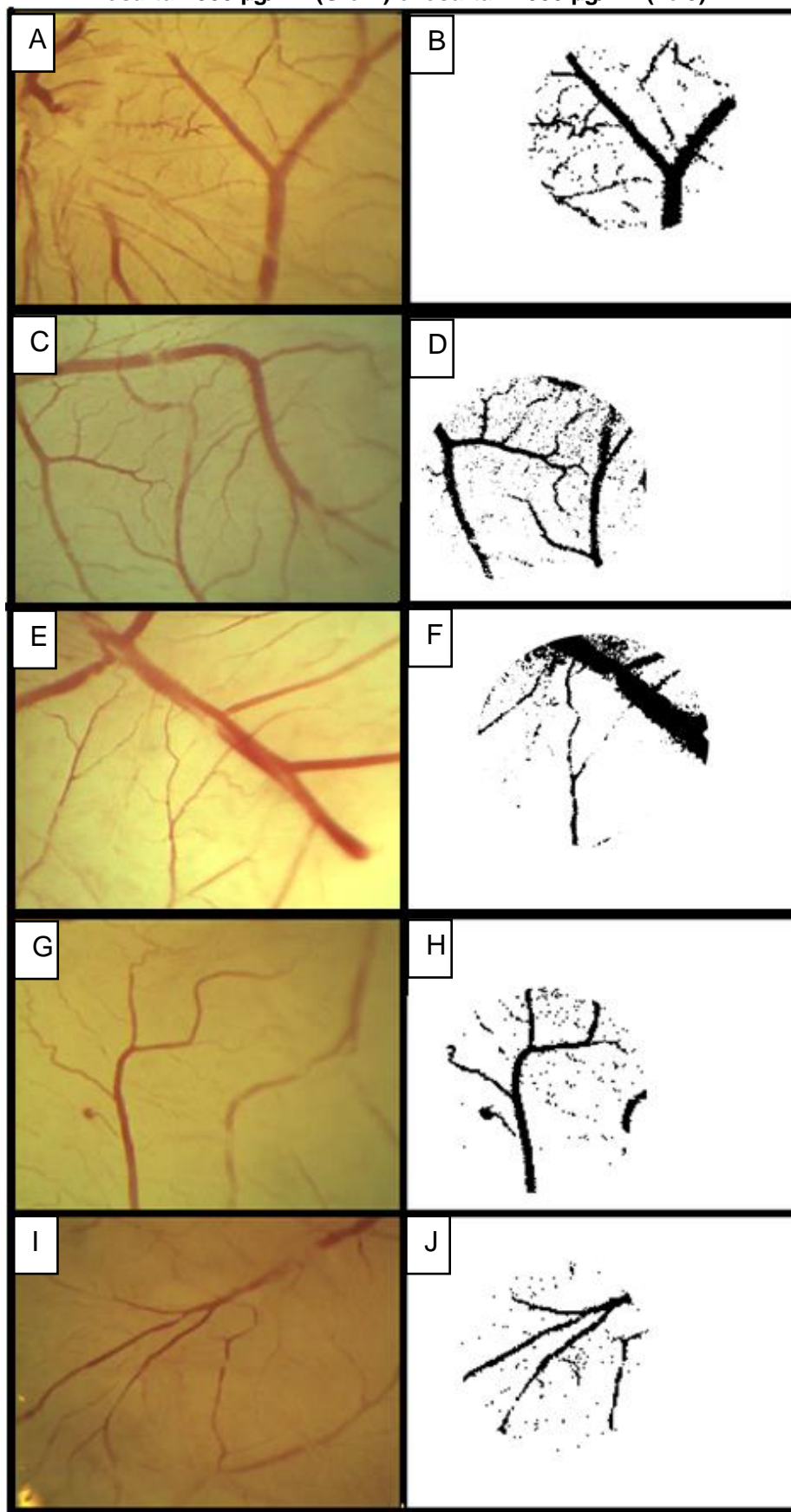
Ainda, segundo Hasirci (2001) apud Saliba (2007), a hidrólise é o principal fator que leva a clivagem e a degradação das cadeias poliméricas. Ela ocorre de forma dependente à variação de pH, temperatura, composição química, presença de solventes e enzimas catalíticas. Dessa forma, variações de pH, temperatura, enzimas presentes no humor aquoso, entre outros fatores, podem levar a um perfil de liberação *in vitro* dos implantes diferente do perfil *in vivo*.

Resumidamente os sistemas poliméricos constituídos de PLGA e losartan apresentaram o perfil de liberação trifásico em conformidade com o descrito na literatura. Os resultados também sugerem um perfil característico de liberação prolongada, sendo que após 10 semanas ainda foi observada liberação do fármaco. Ainda, o elevado “burst” inicial (aproximadamente 50%) não é interessante, sendo necessárias adequações no preparo dos implantes para modificar esse perfil. Novos estudos serão realizados no sentido de confirmar os resultados de liberação *in vitro* obtidos. Para correção dessa liberação duas possíveis alternativas são a variação na proporção de PLGA e de losartan em cada implante ou a variação na composição do PLGA 75:25 utilizado para PLGA 50:50 ou 85:15.

6.10 Ensaio de angiogênese na membrana corioalantóica de embrião de galinha

As fotos das MCA dos tratamentos realizados (PBS, implante de losartan 25%, losartan 250 µg/mL, losartan 500 µg/mL e 1000 µg/mL), após fixação com formaldeído e processamento das imagens utilizando o programa ImageJ, estão apresentadas na **Figura 33**. Após o processamento, a área dos vasos foi quantificada em função do número de pixels.

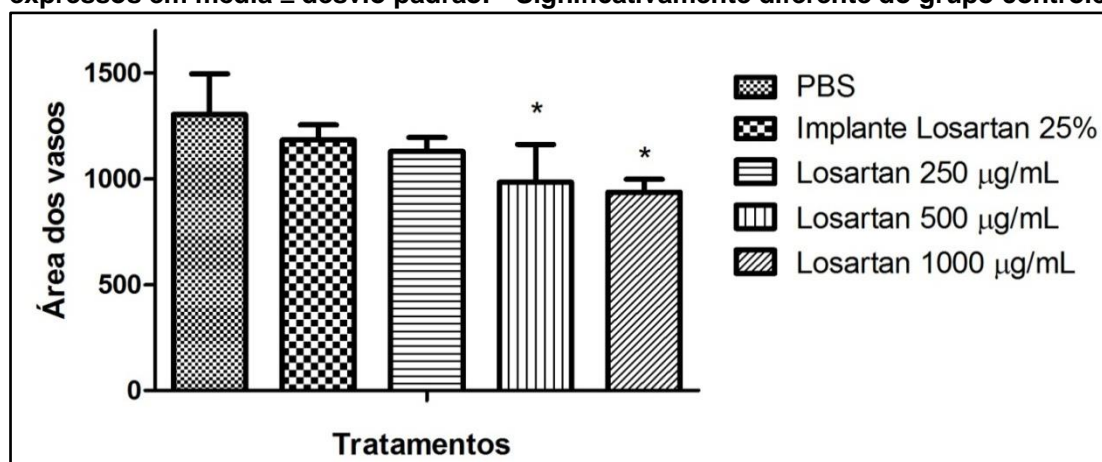
Figura 33 - Fotos das MCAs e imagens processadas referentes ao tratamento com PBS (A e B), implante de losartan 25% (C e D), losartan 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (E e F), losartan 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (G e H) e losartan 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (I e J).



De acordo com a **Figura 33** não foi observada neovascularização, resposta inflamatória aguda nem lise vascular nas MCA, indicando que tanto o losartan (500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$) quanto o PBS não levaram a irritação da membrana. Esses resultados também foram observados para os grupos tratados com implantes de losartan 25% e solução de losartan 250 $\mu\text{g/mL}$.

O resultado da medida quantitativa da área relativa aos vasos por meio do número de pixels está representado na **Figura 34**. É possível observar que ocorreu inibição estatisticamente significativa da área dos vasos dos grupos de losartan 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$ comparados com o grupo de PBS (controle).

Figura 34 - Ensaio de angiogênese utilizando a membrana corioalantóica realizado com PBS (controle), losartan (250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$) e implante contendo 25% de losartan. Foram utilizados para cada grupo 8 embriões e os resultados expressos em média \pm desvio padrão. * Significativamente diferente do grupo controle.



O tratamento com losartan na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$ promoveu, respectivamente, uma redução de 24,6% e 25,1% da área dos vasos em relação ao grupo controle (PBS). Não houve diferença estatisticamente significativa na resposta obtida entre os dois grupos tratados. Já a aplicação de soluções de losartan na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ e dos implantes contendo 25% de losartan não levou a redução estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

A neovascularização é um importante processo da formação cicatricial. Koch e colaboradores (2006) descreveram a cicatrização de feridas como um processo

altamente complexo, composto por fases que se sobrepõem como inflamação, angiogênese, formação de matriz e epitelização. No processo cicatricial indesejável após a cirurgia filtrante de glaucoma não é diferente, conforme citado por Khaw e colaboradores (1994), a cicatriz observada em pacientes após cirurgia de filtração ocorre com formação de novos vasos na região da intervenção.

Receptores para All estão presentes nas células endoteliais, onde a All age estimulando o seu crescimento e regulando a expressão de mRNA de VEGF. Devido à angiotensina II induzir um aumento na produção de VEGF, este peptídeo pode aumentar localmente a permeabilidade e alterar a função de microvasos na retina (LONCHAMPT et al., 2001).

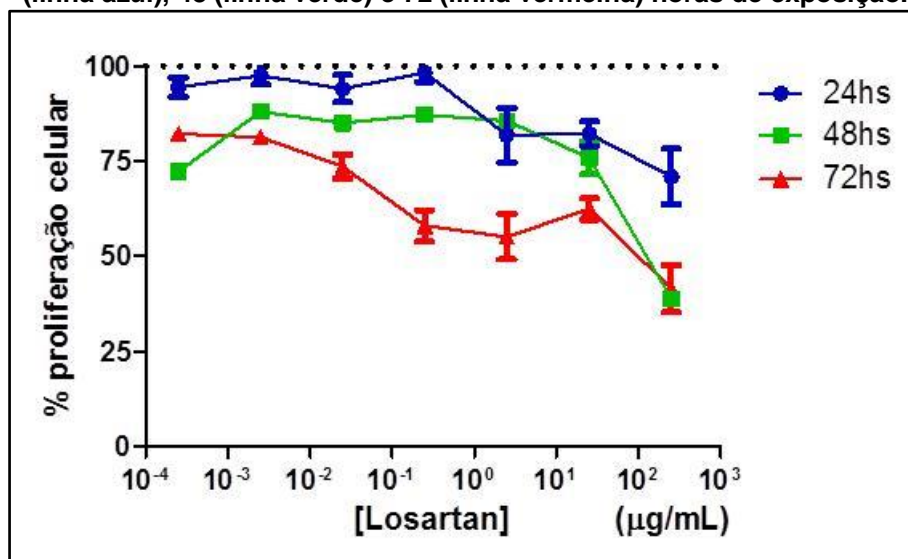
Dessa forma, a ação antiangiogênica do losartan observada no teste com a MCA pode ser benéfica para inibir a formação de novos vasos na área do procedimento em pacientes submetidos à cirurgia filtrante de glaucoma.

6.11 Avaliação *in vitro* da atividade do losartan em fibroblastos

6.11.1 Curva dose-resposta de losartan

Com a finalidade de verificar a atividade inibitória do losartan sobre o crescimento celular, fibroblastos extraídos da pálpebra superior de pacientes foram mantidos em cultura, em meio DMEM completo, na presença de concentrações crescentes de losartan ou na ausência do estímulo farmacológico. Após 24, 48 e 72 horas, foi adicionado MTT às culturas celulares e realizada a detecção do metabólito formazan no sobrenadante de cultura por espectrofotometria, a 595 nm. Foi calculada a porcentagem de proliferação celular para cada concentração de losartan e para cada tempo de cultura. Os valores representam a média das percentagens de proliferação \pm desvio padrão de 9 poços para cada concentração de losartan avaliada.

Figura 35 – Redução da proliferação de fibroblastos por exposição ao losartan após 24 (linha azul), 48 (linha verde) e 72 (linha vermelha) horas de exposição.



De acordo com a **Figura 35**, ocorreu redução significativa da proliferação de fibroblastos no teste realizado com 24 horas apenas em concentrações mais elevadas. Ainda segundo a **Figura 35**, os perfis das curvas correspondentes aos testes de 48 e 72 horas apresentaram queda significativa da proliferação de fibroblastos. Essa inibição foi proporcional ao aumento da concentração de losartan, sendo que no gráfico correspondente ao teste de 72 horas essa inibição foi mais pronunciada, exceto para os extremos da curva.

De acordo com o perfil correspondente a 48 de exposição (**Figura 35**), o losartan apresentou atividade inibitória de fibroblastos em todas as concentrações avaliadas, sendo que a partir da concentração de 25 µg/mL a inibição foi mais pronunciada. Para curva de 72 horas essa inibição maior aparece a partir de 0,025 µg/mL de losartan, sendo que também foi observada atividade em todas as concentrações avaliadas. De acordo com as curvas, a inibição da proliferação celular de fibroblastos foi dependente da concentração e do tempo, aumentando claramente em concentrações e tempos maiores avaliados. Outro ponto interessante é a inibição em baixas concentrações, visto que no teste de liberação realizado para os implantes contendo losartan, durante o período de liberação caracterizado pela difusão do fármaco onde ocorre baixa liberação, o losartan era liberado em concentrações superiores a

0,025 µg/mL (concentração com atividade mais pronunciada), sendo promissora sua utilização com a finalidade de inibir a proliferação de fibroblastos.

Marshall e colaboradores (2000) demonstraram a presença de receptores AT1 em fibroblastos humanos por imunocitoquímica indireta e também identificaram atividade inibitória do losartan, antagonista específico desse receptor, pelo método de contagem de células.

Zhang e colaboradores (2003) descreveram a atividade inibitória de losartan em células hepáticas miofibroblásticas. Em testes por MTT eles observaram atividade inibitória dessas células em concentrações de losartan entre 10^{-8} e 10^{-6} mol/L (equivalente a 0,46 µg/mL).

A atividade inibitória de proliferação celular de fibroblastos no teste de 24 horas foi reduzida, provavelmente, devido ao tempo necessário para o início da ação do losartan. Isso foi descrito por Weber e Brilla (1991), ressaltando que trata-se de uma sugestão teórica, visto que o modelo proposto por esses autores não são com fibroblastos de tecidos oculares.

6.11.2 Avaliação da inibição de fibroblastos pelos implantes contendo losartan

Contagem de células

Os implantes não apresentaram inibição estatisticamente significativa pelo método de contagem de células após 24 e 48 horas de acordo com as **Figuras 36 e 37**.

Figura 36 - Ensaio de inibição de fibroblastos por contagem realizado com células (controle), implantes de PLGA branco e contendo losartan (25%) para 24 horas de exposição.

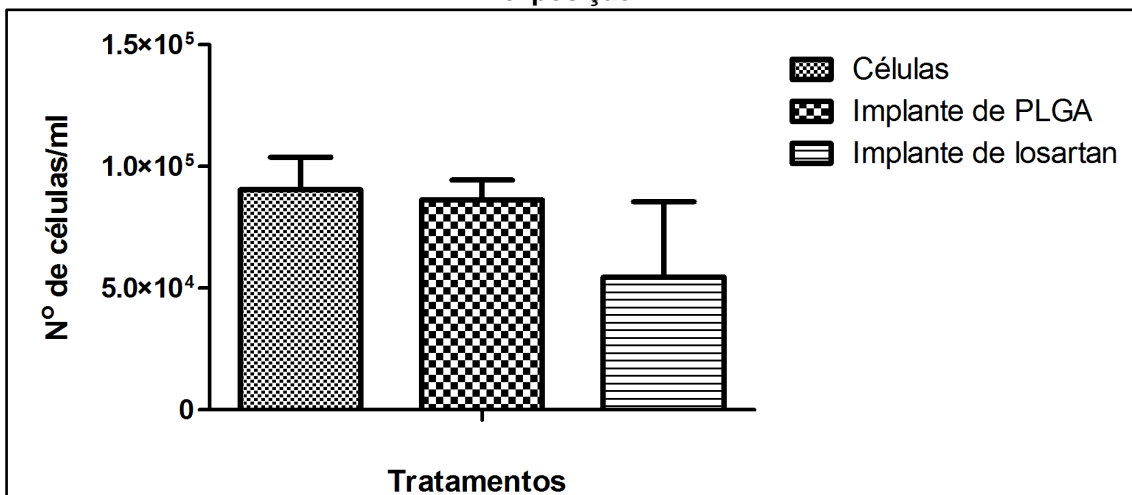
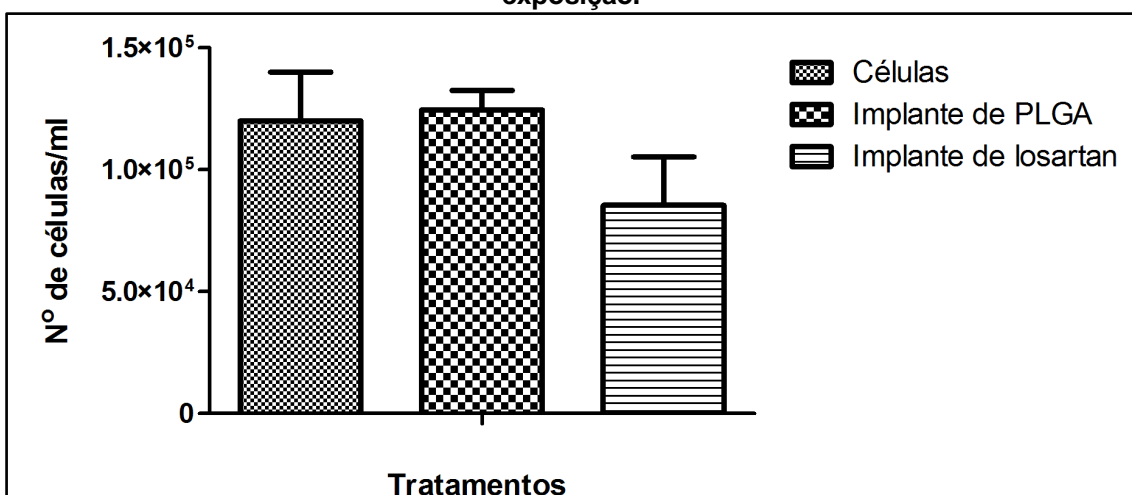
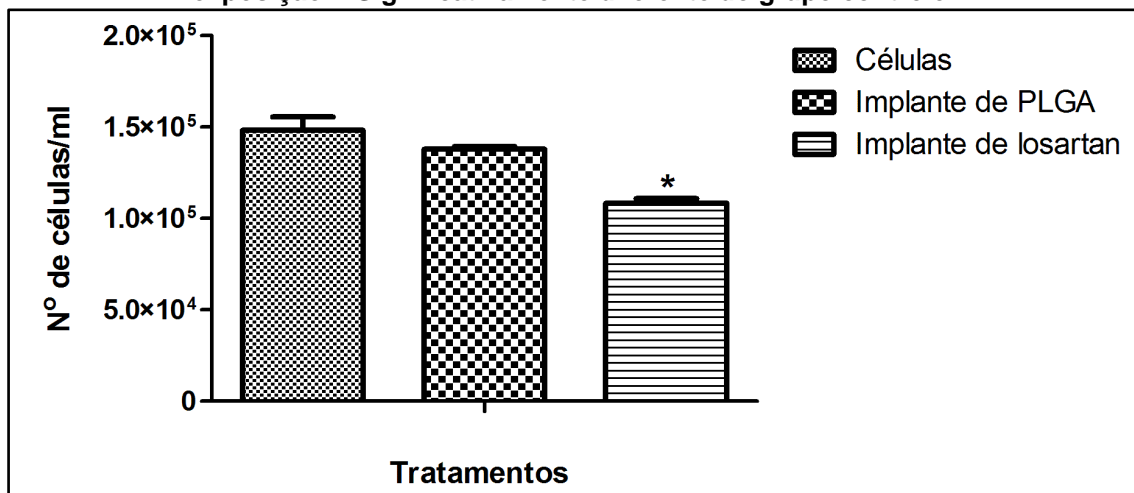


Figura 37 - Ensaio de inibição de fibroblastos por contagem realizado com células (controle) e implantes de PLGA branco e contendo losartan (25%) para 48 horas de exposição.



De acordo com a **Figura 38**, ocorreu inibição estatisticamente significativa após 72 horas de tratamento. Os implantes contendo losartan apresentaram redução de 21,5% do número de células em relação aos grupos do implante branco e de 27,0% em relação ao grupo controle de células.

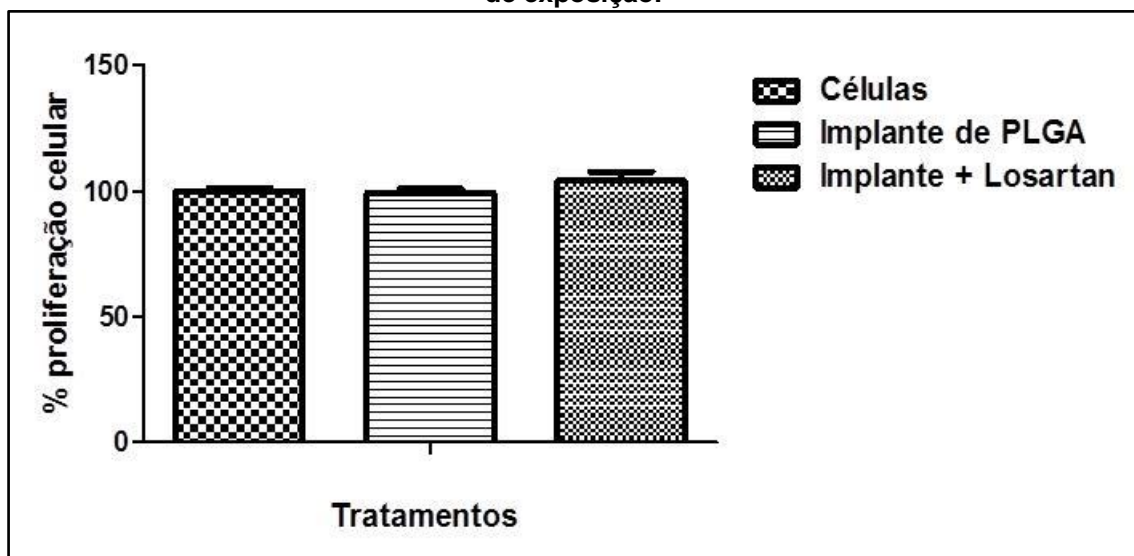
Figura 38 - Ensaio de inibição de fibroblastos por contagem realizado com células (controle) e implantes de PLGA branco e contendo losartan (25%) para 72 horas de exposição. * Significativamente diferente do grupo controle.



Ensaio de proliferação celular

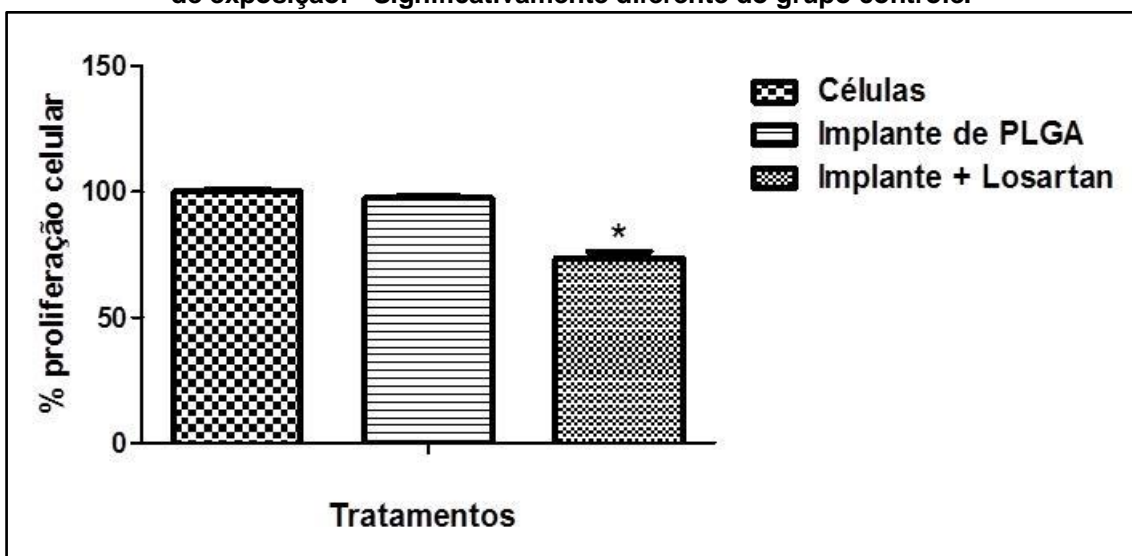
Os resultados obtidos pelo método de contagem de células foram confirmados pelo ensaio de proliferação celular, a partir da metabolização do MTT, para os tempos de 24 e 72 horas de tratamento. De acordo com a **Figura 39** não houve inibição estatisticamente significativa da proliferação de fibroblastos para o teste realizado em 24 horas.

Figura 39 - Ensaio de inibição de fibroblastos por proliferação celular realizado com células (controle), implantes de PLGA branco e contendo losartan (25%) para 24 horas de exposição.



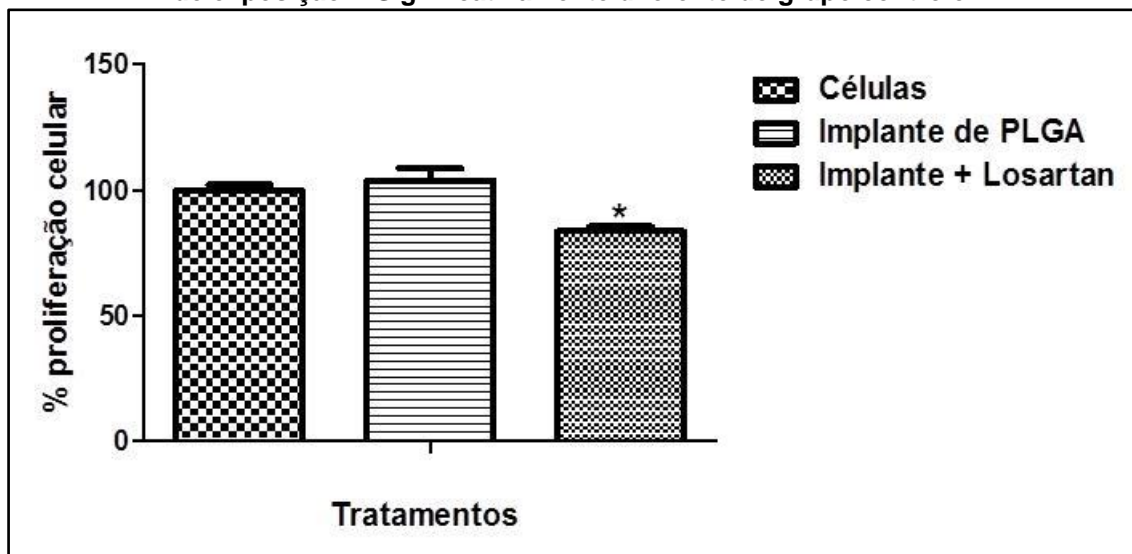
De acordo com a **Figura 40** houve inibição estatisticamente significativa da proliferação de fibroblastos submetidos ao tratamento após 48 horas. A redução foi de 26,4% para o grupo correspondente ao implante contendo losartan comparado ao grupo do implante branco e de 24,5% em relação ao grupo controle de células.

Figura 40 - Ensaio de inibição de fibroblastos por proliferação celular realizado com células (controle), implantes de PLGA branco e contendo losartan (25%) para 48 horas de exposição. * Significativamente diferente do grupo controle.



De acordo com a **Figura 41** houve inibição estatisticamente significativa da proliferação dos fibroblastos após 72 horas de tratamento. A redução foi de 19,4% para o grupo correspondente ao losartan comparado ao grupo do implante branco e de 16,2% em relação ao grupo controle de células.

Figura 41 - Ensaio de inibição de fibroblastos proliferação celular realizado com células (controle), implantes de PLGA branco e contendo losartan (25%) para 72 horas de exposição. * Significativamente diferente do grupo controle.



No resultado correspondente aos testes com implantes ainda é possível observar que não ocorreu inibição significativa entre o grupo controle de células e o grupo correspondente ao implante branco.

As concentrações de losartan doseadas nos sobrenadantes dos testes realizados com implantes estão descritas na **Tabela 21**.

Tabela 21 – Concentração média encontrada nos implantes utilizados nos testes de inibição de fibroblastos.

Teste	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)
24 horas	116,1
48 horas	177,8
72 horas	162,4

De acordo com os dados apresentados na **Tabela 21**, não houve grande diferença de liberação de losartan a partir dos implantes utilizados nos testes de 48 horas quando comparados aos de 72 horas. Quando os mesmos são comparados aos testes de 24 horas é observada uma diferença de

concentração significativa. De acordo com as **Figuras 36 e 39** não foi observada atividade inibitória de fibroblastos nos testes de 24 horas. Apesar da variável concentração ser importante, a ausência de atividade observada nos testes de 24 horas provavelmente se deve ao tempo necessário para a ação do losartan. Essa observação pode ser confirmada pelos resultados demonstrados na **Figura 35**, que corresponde às curvas dose-resposta nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Em concentrações menores que a observada no teste de 24 horas de inibição de fibroblastos por proliferação celular foi detectada atividade do losartan. No teste com os implantes, como o losartan deve ser liberado dos sistemas para exercer sua ação, o tempo pode ter influenciado a resposta inibitória da proliferação de fibroblastos.

O losartan, um ligante seletivo e competitivo dos receptores A1, exerce sua atividade por meio do antagonismo dos efeitos da All. Um possível mecanismo de ação para a All na proliferação de fibroblastos é a indução de fatores de crescimento fibroblásticos. Também foi demonstrado que a All induziu a produção de fator de crescimento transformador beta (TGF- β) em fibroblastos cardíacos, mas o seu papel na mediação dos efeitos específicos de All nestas células é pouco claro. O TGF- β tem sido relatado como um mediador chave da fibrose pulmonar, tanto em modelos animais quanto em modelos humanos da doença. É um potente estimulador da síntese de pró-colágeno pelos fibroblastos de pulmão *in vitro*, mas induz uma resposta bifásica mitogénica, sendo estimulatório em baixas concentrações e inibitório em concentrações mais elevadas (MARSHALL et al., 2000).

7 CONCLUSÕES

O método analítico desenvolvido se mostrou adequado para quantificação do losartan liberado dos implantes no estudo de liberação *in vitro*. Ele apresentou seletividade, precisão, exatidão e linearidade na faixa de trabalho utilizada.

Foram obtidos implantes biodegradáveis para a liberação de losartan com reprodutibilidade. O estudo de liberação *in vitro* mostrou que os implantes são adequados para a liberação prolongada do fármaco. Entretanto, é necessário otimizar o perfil de liberação, visando atender às necessidades da aplicação desejada.

As técnicas de caracterização empregadas mostraram presença de incompatibilidades e/ou interações entre o PLGA 75:25 e o losartan que não foram significativas. Isso foi confirmado pelo estudo de liberação *in vitro*, no qual foi possível determinar a liberação de quantidade significativa do fármaco a partir do implante.

A avaliação da atividade antiangiogênica *in vivo* do losartan e dos implantes desenvolvidos, realizada por meio do ensaio da membrana corioalantóica, apresentou resultados satisfatórios para os testes realizados com solução de losartan. Entretanto os testes realizados com implantes contendo losartan não apresentaram atividade estatisticamente significativa na inibição da angiogênese. Sugere-se uma nova avaliação utilizando implantes com uma porcentagem de losartan maior que 25%. São necessários mais estudos a fim de se confirmar o potencial antiangiogênico do losartan a partir dos implantes. Também foi observada por meio desse estudo a biocompatibilidade dos implantes.

Finalmente, estudos *in vitro* mostram que o losartan e os implantes de PLGA contendo esse fármaco possuem ação inibitória da proliferação de fibroblastos.

Esses resultados sugerem que os implantes constituídos de PLGA e losartan (25%) têm grande potencial para o tratamento da cicatrização indesejável após cirurgia filtrante para o glaucoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIR, P. M., FOSTERB, B. D., CROW, M., COOKE, C. A., RUCKER, J. J., JAIN, A., SMITH, B. J., BURKS, T. N., COHN, R. D., FEDARKO, N. S., CAREY, R. M., O'ROURKE, B., WALSTON, J. D. Identification and characterization of a functional mitochondrial angiotensin system. **PNAS**, v. 108, p. 14849–14854, 2011.

ALLAN, B. D. S., VAN SAARLOOS, P. P., COOPER, R. L., CONSTABLE, I. J., Laser microsclerostomy for primary open angle glaucoma: A review of laser mechanisms and delivery systems. **Eye**, v. 6, p. 257-266, 1992.

BONFILIO, R., MENDONÇA, T. F., PEREIRA, R. G., ARAÚJO, M. B., Losartan potassium dissolution test for drug release evaluation in pharmaceutical capsules using HPLC and UV spectrophotometry. **Química Nova**, v. 33, p. 377-383, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2003

BRASIL. Portal Brasil. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2011/05/26/glaucoma-atinge-900-mil-pessoas-no-brasil-segundo-dados-da-oms>. Acesso em: 20/11/2012.

BURT, H. M. JACKSON, J. K., BAINS, S. K., LIGGINS, R. T., OKTABAB, A. M. C., ARSENAULTB, A. L., HUNTERC, W. L., Controlled delivery of taxol from microspheres composed of a blend of ethylene-vinyl acetate copolymer and poly (d,l-lactic acid). **Cancer Letters**, v. 88, p. 73-79, 1995.

BYRRO, R. M. D., MIYASHITA, D., ALBUQUERQUE, B. V., CRUZ, A. A. V., SILVA-CUNHA, A., Sistemas biodegradáveis contendo acetato de prednisolona para administração orbitária. **Arq Bras Oftalmol.**, v. 72, p. 444-450, 2009.

CASTRO, A. N. B. V., MESQUITA, W. A., Noncompliance with drug therapy of glaucoma: A review about intervening factors. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 453-459, 2009.

CLAS, S. D., DALTON, C. R., HANCOCK, B. C., Differential scanning calorimetry: Applications in drug development. **Pharm Sci Technol Today**, v. 2, p. 311-320, 1999.

DAHAN, E., MATTHIAS, U. H., Nonpenetrating filtration surgery for glaucoma: Control by surgery only. **J Cataract Refract Surg**, v.26, p. 695-701,2000

European Commission; Official Journal of the European Communities, L221/8-36, 2002.

EUROPEAN PHARMACOPEIA, 7 ed., 2011.

FIALHO, S. L., REGO, M. G. B., CARDILLO, J. A., SIQUEIRA, R. C., JORGE, R., CUNHA, A. S., Implantes biodegradáveis destinados à administração intraocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 891-896, 2003.

FIALHO, S. L., SILVA-CUNHA, A., Manufacturing techniques of biodegradable implants intended for intraocular application. **Drug Delivery**, v. 12, p. 109-116, 2005.

FIALHO, S. L., SILVA-CUNHA, A., Sistema de transporte de drogas para o segmento posterior do olho: Bases fundamentais e aplicações. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, p. 173-179, 2007.

FIALHO, S. L., BEHAR-COHEN, F., SILVA-CUNHA, A., Dexamethasone-loaded poly(ϵ -caprolactone) intravitreal implants: A pilot study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 637-646, 2008.

FREDENBERGA, S., WAHLGREN, M., RESLOW, M., AXELSSON, A., The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems - A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, p. 34-52, 2011.

FU, Q. L., LI, X., SHI, J., WEN, W., LEE, D. H. S., SO, K. F., Synaptic degeneration of retinal ganglion cells in a rat ocular hypertension glaucoma model. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 29, p. 575-81, 2009.

GOEL, M., PICCIANI, R. G., LEE, R. K., BHATTACHARYA, S. K., Aqueous humor dynamics: A review. **The Open Ophthalmology Journal**, v. 4, p. 52-59, 2010.

HASHIZOE, M., OGURA, Y., KIMURA, H., MORITERA, T., HONDA, Y., KYO, M., HYON, SH., IKADA, Y., Scleral plug of biodegradable polymers for controlled drug release in the vitreous. **Arch. Ophthalmol.**, v. 112, p. 1380-1384, 1994.

HERRERO-VANRELL, R., CHECA-CASALENGUA, P., MOLINA-MARTÍNEZ, I. T., TUCKER, B. A., YOUNG, M. J., BRAVO-OSUNA, I., PLGA microparticles loaded with neuroprotective agents (GDNF and BDNF). A potential treatment for glaucoma. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, p. 5978, 2009.

HUH, K. M., CHO, Y. W., PARK, K., PLGA-PEG block copolymers for drug formulations. **Drug Delivery Technology**, v. 3, p. 44-49, 2003.

JOHNSON, T. V., BULL, N. D., MARTIN, K. R., Neurotrophic factor delivery as a protective treatment for glaucoma. **Experimental Eye Research**, v. 93, p. 196-203, 2011.

KHAW, P. T., OCCLESTON, N. L., SCHULTZ, G., GRIERSON, I., SHERWOOD, M. B., LARKINI, G., Activation and suppression of fibroblast function. **Eye**, v. 8, p. 188-195, 1994.

KIMURA, H., OGURA, Y., Biodegradable polymers for ocular drug delivery. **Ophthalmologica**, v. 215, p. 143-155, 2001.

KNOLL, A., SCHMIDT, S., CHAPMAN, M., WILEY, D., BULGRIN, J., BLANK, J., KIRCHENER, L., A comparison of two controlled-release delivery systems for the delivery of amiloride to control angiogenesis. **Microvascular research**, v. 58, p. 1-9, 1999.

KOCH, S., YAO, C., GRIEB, G., PRÉVEL, P., NOAH, E. M., STEFFENS, G. C. M., Enhancing angiogenesis in collagen matrices by covalent incorporation of VEGF. **J Mater Sci. Mater Med**, v.17, p. 735–741, 2006.

KUNOU, N., OGURA, Y., HASHIZOES, M., HONDA, Y., HYON, S. H., YOSHITO, I., Controlled intraocular delivery of ganciclovir with use of biodegradable scleral implant in rabbits. **Journal of Controlled Release**, v. 37, p. 143-150, 1995.

LABBÉ, A., KHAMMARI, C., BAUDOUIN, C., Modulation de la cicatrisation dans la chirurgie du glaucome. **J Fr. Ophthalmol.**, v. 30, p. 631-646, 2007.

LAVIK, E., KUEHN, M. H., KWON, Y. H., Novel drug delivery systems for glaucoma. **Eye**, v. 25, p. 578–586, 2011

LEE, D. A., HIGGINBOTHAM, E. J., Glaucoma and its treatments: a review. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 62, p. 691-699, 2005.

LEE, S. S.; HUGHES, P.; ROSS, A. D.; ROBINSON, M. R. Biodegradable implants for sustained drug release in the eye. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 2043-2053, 2010.

LI, X., JASTI, B. R., Design of controlled release drug delivery systems, 1st ed., McGraw-Hill, New York, 2005.

LONCHAMPT, M., PENNEL, L., DUHAULT, J., Hyperoxia/Normoxia-Driven Retinal Angiogenesis in Mice: A Role for Angiotensin II. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, p. 429-432, 2001.

MAINARDES, R. M., GREMIÃO, M. P. D., EVANGELISTA, R. C., Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p.523-530, 2006.

MAIO, V. M. P., DIAS, C. L., BERGOLD, A. M., Validation of an isocratic HPLC assay of losartan potassium in pharmaceutical formulations and stress test for stability evaluation of drug substance. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, p. 250-255, 2005.

MANSOOR, S., KUPPERMANN, B. D., KENNEY, M. C., Intraocular sustained-release delivery systems for triamcinolone acetonide. **Pharmaceutical Research**, v. 26, p. 770-784, 2009.

MARSHALL, R. P., MCANULTY, R. J., LAURENT, G. J., Angiotensin II is mitogenic for human lung fibroblasts via activation of the type 1 receptor. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161, p. 1999–2004, 2000.

MARTINDALE, W., KATHELEEN, P., **Martindale: The Complete Drug Reference**. 32 ed. (1999), London: Pharmaceutical Press, 1999.

MOEN, M. D., WAGSTAFF, A. J., Losartan a review of its use in stroke risk reduction in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy. **Drugs**, v. 25, p. 2657-2674, 2005.

MOSMANN, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

OBSTBAUM, S. A., CIOFFI, G. A., KRIEGLSTEIN, G. K., FENNERTY, M. B., ALM, A., ARAIE, M., CARASSA, R. G., GREVE, E. L., HITCHINGS, R. A., KAUFMAN, P. L., KITAZAWA, Y., PONGPUN, R., SUSANNA, R., WAX, M. B., ZIMMERMAN, T. J., Gold standard medical therapy for glaucoma: Defining the criteria identifying measures for an evidence-based analysis. **Clinical Therapeutics**, v. 26, p. 2102-2120, 2004.

PORJAZOSKA, A., GORACINOVA, K., MLADENOVSKA, K., GLAVA, M., SIMONOVSKA, M., JANJEVI, E. I., CVETKOVSKA, M., Poly(lactide-co-glycolide) microparticles as systems for controlled release of proteins – Preparation and characterization. **Acta Pharm.**, v. 54, p. 215–229, 2004.

QUIGLEY, H. A., Glaucoma. **The Lancet**, v. 377, p. 1367–1377, 2011.

RAGHAVAN, K., DWIVEDI, A., CAMPBELL-JÚNIOR, C. G., JOHNSTON, E., LEVORSE, D., MCCAULEY, J., HUSSAIN, M., A spectroscopic investigation of losartan polymorphs. **Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 900-904, 1993.

ROCKWOOD, E. J., SHARMA, S., HAYDEN, B., SINGH, A., Glaucoma. **Ultrasound Clin**, v. 3, p. 207–215, 2008.

SALIBA, J. Sistemas biodegradáveis de administração intra-ocular contendo ciclosporina (A) para tratamento da uveíte posterior. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2007. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

SCHULTZ, C. L., POLING, T. R., MINT, J. O., A medical device/drug delivery system for treatment of glaucoma. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 92, p. 343–348, 2009.

SHAARAWY, T., FLAMMER, J., **Glaucoma Therapy. Current Issues and Controversies**, United Kingdom, 2004.

SHAH, S. S., DENHAN, L. V., ELISON, J. R., BHATTACHARJEE, P. S., CLEMENT, C., HUQ, T., HILL, J. M., Drug delivery to the posterior segment of the eye for pharmacologic therapy. **Expert Review of Ophthalmology**, v. 5, p. 75-93, 2010.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J., **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ED. RIO DE JANEIRO: LTC, 2006, 490 P.

SIMPSON, K. L., MCCLELLAN, K. J., Losartan a review of its use, with special focus on elderly patients, **Drugs & Aging**, v.16, p. 227-250, 2000.

SJOLIE, A. K., DODSON, P., HOBBS, F. R. R., Does renin-angiotensin system blockade have a role in preventing diabetic retinopathy? A clinical review. **The International Journal of Clinical Practice**, v. 65, p. 148-153, 2011.

Spectral Database for Organic Compounds. Disponível em: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi. Acesso em: 25/01/2012.

STOCKERT, J. C., BLÁZQUEZ-CASTRO, A., CAÑETE, M., HOROBIN, R. W., VILLANUEVA, MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, **Acta Histochemica**, v. 114, p. 785-796, 2012.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP 29: The National Formulary. Rockville, Md.: The United States Pharmacopeia Convention, 2007.

VIEIRA, L. C., **Desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada de ácido rosmarínico para o tratamento de doenças oculares causadoras de neovascularização: Obtenção e caracterização dos sistemas**. 2011. 140f. (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais – Minas Gerais, 2011.

YASUKAWA, T., OGURA, Y., SAKURAI, E; TABATA, Y., KIMURA, H., Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 2033-2046, 2005.

YU, D. Y., MORGAN, W. H., SUN, X., SU, E. N., CRINGLE, S. J., YU, P. K., HOUSE, P., GUO, W., YU, X., The critical role of the conjunctiva in glaucoma

filtration surgery. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 28, p. 303–328, 2009.

WEBER, K. T., BRILLA, C. G., Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. **Circulation**, v. 83, p. 1849-1865, 1991.

WEISMANN, D., HARTVIGSEN, K., LAUER, N., BENNETT, K., SCHOLL, H. P. N., ISSA, P. C., CANO, M., BRANDSTÄTTER, H., TSIMIKAS, S., SKERKA, C., SUPERTI-FURGA, G., HANDA, J. T., ZIPFEL, P. F., WITZTUM, J. L., BINDER, C. J. Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. **Nature**, v. 478, p. 76-81, 2011.

WU, LEI-SHU., GERARD, C., HUSSAIN, M. A. Thermal analysis and solution calorimetry studies on losartan polymorphs. **Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 1793-1795, 1993.

ZHANG, Y., YANG, X., WU, P., XU, L., LIAO, G., YAND, G., Expression of angiotensin II type 1 receptor in rat hepatic stellate cells and its effects on cell growth and collagen production, **Horm Res.**, v. 60, p. 105–110, 2003.

ZHANG, J. Z., XI, X., GAO, L., KERN, T. S., Captopril inhibits capillary degeneration in the early stages of diabetic retinopathy. **Current Eye Research**, v. 32, p. 883–889, 2007.