

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

**RICARDO MARTINS DUARTE BYRRO**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS BIODEGRADÁVEIS DE  
LIBERAÇÃO DE ÁCIDO MICOFENÓLICO PARA ADMINISTRAÇÃO INTRAOCULAR**

Belo Horizonte - MG  
2013

**RICARDO MARTINS DUARTE BYRRO**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS BIODEGRADÁVEIS DE  
LIBERAÇÃO DE ÁCIDO MICOFENÓLICO PARA ADMINISTRAÇÃO INTRAOCULAR**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti –  
UFMG

Coorientador Prof. Dr. Armando da Silva  
Cunha Júnior - UFMG

Belo Horizonte - MG  
2013

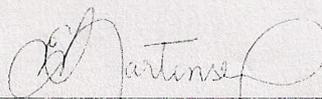
## FOLHA DE APROVAÇÃO

**RICARDO MARTINS DUARTE BYRRO**

**"DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS BIODEGRADÁVEIS DE LIBERAÇÃO DE ÁCIDO MICOFENÓLICO PARA ADMINISTRAÇÃO INTRAOCULAR"**

Tese, como requisito parcial para obter o título de Doutor 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 16 de julho de 2013.

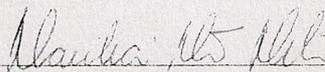
### COMISSÃO EXAMINADORA:



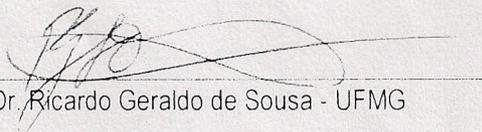
Prof. Dra. Eliana Martins Lima - UFG



Prof. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro - USP

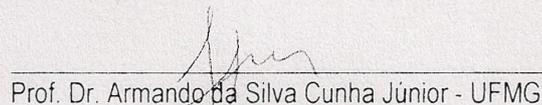


Prof. Dra. Marília Martins Melo - UFMG



Prof. Dr. Ricardo Geraldo de Sousa - UFMG

Prof. Dra. Gisele Rodrigues da Silva - UFSJ



Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior - UFMG



Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti - UFMG

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

**RICARDO MARTINS DUARTE BYRRO**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS BIODEGRADÁVEIS DE  
LIBERAÇÃO DE ÁCIDO MICOFENÓLICO PARA ADMINISTRAÇÃO INTRAOCULAR**

Belo Horizonte - MG  
2013

**RICARDO MARTINS DUARTE BYRRO**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS BIODEGRADÁVEIS DE  
LIBERAÇÃO DE ÁCIDO MICOFENÓLICO PARA ADMINISTRAÇÃO INTRAOCULAR**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti –  
UFMG  
Coorientador Prof. Dr. Armando da Silva  
Cunha Júnior - UFMG

Belo Horizonte - MG  
2013

## RESUMO

O ácido micofenólico (MPA) é um agente imunossupressor amplamente utilizado no tratamento de rejeição de órgãos. Alguns estudos preliminares mostraram a eficácia do MPA em inibir uveíte autoimune experimental em ratos e a sua utilização em doenças inflamatórias na parte posterior do olho em humanos já tem sido relatada. O tratamento de doenças inflamatórias da parte posterior do olho é um desafio devido à anatomia desse órgão, o qual possui barreiras naturais que dificultam o acesso dos fármacos. Devido a isso, a biodisponibilidade de fármacos no interior do olho é muito baixa, o que pode atrapalhar o sucesso da terapia uma vez que um bom resultado pode estar relacionado diretamente com o perfil de liberação de fármacos nesse local. Para resolver tal problema, foi desenvolvido um dispositivo polimérico biodegradável, na forma de implante ocular, para a liberação controlada de MPA diretamente no olho. O implante possui 6 mm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro, contém uma dose de 160 µg de MPA e uma matriz polimérica constituída de poli ácido lático e glicólico (PLGA). Para caracterizar o novo dispositivo, um método analítico de cromatografia líquida de ultra performance foi desenvolvido e aplicado no controle de qualidade do novo dispositivo para a quantificação de MPA. O método possui um limite de quantificação de 0,3 µg/mL e tempo de corrida de 1,5 minuto. Esse mesmo método também foi utilizado para a quantificação de MPA liberado pelo dispositivo em um estudo de liberação *in vitro*, no qual se verificou a liberação do fármaco em um período de 15 semanas. Para quantificar o fármaco liberado no olho e estudar o comportamento do dispositivo *in vivo*, um método bioanalítico foi desenvolvido. O implante foi capaz de veicular e controlar a liberação de aproximadamente 10µg de MPA em olhos de coelhos por um período de 40 dias.

Palavras-chave: Ácido micofenólico, oftalmologia, dispositivos implantáveis, doenças oculares inflamatórias, cromatografia líquida de ultra performance, cromatografia líquida acoplada a detector de massas.

## ABSTRACT

Mycophenolic acid (MPA) is an immunosuppressive agent widely used in the treatment of organ transplant rejection. In some preliminary studies, MPA has been shown to inhibit experimental autoimmune posterior uveitis in rats, and its use in human posterior inflammatory eye disease has been already described. Treatment of inflammatory eye diseases in the posterior chamber is a challenge due to the anatomy of the eye, which has natural barriers that make the drug access more difficult. Thus, the bioavailability of drugs inside the eye is very low, and a successful therapy may be directly related with the drug release profile in this target. To solve this problem, a biodegradable polymeric device in the form of eye implant for the controlled release of MPA directly into the eye was developed. The implant has 6 mm of length and 0.5 mm of diameter, a dosage of 160 µg of MPA, and a polymeric matrix constituted of poly lactic acid and glycolic (PLGA). To characterize the new device, an analytic method of ultra performance liquid chromatography (UPLC) was developed and applied on the MPA assay in the new device. The method has a quantitation limit of 0.3 mg / mL and a run time of 1.5 minute. This same method was used for quantification of MPA released by the device on an *in vitro* release study in which it was possible to verify the drug release over a period of 15 weeks. To quantify the drug released inside the eye and study the behavior of the device *in vivo*, a bioanalytical method was developed. The implantable device was able to deliver and control the liberation of approximately 10µg of MPA inside rabbit eyes through 40 days.

Keywords: Mycophenolic acid, ophthalmology, implantable devices, ocular inflammatory diseases, ultra performance liquid chromatography, liquid chromatography coupled to mass detector.

## LISTA DE FIGURAS

1.1 - Esquema das principais estruturas dos segmentos oculares.....	15
1.2 - Vias de absorção ocular.....	18
1.3 - Classificação anatômica da uveíte.....	21
1.4 - Vias de administração para tratamento de doenças do segmento posterior do olho. Tópica (a), sistêmica (b), injeções e implantes intra vítreos (c); trans escleral (subconjuntival ou periocular) (d).....	27
1.5 - (a) Ácido micofenólico (MPA) e (b) Micofenolato de mofetila (MMF).....	28
1.6 - Metabolismo das purinas.....	29
1.7 - Metabolismo do MMF.....	30
1.8 -Estrutura química do copolímero ácido láctico / ácido glicólico.....	39
1.9 - Etapas de hidrólise do PLA, PGA ou PLGA.....	39
2.1 – Etapas da cirurgia de inserção dos implantes. (A) introdução do trocarter; (B) término da introdução do trocarter; (C) trocarter inserido na região trans-esclera; (D) inserção do implante; (E) inserção do implante através da esclerotomia; (F) retirada do trocarter. ....	54
2.2 - Fotografias do implante desenvolvido.....	61
2.3 - Microfotografias de MEV do implante contendo o MPA a 10% e do implante branco. A, B e C representam o implante com o MPA a 10% em aumentos de 35, 100 e 200 vezes, respectivamente. D, E e F representam o implante branco em aumentos de 35, 100 e 200 vezes, respectivamente.....	63
2.4 - Espectroscopia de infravermelho na região de $4000\text{ cm}^{-1}$ a $650\text{ cm}^{-1}$ para o PLGA, MPA e a mistura física.....	64
2.5 – Curvas DSC de: (A) PLGA e (B) Mistura física.....	66
2.6 – Curvas TG,DTG e DTA de: (A) PLGA e (B) Mistura física.....	67
2.7 – Concentração média de MPA nos implantes em um intervalo de 12 meses.....	70
2.8- Cromatograma de análise para identificação da presença de produtos de degradação do MPA.....	70
2.9 - Liberação acumulada de MPA dos implantes desenvolvidos. (Os valores são representados como média n= 6).....	71
2.10 - Liberação semanal de MPA dos implantes desenvolvidos. (Os valores são representados como média n= 6).....	72

2.11 - Liberação acumulada de MPA dos implantes relacionados à raiz quadrada do tempo. A) Relação da semana 1 à 15. B) Relação da semana 1 à 3. C) Relação da semana 8 à 13.....	75
2.12 – Curva de concentração vítrea média de MPA versus tempo obtida após administração de um implante ocular em coelhos.....	78
2.13 – Gráfico de dispersão das concentrações vítreas de MPA versus tempo obtida após o estudo de farmacocinética ocular dos implantes.....	80
2.14 – Avaliação clínica da toxicidade dos implantes. (A) - Fotografia da retina na qual não foram observadas alterações no disco óptico (1), retina (2) e vasos da coróide (3). (B) – Fotografia de coelho sendo submetido ao teste de Schirmer para avaliação da produção de lágrima.....	82
3.1- Estrutura química do Ácido micofenólico (MPA).....	85
3.2- Estrutura química dos fármacos testados como padrão interno: Nevirapina (A), cetoprofeno (B) e naproxeno (C).....	91
3.3 - Espectro na região do ultravioleta e típico cromatograma de amostras de MPA.....	102
3.4 - Curva analítica do MPA para avaliação da linearidade do método de quantificação por UPLC.....	104
3.5 - Espectros de massas com e sem fragmentação para: (A) MPA e (B) cetoprofeno.....	109
3.6 - Cromatograma de uma corrida analítica do método.....	110
3.7 - Cromatogramas das amostras de vítreo branco nos canais do MPA e do padrão interno. (A) vítreo normal e (B) vítreo hemolisado.....	113
3.8 - Gráfico de resíduos e curva analítica do MPA obtidos por regressão linear no terceiro dia de análise.....	115
3.9 - Relação sinal/ruído para o cromatograma de MPA na concentração do LIQ.....	123

## LISTA DE TABELAS

1.1 - Propriedades do copolímero ácido láctico / ácido glicólico.....	39
1.2 - Levantamento bibliográfico sobre o uso de implantes intraoculares de PLGA.....	40
1.3 - Metodos de quantificação de MPA.....	42
2.1 - Variações propostas no preparo das microesferasde PLGA e MPA e as porcentagens de incorporação obtidas após análise do sobrenadante por UPLC.....	59
2.2 – Dados sobre os animais e os grupos que participaram do estudo farmacocinético do MPA....	77
2.3 – Parâmetros farmacocinéticos do implante de MPA.....	78
3.1 - Soluções diluídas para construção de curva analítica e avaliação da linearidade do método cromatográfico para quantificação de MPA.....	88
3.2 - Parâmetros considerados para avaliação da robustez do método analítico.....	89
3.3 - Diluições para construção das soluções de contaminação de MPA para avaliação da linearidade do método bioanalítico por LC-MS/MS.....	95
3.4 - Dados obtidos para construção das curvas analíticas de MPA em todos os 3 dias de análise.	114
3.5 - Equações das retas e respectivos coeficientes de correlação obtidos para o MPA, na avaliação da linearidade do método bioanalítico.....	115
3.6 - Resultados da precisão e exatidão intra-corrída obtidos pelo método bioanalítico para quantificação de MPA.....	117
3.7 - Resultados da precisão e exatidão inter-corrídas obtidos pelo método bioanalítico para quantificação de MPA.....	118
3.8 - Taxas de recuperação de MPA e cetoprofeno obtidas pelo procedimento de extração.....	119
3.9 - Resultados do teste de efeito de matriz para o MPA.....	122
3.10 - Resultados do teste de efeito de matriz para o cetoprofeno.....	122
3.11 - Resultados da precisão e exatidão para o limite inferior de quantificação do método bioanalítico de quantificação de MPA.....	123
3.12 - Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de curta duração do método bioanalítico para quantificação de MPA.....	125
3.13 – Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de longa duração do método bioanalítico para quantificação de MPA.....	125
3.14 - Resultados obtidos na avaliação da estabilidade pós-processamento do método bioanalítico para quantificação de MPA.....	126
3.15 - Resultados obtidos na avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento do método bioanalítico para quantificação de MPA.....	127

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	<i>Do inglês Analysis of variance</i>
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
°C	Graus Celsius
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
cm	Centímetro (s)
CV	Coeficiente de variação
Da	Dalton (s)
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPa	Desvio padrão do intercepto
DPR	Desvio padrão relativo
ECD	Estabilidade de curta duração
ECCD	Estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento
ELD	Estabilidade de longa duração
EPP	Estabilidade pós-processamento
ESI	<i>Eletronspray ionization</i>
eV	Elétron Volt (s)
EVA	Acetato de vinil etileno (do inglês, Ethylene vinyl acetate)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Grama (s)
HPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta eficiência – eletronspray –Massa/ Mass, do inglês High performance liquid chromatography-Eletronspray-Mass/Mass
Ke	Constante de eliminação
LD	Limite de detecção
LIQ	Limite inferior de quantificação
LQ	Limite de quantificação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MS	Massas
mg	Miligrama (s)
min	Minuto (s)
mL	Mililitros (s)
mm	Milímetro (s)
MPA	Ácido micofenólico
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
m/z	Massa/carga
ng	Nanograma (s)
nm	Nanômetro (s)
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pa	Padrão
pH	Potencial hidrogeniônico
PLGA	Copolímero dos ácidos láctico e glicólico
PVA	Polivinil álcool (do inglês, Polyvinyl alcohol)
p/v	Peso por volume
r	Coeficiente de correlação
r <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SQR	Substância química de referência
S/R	Razão sinal/ruído
T <sub>1/2</sub>	Tempo de meia vida
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Performance (do inglês, Ultra Performance Liquid Chromatography)

µg	Micrograma (s)
µl	Microlitro (s)
µm	Micrômetro (s)
UR	Umidade Relativa
UV	Ultravioleta
V	Volt (s)
v/v	Volume por volume

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1

<b>Introdução geral</b> .....	14
1 Revisão bibliográfica.....	15
1.1 Olho e a região ocular.....	15
1.1.1 O segmento posterior do olho.....	16
1.1.2 Fatores limitantes para a absorção ocular de fármacos.....	17
1.2 Doenças que acometem o olho: uveíte e esclerite.....	20
1.2.1 Uveíte.....	20
1.2.2 Esclerite.....	22
1.3 Medicamentos para o tratamento das doenças que acometem o segmento posterior do olho.....	23
1.4 Vias de administração de fármacos para tratamento de doenças que acometem o segmento posterior do olho.....	24
1.5 Ácido micofenólico (MPA).....	27
1.5.1 Histórico.....	27
1.5.2 Farmacocinética.....	30
1.5.3 Usos terapêuticos.....	31
1.6 Implantes poliméricos.....	32
1.6.1 Implantes poliméricos biodegradáveis de aplicação intraocular.....	35
1.7 PLGA.....	38
1.8 Implantes intraoculares de PLGA.....	40
1.9 Métodos bioanalíticos para a quantificação de fármacos em amostras biológicas.....	41
1.10 Validação de métodos bioanalíticos.....	43
2 Justificativa.....	43
3 Objetivo.....	45
3.1 Geral.....	45

3.2 Específicos.....	46
----------------------	----

## **CAPÍTULO 2**

### **Desenvolvimento e caracterização dos implantes de PLGA contendo**

<b>MPA.....</b>	<b>47</b>
1 Materiais e métodos.....	48
1.1 Materiais.....	48
1.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras.....	48
1.1.2 Reagentes e vidraria.....	48
1.1.3 Equipamentos.....	48
1.2 Métodos.....	49
1.2.1 Preparo dos implantes intraoculares.....	49
1.2.2 Caracterização dos implantes desenvolvidos.....	51
2 Resultados e discussão.....	57
2.1 Preparo dos implantes.....	57
2.2 Caracterização dos implantes desenvolvidos.....	61
2.2.1 Peso médio, tamanho e espessura.....	61
2.2.2 Morfologia da superfície.....	62
2.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho.....	64
2.2.4 Análise térmica.....	65
2.2.5 Quantidade de MPA nos implantes (porcentagem de incorporação).....	68
2.2.6 Estudo de estabilidade dos implantes obtidos.....	68
2.2.7 Estudo de liberação <i>in vitro</i> .....	71
2.7.2. Estudo de farmacocinética e de liberação <i>in vivo</i> dos implantes.....	76
2.7.3 Avaliação da toxicidade dos implantes obtidos.....	81
3 Conclusões.....	82

### **CAPÍTULO 3**

<b>Desenvolvimento dos métodos analítico e bioanalítico utilizados na caracterização do implante desenvolvido.....</b>	<b>83</b>
1 Materiais e métodos.....	84
1.1 Materiais.....	84
1.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras.....	84
1.1.2 Reagentes e vidraria.....	84
1.1.3 Equipamentos.....	84
1.2 Métodos.....	85
1.2.1 Desenvolvimento de método analítico por Cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) para a determinação de MPA nos implantes e no meio de liberação utilizado no estudo <i>in vitro</i> .....	85
1.2.2 Desenvolvimento de método bioanalítico para a determinação de MPA em vítreo de coelhos, por LC-MS.....	89
2 Resultados e discussão.....	101
2.1 Desenvolvimento de método analítico por Cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) para a determinação de MPA nos implantes e no meio de liberação utilizado no estudo <i>in vitro</i> .....	101
2.1.1 Validação do método cromatográfico.....	102
2.2 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação de MPA em vítreo de coelhos por LC-MS/MS.....	105
2.2.1 Detecção por espectrometria de massas.....	105
2.2.2 Extração dos fármacos do vítreo e análise cromatográfica.....	107
2.2.3 Validação do método bioanalítico.....	112
3 Conclusões.....	128
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>Conclusão Geral.....</b>	<b>129</b>

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>131</b>
<b>ANEXO 1 – Artigo Aceito para publicação.....</b>	<b>141</b>
<b>ANEXO 2 – Artigo submetido para publicação.....</b>	<b>148</b>
<b>ANEXO 3 - Resumos publicados em congressos.....</b>	<b>163</b>
<b>ANEXO 4 – Certificado de aprovação do protocolo para experimentos com animais.....</b>	<b>165</b>

# **CAPÍTULO 1**

## **Introdução Geral**

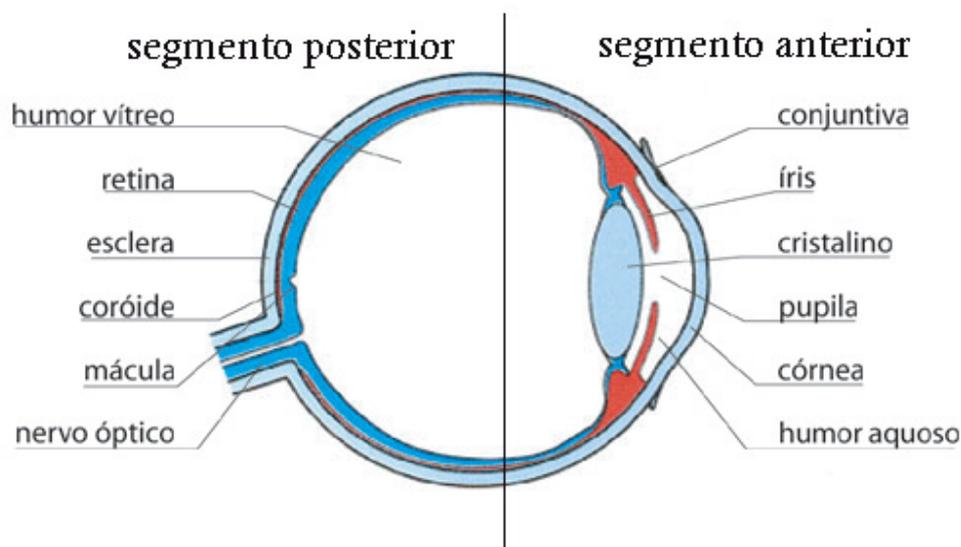
## 1 Revisão bibliográfica

### 1.1 Olho e a região ocular

O olho é o órgão responsável pela captação da luz refletida pelos objetos à sua volta. Ele se compõe do “bulbo do olho” e das “estruturas acessórias”, as quais são responsáveis por proteção e movimentação (JANOT, 2006; NETTER, 2000).

O bulbo ocular situa-se em uma cavidade óssea, a órbita, cuja principal função é a sua proteção (SNELL e LEMP, 1998). Ele é dividido anatomicamente em dois segmentos principais: o anterior e o posterior. O segmento anterior é composto por córnea, esclera, câmaras posterior e anterior, íris, corpo ciliar e lente. O segmento posterior, por sua vez, é formado por humor vítreo, retina, coróide, nervo óptico e também pela esclera (OGURA, 2001; YASUKAWA et al., 2005).

As principais estruturas do bulbo ocular, dividido em segmento anterior e posterior, são mostradas na **Figura 1.1**.



**Figura 1.1 – Esquema das principais estruturas dos segmentos oculares.**

### **1.1.1 O segmento posterior do olho**

A esclera, também presente no segmento anterior do olho, é a porção mais externa do segmento posterior, e forma com a córnea a camada protetora e fibrosa do olho. As fibras do nervo óptico atravessam a esclera por meio de uma área posterior dessa estrutura, que é denominada lâmina cribrosa (SNELL e LEMP, 1998).

A retina, camada mais interna do bulbo do olho, é uma membrana fina e transparente. No segmento posterior, ela se estende anteriormente em direção ao epitélio do corpo ciliar e à íris. A sua superfície externa se encontra em contato com a lâmina basilar da coróide e a interna está em contato com o corpo vítreo. A retina é a estrutura ocular responsável pela captação dos estímulos luminosos. Para exercer essa função, ela utiliza seus fotorreceptores, que são os cones e os bastonetes. Essas células são as responsáveis por transformar a energia química, produzida por eles quando são expostos à luz, em impulsos elétricos (SNELL e LEMP, 1998).

O humor vítreo é uma estrutura gelatinosa, transparente e incolor. Ele se localiza na câmara vítrea, ocupando cerca de 60 a 80% do bulbo ocular na região posterior à lente. Ele sustenta lateralmente o corpo ciliar e a retina (WOLFF'S, 1993).

Quimicamente, o vítreo é constituído por 98% de água e o restante é composto por ácido hialurônico, aminoácidos, proteínas solúveis, sais e ácido ascórbico (SNELL e LEMP, 1998).

Do ponto de vista de distribuição de fármacos, o corpo vítreo pode ser visto como um líquido estático, no qual pequenas substâncias ou solutos são transportados principalmente por difusão (RITTENHOUSE e POLLACK, 2000).

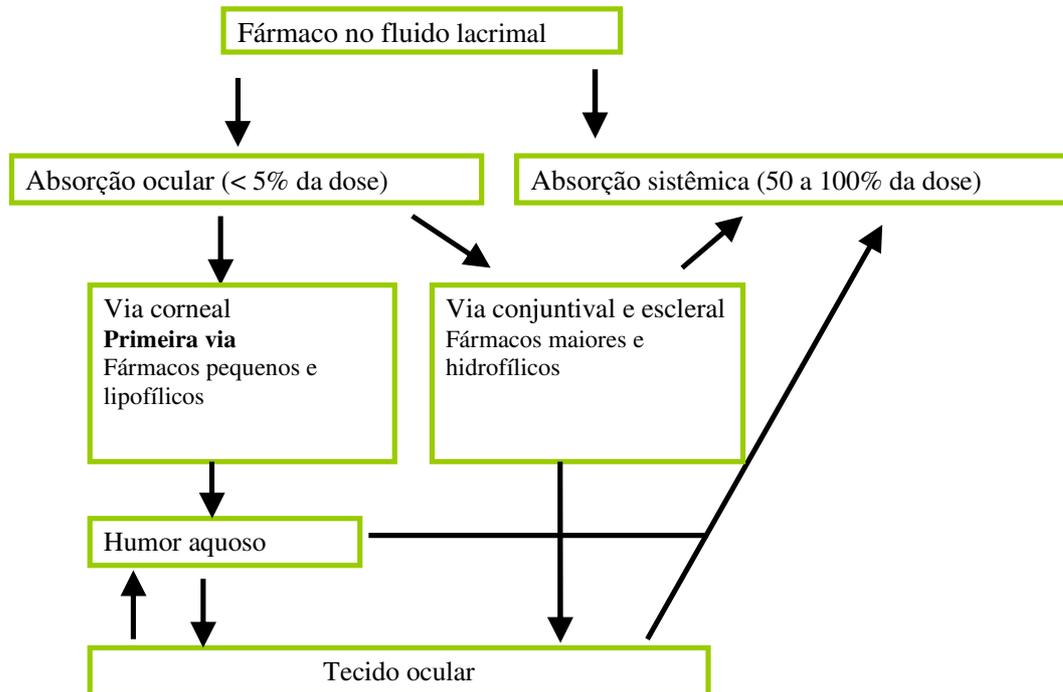
A coróide é uma camada ricamente vascularizada localizada entre a esclera e a retina. Ela é, também, a principal responsável pela nutrição da retina (SNELL e LEMP, 1998).

### 1.1.2 Fatores limitantes para a absorção ocular de fármacos

A liberação controlada de fármacos pode fazer uma grande diferença no tratamento de enfermidades oculares. A biodisponibilidade ocular depois da administração tópica de uma gota de fármaco, a forma mais comum de medicação ocular, é menor do que 5% e, frequentemente, menor do que 1%. Além dessa grande desvantagem, ainda existe o fato de apenas doenças que acometem a região anterior do olho poderem ser tratadas por essa forma. Assim, graves doenças que acometem a região posterior do olho, tais como degeneração macular, retinopatia diabética e as uveítes, não conseguem ser tratadas por tal forma convencional (URTTI, 2006).

As características anatômicas e fisiológicas do bulbo do olho são fatores que limitam o tratamento tópico de doenças oculares do segmento posterior. A baixa penetração de fármacos é justificada pelas características teciduais da esclera, conjuntiva e córnea, pela existência da drenagem lacrimal e pelas características físico-químicas implícitas ao fármaco.

Segundo Järvinen e colaboradores (1995), a relativa impermeabilidade das barreiras teciduais e a rápida drenagem lacrimal são responsáveis pela eliminação precoce de medicamentos. Dessa forma, uma pequena porcentagem do fármaco veiculado consegue atravessar esses tecidos e o restante atinge rapidamente a circulação sanguínea, sendo assim distribuído por todo o organismo. As vias de absorção ocular estão esquematizadas na **Figura 1.2**.



**Figura 1.2 - Vias de absorção ocular.**

Fonte: Adaptação de Järvinen et al. (1995, p. 5).

Os outros obstáculos para a penetração tópica de fármacos são atribuídos às barreiras naturais formadas pela córnea, conjuntiva e esclera.

A córnea é constituída por três camadas: o epitélio, o estroma e o endotélio, sendo os dois primeiros os responsáveis pela considerável impermeabilidade deste tecido. O epitélio externo estratificado não pavimentoso e não queratinizado permite a passagem de moléculas pequenas e lipofílicas. Já o estroma, tecido intermediário e hidrofílico constituído por lamelas de tecido fibroso e por grande quantidade de água, é seletivo à penetração de moléculas lipofílicas que apresentam certa afinidade pela porção aquosa, expressa pelo coeficiente de partição óleo em água. Desse modo, apenas moléculas de pequena massa molar e de caráter parcialmente lipofílico conseguem atravessar os três tecidos da córnea (JÄRVINEN et al., 1995).

Em adição à via corneal, observa-se que o tecido conjuntivo e a esclera também limitam a penetração de fármacos aplicados topicamente.

A conjuntiva apresenta junções intercelulares que são as principais responsáveis pela seletividade de absorção. Diferente das junções corneais, as da conjuntiva se apresentam maiores, o que permite a passagem de moléculas de maior massa molar. A característica de seu tecido também permite a passagem de moléculas hidrofílicas, uma vez que é formado por uma membrana mucosa vascularizada e de área dezessete vezes maior quando comparado com o tecido corneal. A penetração pela esclera ocorre via espaços perivasculares existentes entre as fibras de colágeno e os mucopolissacarídeos presentes no tecido (JÄRVINEN et al., 1995).

Outro elemento que também prejudica o tratamento tópico são os mecanismos oculares de distribuição e eliminação. A distribuição do fármaco está relacionada à via em que ele é absorvido: pela via corneal, ele passa pelo humor aquoso e é distribuído para o corpo ciliar, coróide e retina; já pela via conjuntival e escleral, o fármaco é distribuído para o trato uveal e corpo vítreo. É importante ressaltar que pode ocorrer falha no tratamento se um determinado fármaco que deve ser disponibilizado no corpo vítreo for absorvido pela via corneal.

Mecanismos de renovação do humor aquoso e a própria existência de vasos sanguíneos são os principais responsáveis pela eliminação precoce dos fármacos, impossibilitando que seja atingida a dose terapêutica efetiva. Os fármacos são eliminados da câmara anterior pela reciclagem do humor aquoso e pela presença de circulação sanguínea na porção da úvea anterior. Fármacos presentes no humor e corpo vítreo são eliminados pela câmara anterior, pela barreira hematorretiniana e pela própria circulação sanguínea (JÄRVINEN et al., 1995).

## 1.2 Doenças inflamatórias que acometem o olho: uveíte e escleríte

### 1.2.1 Uveíte

A uveíte é uma doença decorrente da manifestação de processos inflamatórios na porção do trato uveal, o qual é composto pelo corpo ciliar, íris e coróide (HESSELINK et al., 2004).

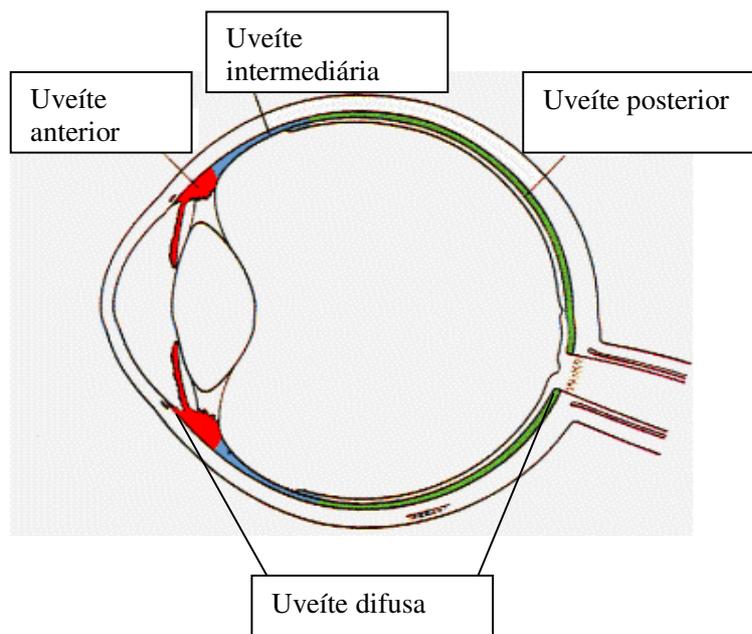
Essa doença produz grande impacto socioeconômico, uma vez que acomete indivíduos de todas as faixas etárias e classes sociais (JAFFE et al., 2006). Na clínica médica, considera-se que é responsável por 3 a 15% de todas as causas de cegueira mundial (HESSELINK et al., 2004). Pelo menos 35% dos indivíduos que apresentam uveíte sofrem sérias sequelas da doença, que vão desde o comprometimento da visão até a cegueira plena (JABS et al., 2000).

A uveíte é considerada uma doença de alta complexidade que, segundo Fialho (2003a), pode ser desencadeada por fatores como a presença de agentes infecciosos, existência de debilidade do sistema de defesa do organismo, ocorrência de traumas cirúrgicos e acidentais ou até mesmo por motivos não determinados, as denominadas idiopáticas. Segundo Bennet e Cecil (1997), a uveíte pode ainda ser classificada segundo a etiologia (endógena quando desenvolvida por agentes do próprio organismo e exógena quando provocada por agentes infecciosos externos), segundo o curso clínico (aguda que se manifesta durante meses e crônica que se manifesta por alguns anos) e segundo o aspecto clínico (granulomatosa ou não granulomatosa).

A uveíte é dividida em uveíte anterior, uveíte intermediária, uveíte posterior e uveíte difusa, classificação anatômica esquematizada na **Figura 1.3**.

A uveíte anterior, também denominada irite ou iriociclite, atinge os tecidos anteriores do bulbo do olho e compromete a íris e o corpo ciliar. A sua forma de manifestação aguda é caracterizada pela congestão do olho seguida de um halo vermelho de sensação

dolorosa, fotofobia, diminuição da visão e lacrimejamento (KANSKI, 1994). A congestão está relacionada ao depósito de células na córnea. Na inflamação mais grave, surgem precipitados ceratolíticos, agregados celulares no dorso da córnea. Quando crônica, a inflamação é denominada irite granulomatosa e está associada algumas vezes às doenças sistêmicas (BENNET e CECLL, 1997).



**Figura 1.3 - Classificação anatômica da uveíte.**

Fonte: Adaptação de Perret Opticiens (2005)

A uveíte intermediária compromete a região posterior do corpo ciliar e a retina periférica. Ela é caracterizada pela infiltração de células originadas do humor vítreo, quando inflamado. A uveíte posterior atinge a retina, coróide e humor vítreo, e também pode ser chamada de retinite, coroidite e vasculites (KANSKI, 1994; BENNET E CECIL, 1997). Geralmente, apresenta exsudação na porção do corpo vítreo, podendo, pela turvação do humor vítreo, ocasionar a baixa acuidade visual (SOUZA, 1997). No caso da uveíte posterior, a inflamação presente desencadeia a formação de novos vasos sanguíneos e a migração de células. Desta forma, o meio ocular transparente se torna opaco, prejudicando a passagem da luz e a acuidade visual do indivíduo (BOYD et al., 2001; KANSKI, 1994). Alguns indivíduos também podem apresentar a uveíte de forma difusa,

também denominada panuveíte, uma vez que esta compromete o bulbo do olho como um todo (FIALHO, 2003a).

Quanto às causas, a uveíte pode ser desencadeada por agentes virais, parasitários, bacterianos e por mecanismos intrínsecos ao organismo (BENNET e CECIL, 1997).

### **1.2.2 Esclerite**

Esclerite é uma doença inflamatória crônica, dolorosa e destrutiva da esclera. Pode envolver a córnea, episclera adjacente, úvea subjacente e representa uma ameaça significativa para a visão. Frequentemente associada com uma infecção ou doença sistêmica subjacente, é uma das condições mais difíceis de tratar em oftalmologia. Pode estar associada também a outras complicações oculares (uveíte anterior, ceratite periférica e glaucoma). Patogenicamente, esclerite não infecciosa é uma vasculite imunomediada resultante de uma complicada cascata de deposição de complexos imunes, ativação do complemento e respostas imuno-celulares. Importantes células inflamatórias encontram-se muito aumentadas nos olhos de pacientes com esclerite. Células T e macrófagos são comumente vistos infiltrando o profundo tecido episcleral com aglomerados de células B em áreas perivasculares (OKHRAVI, 2005; SAINZ DE LA MAZA et al., 2012).

A principal característica da esclerite é a dor intensa, que pode envolver o olho, órbita e irradia para alcançar a orelha, couro cabeludo, face e mandíbula. A dor normalmente é de natureza grave e muitas vezes resistente aos analgésicos, é agravada pelo movimento dos olhos e é pior à noite, muitas vezes interferindo no sono. Em alguns casos, a dor pode ser tão grave que impede o paciente de trabalhar e realizar suas atividades normais (OKHRAVI, 2005).

### **1.3 Medicamentos para o tratamento de uveíte e esclerite**

O tratamento de uveíte e esclerite está relacionado à utilização de medicamentos capazes de prevenir ou tratar complicações visuais, aliviar o desconforto dos pacientes e controlar a manifestação inflamatória (KANSKI, 1994). Entre as diversas classes de fármacos, encontra-se descrita na literatura a utilização de midriáticos, anti-inflamatórios corticoides, agentes citotóxicos, antivirais e imunossupressores (KANSKI, 1994; FIALHO, 2003a). Esses fármacos podem ser administrados pelas vias oral (tratamento sistêmico), tópica e por meio de injeções perioculares (KANSKI, 1994; JABS et al., 2000). Para a escolha do fármaco, deve-se levar em consideração a frequência e a via de administração, a natureza, a gravidade e a localização da doença (FIALHO, 2003a).

A utilização tópica de midriáticos (atropina, tropicamida e ciclopentolato) visa proporcionar um maior conforto ao paciente, uma vez que minimiza espasmos do músculo ciliar potencializados pela manifestação da uveíte, principalmente pela uveíte anterior (KANSKI, 1994).

O tratamento usual da grande parte das manifestações da uveíte apresenta como terapia de primeira escolha a administração sistêmica de corticóides, sendo citados a dexametasona (OKADE et al., 2003), prednisolona, prednisona (JABS et al., 2000), triancinolona (BAEYENS et al., 2006) e seus respectivos sais. Todavia, quando o organismo não se adapta à terapia com corticóides, muitas vezes eles devem ser substituídos por outros medicamentos.

A substituição terapêutica baseia-se na administração de fármacos imunossupressores, capazes de inibir a resposta imune inflamatória (HESSELINK et al., 2004). Entre os imunossupressores, encontram-se os fármacos citotóxicos como o metrotexato, 6-mercaptopurina, azatioprina, ciclofosfamida, clorambucil e os fármacos que inibem as células T, como ciclosporina A e tacrolimus (JABS et al., 2000).

A ciclosporina A, em substituição à terapia baseada em corticóides, torna-se uma alternativa para o tratamento da uveíte posterior. Segundo Jabs e colaboradores (2000), é utilizada na concentração diária de 2 a 10 mg de fármaco por quilo e outros trabalhos também mostram sua eficácia no tratamento de uveíte posterior em adultos e crianças (WALTON et al.,1998; LALLEMAND et al.,2003; HESSELINK et al.,2004). Embora tenha sido utilizada com sucesso no tratamento de uveíte por mais de 20 anos, os benefícios da ciclosporina são limitados devido aos seus efeitos adversos. (SIMONINI, 2010)

A terapia inicial mais comum para esclerite são anti-inflamatórios não-esteroidais sistêmicos ou esteroidais por via oral. Terapia adicional com imunossupressor é indicada se a inflamação escleral não for controlada com a terapia inicial ou quando a dose de esteróides necessária para controlar a inflamação é inaceitavelmente alta. Agentes imunossupressores sistêmicos tipicamente usados no tratamento da esclerite incluem a ciclosporina, azatioprina, metotrexato e ciclofosfamida e, recentemente, o micofenolato de mofetil (OKHRAVI, 2005; SAINZ DE LA MAZA, 2012).

Segundo Okhravi e colaboradores (2005), uma avaliação da história clínica cuidadosa, exame ocular detalhado, investigação apropriada para a doença ocular, com ou sem doença sistêmica, e uma intervenção precoce com o uso de fármacos imunossupressores, quando necessário, melhoraram o resultado a longo prazo para os pacientes com esclerite.

#### **1.4 Vias de administração de fármacos para tratamento de doenças que acometem o segmento posterior do olho**

Como já comentado anteriormente, o tratamento de doenças do segmento posterior do olho é limitado, de forma significativa, pela dificuldade na liberação de doses eficazes de fármacos para os tecidos alvos. Quatro abordagens podem ser utilizadas para liberar fármacos no segmento posterior. São elas a tópica, sistêmica, intraocular e periocular (GEROSKI, 2000 e THRIMAWITHANA, 2011).

Medicamentos de aplicação tópica podem penetrar no olho por meio do cruzamento da conjuntiva e, em seguida, se difundir pela esclera. Por razões anteriormente citadas, essa abordagem não produz níveis terapêuticos de fármaco no vítreo posterior, retina ou coróide. Apesar de a administração sistêmica permitir com que certas concentrações do fármaco cheguem ao segmento posterior, as doses necessárias são altas e estão frequentemente associadas a efeitos adversos sistêmicos significativos (GEROSKI, 2000).

A administração sistêmica também é pouco eficaz visto que a existência da barreira hematorretiniana, constituída pelo endotélio dos capilares da retina que apresenta junções serradas do tipo não fenestrado, impede a entrada de substâncias presentes na circulação sanguínea para a retina (PEYMAN e GANIBAN, 1995). Além disso, a eficiente circulação sanguínea presente nos tecidos oculares posteriores promove a redução da meia-vida dos fármacos no local, diminuindo suas concentrações a níveis inferiores ao terapêutico.

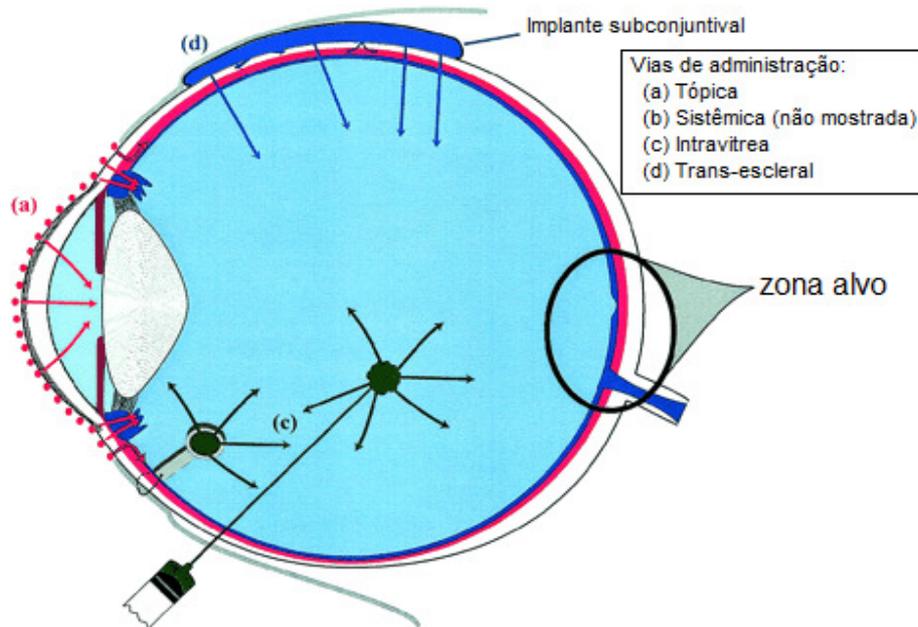
Já a injeção intravítrea constitui uma alternativa à aplicação tópica e à sistêmica. Essa via fornece a abordagem mais direta para liberar fármacos nos tecidos do segmento posterior e atingir seus níveis terapêuticos e trata da administração direta do fármaco ou do medicamento na parte interior do bulbo do olho (Pras et al., 2004). No entanto, fármacos injetados diretamente no vítreo são rapidamente eliminados pelas via posterior (por meio da barreira hemato-retiniana) ou via anterior (por meio de difusão pela câmara posterior e depois drenada pelo humor aquoso), o que acaba por exigir repetidas injeções para manter o nível terapêutico do fármaco e podem não ser bem toleradas pelo paciente. Além disso, podem ocorrer complicações importantes, tais como descolamento de retina, hemorragia, endoftalmite e catarata (PEYMAN e GANIBAN, 1995; JAFFE et al., 1998; GEROSKI, 2000; YASUKAWA et al., 2001; BAEYENS et al., 2006; AMO, 2008; TANGIRI, 2011).

O olho é um órgão privilegiado para a injeção de fármacos ou implantação de sistemas de liberação. As estruturas intraoculares são facilmente (e visualmente) acessíveis e, ao

mesmo tempo, são confinadas e isoladas da circulação pelas barreiras retinianas interna e externa. Essas barreiras permitem uma verdadeira liberação e ação local de produtos ativos (BOURGES et al., 2006). Devido a isso, dispositivos de liberação sustentada intravítrea têm sido usados para evitar injeções repetidas. O mais conhecido desses dispositivos é o implante Vitrasert<sup>®</sup> (ganciclovir), utilizado no tratamento de infecção por citomegalovírus. Esses sistemas de liberação sustentada intravítrea, são as novas modalidades de liberação de fármacos e oferecem tratamentos eficazes contra doenças oculares devastadoras. Entretanto, os dispositivos necessitam de cirurgia para implantação, e nos casos de implantes não biodegradáveis, estes devem ser retirados do olho também de forma cirúrgica. Além disso, essas cirurgias acabam por se tornar potenciais causadores de efeitos secundários semelhantes aos associados com a injeção intravítrea (GEROSKI, 2000).

A via subconjuntival (ou periocular) vem sendo utilizada para liberar fármacos no segmento posterior do olho por meio de injeções ou implantação de dispositivos de liberação sustentada. Essa abordagem seria mais segura e menos invasiva do que a injeção intravítrea e também ofereceria um grande potencial para a liberação do fármaco de maneira mais localizada. A liberação por esse vetor seria idealmente trans-escleral, podendo tirar vantagem da grande área de superfície da esclera (GEROSKI, 2000; OGURA, 2001; THRIMAWITHANA, 2011).

Na **Figura 1.4** está ilustrado um esquema com as principais vias de administração de fármacos no segmento posterior do olho.



**Figura 1.4 - Vias de administração para tratamento de doenças do segmento posterior do olho. Tópica (a), sistêmica (b), injeções e implantes intra vítreos (c), trans-escleral (subconjuntival ou periocular) (d).**

Fonte: Adaptação de Drug Delivery for Posterior Segment Eye Disease Geroski H. Geroski and Henry F. Edelhauser, Investigative Ophthalmology & Visual Science, April 2000, Vol. 41, No. 5

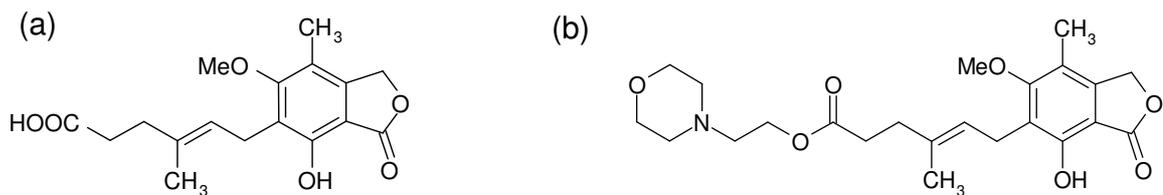
## 1.5 Ácido micofenólico

### 1.5.1 Histórico

Apesar de figurar como um novo fármaco imunossupressor para transplante, o ácido micofenólico (MPA, do inglês mycophenolic acid) foi isolado em 1896 a partir de cultura de *Penicillium* e purificado em 1913. Na década de 1940, sua atividade antibacteriana e antifúngica foi reconhecida. No entanto, o ácido micofenólico ficou praticamente esquecido até o final dos anos 60. Nessa época, foram demonstrados seus efeitos antiproliferativos. Além disso, o ácido apresentou uma importante atividade antitumoral *in vitro*. Por esse motivo, começou a ser utilizado em pacientes portadores de tumores malignos, mas sem o sucesso esperado. O interesse em utilizar esse fármaco como agente antitumoral foi tão importante que diversas tentativas foram feitas para se alterar quimicamente a sua estrutura, visando reduzir seu efeito imunossupressor previamente

observado. O MPA foi, então, empregado com sucesso para o tratamento de formas graves de psoríase (na dose de 3 g/dia). Todavia, o uso prolongado foi responsável por um aumento das infecções virais, confirmando sua atividade imunossupressora.

Somente em 1982 o MPA começou a ser seriamente considerado como agente imunossupressor, a partir de pesquisas realizadas pelo laboratório farmacêutico Syntex. Com o objetivo de melhorar sua biodisponibilidade, um pró-fármaco foi desenvolvido, o micofenolato de mofetila (MMF, do inglês mofetil mycophenolate), que é o éster morfetila do MPA. O MMF é biotransformado em MPA para desempenhar os efeitos farmacológicos, porém, com biodisponibilidade duas vezes maior. As estruturas químicas do MPA e do MMF são mostradas na **Figura 1.5**.



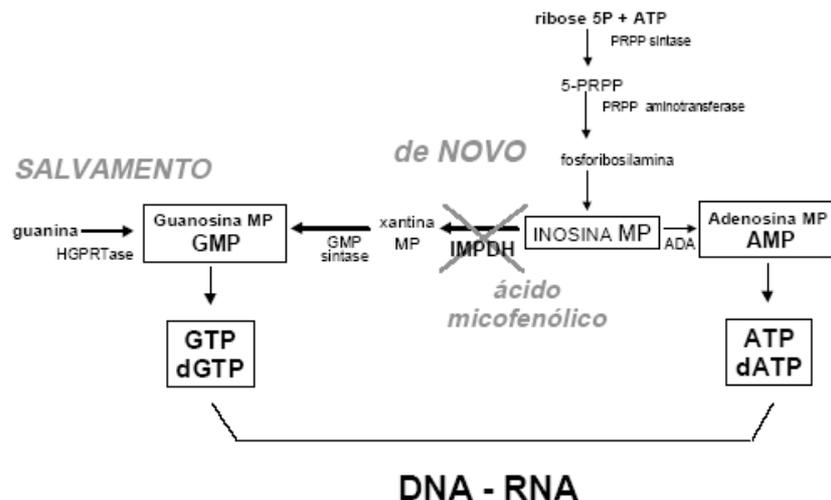
**Figura 1.5-** (a) Ácido micofenólico (MPA) e (b) Micofenolato de mofetila (MMF).

Em 1987, começou-se a utilizar o MMF em transplantes experimentais com sucesso. Na década de 90 surgem os primeiros resultados do uso do MMF em pacientes submetidos a transplante renal, também com sucesso. Recentemente, a Syntex foi incorporada pela ROCHE e o MMF foi apresentado com o nome comercial de CellCept<sup>®</sup>. O MMF foi aprovado em 1995 pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso em pacientes submetidos a transplante renal nos Estados Unidos (NORONHA et al., 1997). O Comitê de Produtos Medicinais para uso Humano (Committee for Medicinal Products for Human Use – CHMP) recomenda a aprovação do CellCep<sup>®</sup> para o uso em profilaxia de rejeição em transplantes de rim, fígado e coração (EUROPEAN PUBLIC ASSESSMENT REPORT, 2007).

Quanto ao mecanismo de ação, o MPA é um fármaco antiproliferativo que age na biossíntese das purinas. Mais especificamente, é um potente inibidor, não competitivo,

da enzima inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), que é uma enzima-chave da *via de novo* da biossíntese das purinas. Como mostrado na **Figura 1.6**, existem duas vias principais envolvidas na síntese das purinas: a *via de novo* e a *via de salvamento*. A inibição do IMPDH pelo MPA leva ao bloqueio da síntese de nucleotídeos de guanósina (GTP e dGTP), que são substratos para a síntese de DNA e RNA. Dessa forma, ocorre inibição da síntese de DNA e RNA e, conseqüentemente, da proliferação celular. Um aspecto interessante e de crucial importância é o fato de que linfócitos T e B dependem predominantemente da *via de novo* para sua multiplicação. Assim, o uso do MPA resulta numa potente inibição da proliferação linfocitária.

*In vitro*, o MPA é um potente inibidor da proliferação de linfócitos T e B. O bloqueio da proliferação linfocitária ocorre mesmo quando o fármaco é adicionado 72 h após o início da cultura (ou seja, inibe a proliferação mesmo em células já ativadas). Por outro lado, quando o MPA é retirado do meio de cultura, as células voltam a proliferar, demonstrando que a inibição induzida pelo fármaco é reversível. O MPA inibe ainda a geração de linfócitos T citotóxicos e a produção de anticorpos por linfócitos B. (NORONHA et al., 1997).



**Figura 1.6 - Metabolismo das purinas**

Fonte: NORONHA et al. (1997, p.399).

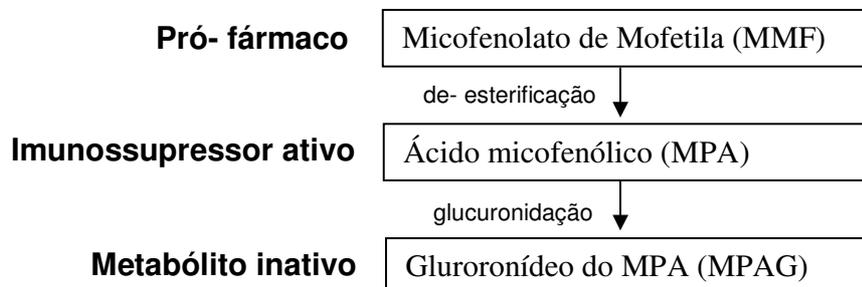
## 1.5.2 Farmacocinética

### 1.5.2.1 Absorção

O MPA é pobremente absorvido quando administrado por via oral. A biodisponibilidade do MMF por essa mesma via é de aproximadamente 94%. Praticamente todo MMF absorvido é convertido em MPA.

### 1.5.2.2 Metabolismo, distribuição e excreção

O MMF é um pró-fármaco. Após administração por via oral ou endovenosa, é rapidamente convertido em MPA (que é o imunossupressor ativo) pela ação de esterases plasmáticas (**Figura 1.7**). O MPA por sua vez, é metabolizado principalmente no fígado, formando o glucoronídeo do ácido micofenólico (MPAG), que é farmacologicamente inativo.



**Figura 1.7 - Metabolismo do MMF**

Fonte: NORONHA et al. (1997, p.400).

Uma hora após a administração oral de MMF ocorre um pico de concentração plasmática de MPA, sendo que a alimentação concomitante pode atrasar esse pico. Em seguida, observa-se um declínio da concentração plasmática até que ocorra o aparecimento de um segundo pico plasmático, observado 6 a 12 horas após a administração de MMF, sugerindo recirculação entero-hepática. A meia-vida do fármaco é de aproximadamente 17 horas (NORONHA et al., 1997).

A atividade farmacológica do MPA parece ser dependente da concentração do fármaco não ligado à albumina, de maneira que a concentração de albumina plasmática pode afetar sua ação.

Após administração, 93% do fármaco é eliminado na urina (sendo a maior parte como MPAG), enquanto 6% é eliminado pelas fezes. Fármacos excretados por secreção tubular como aciclovir e ganciclovir podem inibir a eliminação do MPAG por competição da secreção tubular renal (NORONHA et al., 1997).

Dados sobre a concentração de MPA no vítreo após administração oral, assim como conhecimentos sobre a cinética intraocular desse fármaco, são ainda inexistentes na literatura.

### **1.5.3 Usos terapêuticos**

O MMF tem sido utilizado sozinho ou em associação com outros agentes imunossupressores para a prevenção e o tratamento de doenças auto-imunes (SEN et al., 2003). Sua eficácia também já foi estabelecida no combate à rejeição de órgãos transplantados (RATHORE et al., 2009).

O MMF também tem sido utilizado no tratamento de artrite reumatóide, com melhora significativa em pacientes em que a doença é refratária a outros fármacos anti-reumáticos. O seu uso, com sucesso, também foi reportado para o tratamento de anemia hemolítica auto-imune (LARKIN e LIGHTMAN, 1999).

#### **1.5.3.1 Usos terapêuticos em oftalmopatias**

Chanaud e colaboradores, em 1995, mostraram a eficiência do MMF na inibição da uveíte auto-imune induzida em ratos. Nesse estudo, foi proposto que o melhor efeito do fármaco se dava por meio da inibição da adesão entre células inflamatórias e a parede

dos vasos, prevenindo a acumulação de células inflamatórias nos sítios de inflamação assim como suprimindo a proliferação linfocitária.

Outros trabalhos publicados também vêm evidenciando o MMF como um fármaco eficaz no controle da uveíte e inflamações oculares. Em 1998, Kilmartin e colaboradores reportaram caso de uma série de pacientes que não possuíam resposta ao tratamento com imunossuppressores clássicos, e que foram tratados com sucesso por MMF. Larkin e Lightman (1999) acompanharam a diminuição da inflamação ocular em 10 de 11 pacientes tratados com MMF, sugerindo que o uso desse fármaco poderia ser útil no controle de doenças inflamatórias em seres humanos. Baltatzis e colaboradores (2003) relataram o tratamento de 54 pacientes que sofriam de inflamação ocular crônica com MMF oral, sendo observada uma melhora significativa em 35 pacientes. Lau e colaboradores (2003) relataram o controle da inflamação ocular em 10 pacientes de 14 tratados com MMF. Sen e colaboradores (2003) concluíram em seu estudo que o MMF pode ser útil no tratamento de esclerites e pode melhorar o resultado terapêutico em pacientes que antes eram tratados apenas com anti-inflamatórios. Hatton e colaboradores (2005) reportaram o sucesso no tratamento de inflamação ocular idiopática com o uso de prednisona e MMF. Rathore e colaboradores (2009) descreveram um estudo em que todos os 10 pacientes tratados com MMF para tratamento de uveíte posterior obtiveram significante melhora. Simonini e colaboradores (2010) realizaram um levantamento bibliográfico sobre o tratamento de uveíte em crianças. Nesse estudo, embora o número de casos seja reduzido, o uso do MMF aparece como uma opção farmacológica eficaz no controle da doença. Doycheva (2011) e colaboradores também relatam sucesso no tratamento de uveíte posterior para a maioria de seus pacientes.

## **1.6 Implantes poliméricos**

Define-se como sistema de liberação modificada (SLM) todo sistema que disponibiliza o medicamento de forma diferente do perfil de liberação convencional (ANSEL et al., 2005).

Dentre as diferentes definições de SLM - também chamados de sistemas de liberação controlada -, a liberação do fármaco pode ocorrer de forma prolongada, sustentada, repetida, ou apresentar dois ou três perfis simultaneamente. Na liberação repetida (SLR), o fármaco é liberado em taxas semelhantes em cada intervalo de tempo. Na liberação sustentada (SLS), o fármaco é liberado de forma que mantenha constante a taxa de liberação em um determinado intervalo de tempo e na liberação prolongada (SLP) por um período de tempo maior quando comparado com os sistemas convencionais (AULTON, 2001).

Entre os sistemas de liberação modificada, os implantes poliméricos biodegradáveis são sistemas viáveis para o tratamento de doenças oculares do segmento posterior, uma vez que disponibilizam o fármaco no tecido alvo e minimizam consideravelmente os seus efeitos indesejáveis (GILGER et al., 2000; DONG et al., 2006; JAFFE et al., 1998).

O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (SLF) é um campo inovador quando se trata de utilização de polímeros que permitem a liberação sustentada (dias, semanas, meses ou anos) e direcionada (a um tumor, um tecido local ou até mesmo a um local específico da circulação sanguínea). O interesse surgiu na década de 80, objetivando o direcionamento da terapia proteica como forma de substituição dos métodos que empregavam injeções proteicas locais. Griffith (2000) comenta a aplicabilidade futura desses sistemas para diversas terapias e considera os polímeros como materiais promissores para o desenvolvimento de diversos SLF. Encontra-se também descrita a utilização de polímeros no campo da oftalmologia, seja como substituintes de tecidos naturais ou em SLF.

Historicamente, Michelson e colaboradores (1979), citados por Peyman e Ganiban (1995, p. 114), desenvolveram o primeiro sistema de liberação sustentada para via ocular contendo o fármaco gentamicina, como sendo uma minibomba osmótica de implantação subconjuntival para o tratamento de endoftalmites. Esse sistema foi implantado em ratos por meio de incisão do bulbo do olho e houve a liberação de 0,01

mg de fármaco por mL de humor vítreo em um período de quatro dias e meio. Posteriormente, outros implantes foram desenvolvidos objetivando o tratamento de retinite causada por citomegalovírus (CMV), endoftalmite, vitreoretinopatia proliferativa, reinites virais e uveítes, apresentando resultados satisfatórios quanto ao perfil de liberação controlada de fármacos (Peyman e Ganiban, 1995; Colrhurst et al., 2000).

A satisfatória aplicabilidade dos implantes intraoculares poliméricos torna-se viável visto que são considerados sistemas inertes, atóxicos, não cancerígenos, hipoalergênicos e não causadores de respostas inflamatórias no local da aplicação (ATHANASIOU et al., 1996).

Os sistemas compostos por polímeros não-biodegradáveis precisam ser removidos posteriormente por processos cirúrgicos enquanto os biodegradáveis são totalmente absorvidos pelo organismo, o que torna a remoção desnecessária e proporciona, dessa forma, uma maior adesão e aceitação do paciente ao tratamento (YASUKAWA et al., 2001).

Talvez a única vantagem dos implantes não-biodegradáveis sobre os biodegradáveis esteja no controle da liberação. A saída do fármaco pode ser melhor controlada quando são utilizados polímeros não-biodegradáveis, pois perfis de liberação mais homogêneos e prolongados são conseguidos uma vez que a matriz não se degrada. (AMO 2008 e THRIMAWITHANA 2011).

Os polímeros normalmente utilizados para a fabricação de implantes não-biodegradáveis são derivados do álcool polivinílico (PVA, do inglês Polyvinyl alcohol) e de acetato de vinil etileno (EVA, do inglês Ethylene vinyl acetate) (THRIMAWITHANA 2011).

Atualmente, existem dois implantes intravítreos não-biodegradáveis em uso clínico denominados Vitrasert<sup>®</sup> e Retisert<sup>®</sup>. Vitrasert<sup>®</sup> contém ganciclovir (com liberação em até

oito meses) para o tratamento de retinite por citomegalovírus e é a terapia de suporte principal para pacientes com esta doença. Um estudo de Much e colaboradores (1997) demonstrou diferença significativa entre um grupo tratado com implantes e outro grupo tratado por via intravenosa. A mediana do tempo para a progressão da doença no grupo dos implantes foi mais de duas vezes superior do que a do grupo com tratamento IV (196 dias versus 71 dias, respectivamente). O Retisert<sup>®</sup>, que contém acetono de fluocinolona, é utilizado para o tratamento de uveíte não infecciosa crônica posterior. Esse sistema de reservatório libera fluocinolona por um período de até 2,5 anos. Nos estudos clínicos, foi demonstrada uma diminuição significativa da recorrência da doença em olhos tratados com Retisert<sup>®</sup> (de 51,4% para 6,1% pós-implantação) e também uma redução da necessidade de terapia adjuvante (JAFFE 2006).

### **1.6.1 Implantes poliméricos biodegradáveis de aplicação intraocular**

Os sistemas de liberação de fármacos são obtidos a partir de polímeros biodegradáveis sintéticos tais como poliamidas, poliaminoácidos, polialquilacrilatos, poliésteres, poliortoésteres, poliuretanos e poliácilamidas ou não-biodegradáveis como derivados de celulose, silicones, polímeros acrílicos, polivinilpirrolidona e copolímeros dos óxidos de etileno e propileno.

Os polímeros biodegradáveis mais utilizados atualmente são os poliésteres, tais como a poli ( $\epsilon$ -caprolactona), o poli (ácido láctico) (PLA) e o copolímero ácido láctico / ácido glicólico (PLGA), sendo que os dois últimos têm sido amplamente empregados (FIALHO, 2003a).

Copolímero ácido láctico / ácido glicólico foi utilizado para o desenvolvimento de alguns implantes intra-oculares. Kunou e colaboradores (1995) avaliaram o perfil de liberação de implantes a partir dos polímeros poli (DL- láctico) (PLA) e poli (DL-láctico-co-glicólico) (PLGA) contendo diferentes concentrações de ganciclovir (GCV). Os autores observaram que o implante de PLA contendo 10% p/p de GCV apresentou um período de liberação, *in vitro*, de 6 meses. O implante de PLGA contendo 25% p/p de GCV,

testado por meio da administração em coelhos, apresentou um período de permanência no corpo vítreo de três meses e na retina e coroide, de cinco meses. A concentração do fármaco encontrada na retina e coróide foi superior à encontrada no corpo vítreo.

Konu e colaboradores (1995) afirmam que a liberação do fármaco está relacionada com a característica do próprio sistema e acontece devido às diversas alterações que ocorrem nos materiais. Uma vez administrados em animais, esses sistemas se encontram em contato com a cavidade vítrea. Em função disso, a velocidade de difusão do fármaco para os meios biológicos e a taxa de eliminação também dependerão das características do compartimento vítreo.

Jaffe e colaboradores (1998) mostraram a eficácia da Ciclosporina A no tratamento de uveíte induzida em ratos quando administrada por meio de um sistema de liberação intraocular a base de polímeros não biodegradáveis. Os autores observaram que o implante presente na cavidade vítrea era capaz de inibir a manifestação da uveíte durante um período de seis meses em animais. Entretanto, uma extrapolação da liberação do fármaco foi calculada e os pesquisadores concluíram que o dispositivo seria capaz de atuar por um período superior a nove anos.

Zhou e colaboradores (1998) desenvolveram um implante para o tratamento de vitreoretinopatia proliferativa (PVR), composto de PLGA 50:50. Esse implante apresenta três segmentos cilíndricos, cada um contendo os seguintes fármacos: 5-fluorouridina (5-Furd), triancinolona (Triam) e um agente trombolítico (t-PA). Com o objetivo de promover um período de latência para liberação do fármaco no momento adequado e, também, para reduzir o risco de sangramento pós-operatório, a porção do implante contendo o t-PA foi revestida com PLGA. Os resultados mostraram que o 5-Furd e o Triam foram liberados na taxa de 1,0 µg/dia por mais de quatro semanas e de 10,0-190,0 µg/dia por mais de duas semanas, respectivamente. Após um período de latência de cerca de dois dias, o t-PA foi liberado ativo na taxa de 0,2-0,5 µg/dia durante duas semanas.

Sakurai e colaboradores (2003) avaliaram a eficácia da administração de um implante biodegradável constituído de PLGA em diferentes proporções, contendo tacrolimus, para o tratamento de uveítes experimentais em ratos. O polímero na proporção de 50:50 e massa mola de 63000 dalton (Da) apresentou uma rápida liberação do fármaco. Os autores observaram que o implante, além de ser efetivo na supressão da uveíte e liberar o fármaco de forma contínua, apresentou uma liberação do fármaco na cavidade vítrea dependente do tamanho da cadeia polimérica e da massa molar do polímero.

Okade e colaboradores (2003) demonstraram a lenta biodegradação do implante intra-escleral constituído de poli (DL-lactato) contendo fosfato de dexametasona. A concentração atingida no corpo vítreo, coróide e esclera foi capaz de suprimir respostas inflamatórias por mais de oito semanas. Os autores também observaram que a taxa de eliminação do fármaco no corpo vítreo foi maior do que na esclera e coróide.

A vantagem da utilização de implantes poliméricos biodegradáveis frente às demais formas de tratamento da uveíte posterior foi observada, por exemplo, por Jaffe e colaboradores (2000) ao verificar uma melhora no quadro da doença em pacientes tratados com um implante intraocular de fluocinolona. Outro trabalho com objetivo semelhante foi realizado por Gilger e colaboradores (2000), no qual a aplicação intravítrea de implantes de acetato de viniltileno contendo ciclosporina A mostrou-se eficaz para o tratamento da uveíte.

Jaffe e colaboradores (2006) avaliaram a eficácia e segurança do implante intraocular de acetato de fluocinolona (Retisert<sup>®</sup>) para o tratamento de uveítes posteriores não infecciosas. Os efeitos indesejáveis como catarata e aumento da pressão intraocular observados apresentaram-se inferiores quando comparado com a administração sistêmica de formulação contendo o fármaco. Dong e colaboradores (2006) mostraram a possibilidade de tratamento da uveíte posterior em coelhos a partir de implantes intraoculares constituídos do polímero sintético ácido láctico-co-glicólico-co-policaprolactona contendo ciclosporina A.

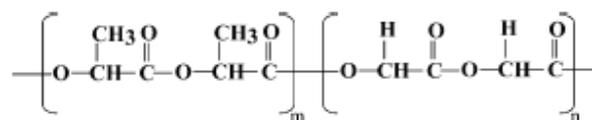
A fim de elucidar o mecanismo de liberação de fármacos na cavidade vítrea a partir de um sistema polimérico, Tojo e colaboradores (2001) propuseram um modelo que visa descrever a cinética de liberação e eliminação de fármacos. Os autores estudaram o perfil de liberação de fármacos no corpo vítreo de ratos por meio de sistemas de liberação, como PLA, contendo ganciclovir ou dexametasona.

Como observado a partir da revisão da literatura, os sistemas de liberação modificada para tratamento de doenças do segmento posterior do olho têm ganhado importância nas pesquisas atuais. Além disso, os implantes poliméricos de aplicação intraocular contendo fármacos imunossupressores mostram-se sistemas promissores no tratamento de doenças oftálmicas.

### 1.7 PLGA

A possibilidade de liberação prolongada de fármacos a partir de matrizes poliméricas está relacionada com as características intrínsecas de cada polímero.

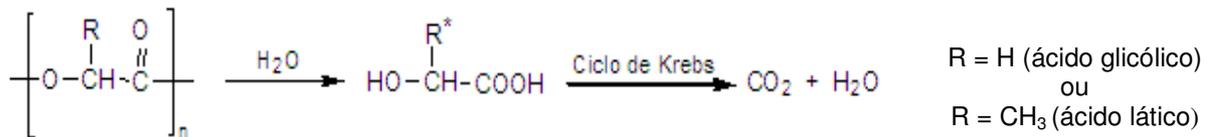
O copolímero ácido láctico / ácido glicólico é um poliéster inerte, não carcinogênico e biodegradável, cuja principal característica é a ligação éster presente entre os monômeros (**Figura 1.8**). Segundo Merkli e colaboradores (1998), esses copolímeros apresentam cadeias lineares, saturadas e comportamento termoplástico. Eles possuem um centro assimétrico, apresentado pelo ácido láctico (PLA) em uma mistura racêmica (D,L-PLA) ou por uma das suas formas levógira (L-PLA) e dextrógira (D-PLA), ligados de forma alternada ao polímero ácido glicólico (PGA). Segundo o mesmo autor, o copolímero encontra-se no estado amorfo, quando é constituído apenas da forma racêmica D,L-PLA.



**Figura 1.8 - Estrutura química do copolímero ácido láctico / ácido glicólico.**

Fonte: Loo et al. (2004, p.260).

A biodegradação desses polímeros ocorre por erosão superficial, por meio da clivagem da cadeia polimérica por hidrólise, liberando o ácido lático e glicólico (**Figura 1.9**). Esses ácidos, por serem metabólitos naturais do organismo, são eliminados pelo ciclo de Krebs na forma de gás carbônico e água.



\* Os produtos de degradação: (1) Ácido lático (caso o polímero seja PLA), (2) Ácido glicólico (polímero de origem PGA), (3) Ambos (polímero de origem PLGA).

**Figura 1.9 – Etapas de hidrólise do PLA, PGA ou PLGA.**

Fonte: Merkli et al. (1998, p. 569).

Os comportamentos *in vitro* e *in vivo* dos diferentes copolímeros são influenciados pelas proporções de ácido lático e glicólico no material. Os dados estão listados na **Tabela 1.1**.

O polímero PLGA na proporção 75:25 (PLGA 75:25), constituído por 75% PGA e 25% de D,L PLA, apresenta transição vítrea na temperatura de 60°C (**Tabela 1.1**), estado amorfo e degradação em um período de dois meses, características que validam sua aplicação em SLF.

**Tabela 1.1 - Propriedades do copolímero ácido lático / ácido glicólico.**

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 superfície, porosidade e massa molar do sistema.

Fonte: Lewis et al. (1990)

## 1.8 Implantes intraoculares de PLGA

Matrizes poliméricas à base do PLGA contendo fármacos foram desenvolvidas, caracterizadas e avaliadas com sucesso. Alguns estudos demonstraram o uso de implantes intraoculares para tratamento de doenças do segmento posterior do bulbo ocular (**Tabela 1.2**). Implantes oculares (biodegradáveis ou não) contendo MPA ainda não são descritos na literatura.

**Tabela 1.2 – Levantamento bibliográfico sobre o uso de implantes intraoculares de PLGA.**

Referência bibliográfica	Pesquisa
Konu et al.,1995	Avaliaram sistemas de liberação intraocular à base de poli (DL-lactato) (PLA) e poli (DL-lactato-co-glicolato) (PLGA) contendo diferentes concentrações de aciclovir (GCV)
Jaffe et al.,1998	Mostraram a eficácia da ciclosporina no tratamento de uveíte induzidas em ratos quando administrada por meio de um sistema de liberação intraocular
Zhou et al., 1998	Desenvolveram um implante para o tratamento de vitreoretinopatia proliferativa (PVR), composto de PLGA 50:50, constituído de três segmentos cilíndricos, cada um contendo os seguintes fármacos: 5-fluorouridina (5-Furd), triancinolona (Triam) e um agente trombolítico (t-PA)
Sakurai et al., 2003	Avaliaram a eficácia da administração de um implante biodegradável constituído de PLGA em diferentes proporções contendo tacrolimus no tratamento de uveítes experimentais em ratos.
Fialho et al., 2007	Avaliaram a liberação e a farmacocinética intravítrea de dexametasona a partir de um implante com matriz de PLGA. Os resultados mostraram liberação do fármaco dentro da faixa terapêutica estabelecida, ainda que o dispositivo causasse danos aos tecidos intraoculares.

**Continuação Tabela 1.2**

Saliba et al., 2008	Avaliaram o tempo de liberação de implantes poliméricos de PLGA contendo ciclosporina A para o tratamento de uveíte.
Peng et. al., 2010	Verificaram a biodegradação e a biocompatibilidade de microfilmes subconjuntivais constituídos de PLGA e poli caprolactona
Yang et. al., 2011	Verificaram a eficácia de implantes de PLGA contendo vorivconazol para o tratamento de endofiltalmite.

### **1.9 Métodos bioanalíticos para a quantificação de fármacos em amostras biológicas**

Métodos bioanalíticos para quantificação de fármacos e seus metabólitos em amostras biológicas exercem um papel importante na avaliação e interpretação de dados sobre biodisponibilidade, bioequivalência e farmacocinética (BRESSOLE et al., 1996).

O desenvolvimento de métodos bioanalíticos envolve a avaliação e otimização de vários estágios, que envolvem o preparo da amostra, separação cromatográfica, detecção e quantificação (CAUSON, 1997).

A análise cromatográfica de substâncias presentes em matrizes biológicas, como soro, plasma e urina, em geral, requer um tratamento prévio da amostra. As razões para isso são inúmeras, destacando-se a complexidade das matrizes biológicas, a presença de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas e a baixa concentração das substâncias a serem analisadas (QUEIROZ et al., 2001).

Enquanto a análise cromatográfica consiste, predominantemente, de um processo automático, o pré-tratamento da amostra, na maioria dos casos, é realizado manualmente. Com isso, o tratamento prévio pode necessitar de maior tempo para

desenvolvimento do método e análises rotineiras, comparando-se a separação cromatográfica e análise dos dados (SNYDER et al., 1997).

A utilização de técnicas de extração e/ou pré-concentração devem ser avaliadas, visando adequada recuperação do analito de forma prática e economicamente viável. As técnicas mais comumente utilizadas para extração e/ou concentração de compostos presentes em fluidos biológicos são extração líquido-líquido, extração em fase sólida e precipitação de proteínas (QUATTROCCHI et al., 1992; QUEIROZ et al., 2001; SNYDER et al., 1997).

Alguns métodos para quantificação do MPA em amostras biológicas são mostrados na **Tabela 1.3.**

**Tabela 1.3 - Metodos de quantificação de MPA.**

Referência	Extração	Fase Móvel	Coluna	Detecção
Bahrami e Mohammadi (2006)	Líquido-Líquido	Metanol/Fosfato de sódio 0,05 mol/L (46:54) pH 2,5	Fenila	UV (254nm)
Biancamano et al (2007)	Fase sólida	Água contendo 0.5% de ácido acético e 3 mM de formiato de amônio (A). Metanol com 3 mM formiato de amônio (B). Gradiente variando a proporção de (B) de 65 a 85%	C18	Espectrômetro de massas
Brandhorst et al (2006)	Precipitação de proteínas	Acetonitrila/Metanol/ Acetato de amônio (0,2 mMol/L) e ácido fórmico 0,244 g/L. (17:52:31) pH 3,0	C18	Espectrômetro de massas

### **1.10 Validação de métodos bioanalíticos**

A validação de um método bioanalítico é o processo utilizado para garantir que os parâmetros analíticos estão adequados para o uso pretendido, garantindo a confiabilidade dos resultados. A quantificação de analitos em matrizes biológicas é suscetível a um grande número de variáveis, de forma que o processo de validação de métodos cromatográficos aplicados em bioanálise é mais minucioso (CAUSON, 1997).

No processo de validação de métodos para determinação quantitativa de fármacos e/ou metabólitos em matrizes biológicas, devem ser avaliados os parâmetros linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, robustez, recuperação e estabilidade do fármaco em líquidos biológicos. A análise de todas as amostras de um analito em matriz biológica deve ser concluída dentro de um período de tempo para o qual a estabilidade tenha sido determinada (BRASIL, 2003).

## **2 Justificativa**

Doenças visuais são consideradas problemas de saúde pública significativos e estão associadas com morbidade ocular e baixa qualidade de vida. Evidências emergentes sugerem que os problemas relacionados à visão podem ser também considerados marcadores de mortalidade (FOONG et al., 2008).

De acordo com estimativas da prevalência de deficiências visuais e suas causas divulgadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), globalmente, o número estimado de pessoas com deficiências visuais é de 314 milhões, sendo 45 milhões de indivíduos cegos e 124 milhões com baixa visão (WHO, 2010).

A capacidade visual diminuída tem impacto psicológico e econômico direto na vida das pessoas. Adicionalmente, certos tipos de doenças oculares, associadas à idade, têm sido mostradas como um dos fatores mais crônicos na diminuição produtiva da população norte americana (KNUDTSON et al., 2005).

Na clínica médica, destacam-se doenças que estão associadas à ocorrência de inflamações do olho, tais como a doença de Behçet, síndrome de Reiter, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada, toxoplasmose, sífilis, tuberculose, meningite, orbitopatas de Graves, neoplasias, hipertensão arterial, arteriosclerose, retinopatia diabética, uveíte, lúpus eritematoso sistêmico e psoríase (BENNETT e CECIL, 1997). Dentre as consequências desses estados inflamatórios, está a possibilidade de instalação da uveíte, que leva à cegueira. Conforme Hesselink et al. (2004), estima-se que a uveíte seja responsável por 3 a 15% de todas as causas de cegueira no mundo, cuja manifestação ocorre em 70 a 90% dos pacientes na fase de atividade profissional, levando a um impacto sócio-econômico. Por exemplo, os Estados Unidos gastam 242,6 milhões de dólares anuais com o tratamento da doença.

O tratamento de oftalmopatias que acometem o segmento posterior do olho é dificultado pela presença de barreiras naturais do órgão, as quais são constituídas pela córnea, conjuntiva e sistema hematorretiniano. No caso da necessidade de adotar tratamentos que exigem a penetração tecidual de fármacos, as formas farmacêuticas convencionais falham em disponibilizá-los na cavidade vítrea. Outro fator de dificuldade está relacionado à utilização de fármacos que causam efeitos adversos no organismo, ou terapias de alto custo, como as frequentes injeções intravítreas, que muitas vezes levam o paciente a abandonar a terapia prescrita. Uma alternativa para o tratamento é o desenvolvimento de implantes intraoculares, utilizando polímeros biodegradáveis contendo fármacos para o tratamento de diversas doenças que acometem o segmento posterior do bulbo ocular. Esses sistemas têm como objetivo disponibilizar o fármaco durante um período de tempo prolongado diretamente em seu local de ação e diminuir ou mesmo eliminar os efeitos adversos de aplicações sistêmicas.

A aplicabilidade de polímeros biodegradáveis na medicina vem sendo estudada desde a década de 60. São compostos biocompatíveis com o organismo, ou seja, atóxicos, não cancerígenos, hipoalergênicos e que não causam respostas inflamatórias no local da aplicação. São largamente utilizados como constituintes de fios de sutura e como

materiais fixadores de fraturas em substituição aos pinos metálicos (ATHANASIOU et al., 1996).

Entre os fármacos em avaliação para o tratamento da uveíte, destaca-se o MPA, um potente imunossupressor utilizado no tratamento de doenças autoimunes e no tratamento anti-rejeição de órgãos transplantados. Segundo estudo de Teoh e colaboradores (2008), a utilização do MPA no tratamento de pacientes com uveíte não infecciosa no Reino Unido apresentou-se eficaz e bem tolerada.

Neste trabalho, foi desenvolvida uma forma farmacêutica de natureza biodegradável e implantável, contendo o MPA, para o tratamento da oftalmopatias da região posterior. O fármaco já foi veiculado nos implantes em sua forma ativa – MPA - uma vez que a ausência de estearases no vítreo – responsáveis pela conversão do pró-fármaco MMF na forma ativa – impediria a biotransformação. Para tanto, realizou-se estudos de caracterização morfológica e de características físico-químicas, estudos de degradação e estabilidade do sistema proposto, além de estudos *in vivo* para a avaliação farmacocinética e da toxicidade dos implantes. Além disso, como parte deste trabalho, foram desenvolvidos métodos analíticos para a identificação e quantificação do fármaco nos implantes e em material biológico (vítreo de coelhos).

### **3 Objetivo**

#### **3.1 Geral**

Desenvolver e caracterizar uma forma farmacêutica na forma de implante intraocular destinado ao tratamento de oftalmopatias inflamatórias. Essa nova forma farmacêutica deverá ser constituída de uma matriz polimérica biodegradável capaz de liberar o fármaco MPA no olho de forma efetiva e segura.

### 3.2 Específicos

- Desenvolver, caracterizar e produzir implantes obtidos a partir do copolímero biodegradável ácido lático / ácido glicólico (PLGA 75:25) contendo o MPA;
- Realizar estudos de estabilidade intrínseca dos implantes obtidos;
- Desenvolver e validar um método analítico por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC, do inglês Ultra performace liquid chromatography) para quantificação do MPA presente nos implantes e determinação dos seus produtos de degradação;
- Desenvolver método bioanalítico para a determinação do MPA em vítreo de coelhos por cromatografia líquida acoplada a detector de massas em tandem com ionização por eletronspray (HPLC-ESI-MS/MS, do inglês High performance liquid chromatography-Eletronspray-Mass) para realização de um estudo farmacocinético intraocular.

# **CAPÍTULO 2**

**Desenvolvimento e caracterização  
dos implantes de PLGA contendo  
ácido micofenólico**

## **1 Materiais e Métodos**

### **1.1 Materiais**

#### **1.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras**

- Ácido micofenólico SQR (pureza 98%) (Sigma Aldrich – Missouri – Estados Unidos).
- Copolímero ácido láctico / ácido glicólico na proporção de 75:25: viscosidade intrínseca aproximada de 0,8 – Resomer RG 756, Boehring Ingelheim, Alemanha.
- Coelhos fêmeas da raça *New Zealand*, idade média de 4 meses e peso entre 2,0 e 2,5 kg.

#### **1.1.2 Reagentes e vidraria**

- Reagentes em grau analítico (diclorometano, acetonitrila, álcool polivinílico, cloreto de sódio).
- Água destilada e deionizada.
- Tubos de centrífuga com fundo cônico (tipo Falcon) de 15 e 50 mL.
- Microtubos de 1,5 e 2 mL (tipo Eppendorf).
- Pipetas e balões volumétricos calibrados.
- Béqueres, provetas, Erlenmeyers e kit de filtração de fase móvel.

#### **1.1.3 Equipamentos**

- Banho de ultrassom Branson
- Balança analítica SARTORIUS modelo BP 211D com precisão de 0,01 mg.
- Agitador tipo vórtex.
- Liofilizador (E-C MODULYO, E-C Apparatus Inc. EUA).
- Dispersor tipo Ultra Turrax-T 25 (IKA).
- Centrífuga Himac CR 21 (Hitachi)
- Agitadores e barras magnéticas.

- Paquímetro.
- Pipetas automáticas Gilson monocanal modelos P20, P200 e P1000.
- Repipetador automático Brand HandyStep® eletrônico.
- Centrífuga refrigerada Jouan modelo MR23i.
- Freezer Revco -70 °C.
- Refrigerador Cônsul 240.
- Sistema de purificação de água Milli-Q-Plus MILIPORE®.
- Espectrofotômetro de infravermelho marca - Perkin Elmer, modelo Spectrum 100.
- Calorímetro modelo DSC60 (Shimadzu).
- Calorímetro modelo DTG60 (Shimadzu).
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV – marca JEOL Modelo 6360LV).

## **1.2 Métodos**

### **1.2.1 Preparo dos implantes intraoculares**

Em se tratando de desenvolvimento de formulação, foi verificada inicialmente a possibilidade de produção do implante proposto. Como ainda não existem estudos que determinam a dose de MPA no interior do olho, o desenvolvimento do dispositivo foi iniciado a partir de características de outros já estudados e descritos na literatura. Assim, implantes com tamanho de 6 mm de comprimento por 0,50 mm de diâmetro, de forma similar à descrita por Fialho 2007, foram desenvolvidos. Neste estudo, a proposta foi incorporar 10% de fármaco nos implantes e proceder com sua caracterização.

Para a produção dos sistemas de liberação prolongada de fármacos na forma de implantes, foi proposto desenvolver duas fórmulas: uma com a simples mistura do polímero PLGA 75:25 e o fármaco, e a outra, a partir de microesferas confeccionadas com a mistura da matriz polimérica e o fármaco.

Para a obtenção da mistura física entre a matriz polimérica PLGA 75:25 e o MPA, as duas matérias primas foram pesadas separadamente na proporção de 9:1

(polímero/fármaco) e solubilizadas em quantidade suficiente de acetonitrila. A solução foi congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$  e liofilizada por dois dias para se obter uma massa homogênea.

As microesferas contendo MPA foram obtidas a partir da adaptação do método da emulsão simples óleo em água (O/A) seguido da evaporação do solvente. Nesse método, fármaco e polímero foram pesados separadamente na proporção de 9:1 (polímero/fármaco) e solubilizados em quantidade suficiente de diclorometano (para 100 mg de mistura polímero e fármaco, foram utilizados 10 mL de solvente). Essa solução foi vertida em uma solução aquosa de PVA a 0,5% (p/v) sob agitação vigorosa em ultra turrax, a 10000 rpm, por cinco minutos, obtendo-se então uma emulsão (O/A). Essa emulsão foi agitada lentamente, a 150 rpm, por mais seis horas para a evaporação do diclorometano e formação de uma suspensão.

A suspensão obtida foi então centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, as microesferas ficaram sedimentadas no fundo dos tubos da centrifuga. Então, microesferas e sobrenadante foram recolhidos em tubos separados, e as microesferas foram lavadas com 50 mL de água destilada por três vezes. O processo de lavagem consistia em ressuspender as microesferas em água destilada e centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes oriundos dos processos de lavagem também foram recolhidos. As microesferas foram congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  e liofilizadas por dois dias até que se obtivesse apenas uma massa branca.

A massa da mistura física e as microesferas foram moldadas na forma de implantes pelo método de moldagem a quente, onde sobre uma placa de Teflon<sup>®</sup> aquecida com temperatura próxima a  $100^{\circ}\text{C}$ , os implantes foram individualmente moldados até obterem uma forma cilíndrica. Com auxílio de uma lâmina e de um paquímetro, os implantes foram cortados nas dimensões pré-estabelecidas (6 mm de comprimento por 0,50 mm de diâmetro).

## **1.2.2 Caracterização dos implantes desenvolvidos**

### **1.2.2.1 Peso médio, tamanho e espessura;**

Os implantes foram avaliados, individualmente, quanto ao tamanho, massa e espessura, para garantir sua uniformidade. Essa etapa foi realizada com auxílio de balança analítica e paquímetro.

### **1.2.2.2 Morfologia da superfície**

Esta etapa foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os implantes obtidos foram metalizadas com ouro e diretamente analisadas no equipamento (JEOL, modelo JSM-6360LV) operado a 15 kV.

### **1.2.2.3. Espectroscopia na região do infravermelho**

A espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 1000. Os espectros das amostras foram obtidos por meio da técnica de Reflexão total atenuada (ATR), na faixa de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ .

Os implantes (amostras), com e sem o fármaco, foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho objetivando confirmar a estabilidade química do MPA após preparação.

### **1.2.2.4 Análise térmica**

Essa etapa foi realizada por análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC, do inglês differential scanning calorimetry) e termogravimetria (TG). Os equipamentos utilizados foram da marca Shimadzu e os modelos foram DSC 60 e DTG 60, ambos do departamento de Química da UFMG. A amostra foi acondicionada em um cadinho de

alumínio hermeticamente fechado, aquecida de -50 a 200°C, em uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto sob atmosfera de nitrogênio, e reaquescida a 400°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto. Nitrogênio à taxa de 20 mL/min foi utilizado como gás de purga.

#### **1.2.2.5 Quantidade de MPA nos implantes - porcentagem de incorporação do fármaco na matriz polimérica**

Essa etapa foi realizada a partir da análise do MPA presente em uma parte do lote dos implantes produzidos (aproximadamente 20% do total de implantes produzidos em cada lote eram separados para esse teste). A análise foi feita com metodologia em UPLC desenvolvida e validada para determinação do fármaco nos implantes. Os dados do método analítico utilizado estão apresentados e discutidos no Capítulo 3.

Para a determinação do teor de MPA presente nos implantes, as análises foram realizadas em triplicata, a fim de se determinar a taxa porcentual. A partir dos valores encontrados referentes à taxa de incorporação, a porcentagem de massa de MPA presente em cada implante foi calculada segundo a equação 2.1:

$$\% \text{ MPA implante} = \text{M. MPA} \times 100 / \text{M. IMP} \quad (\text{eq. 2.1})$$

Em que:

% MPA implante = porcentagem de MPA no implante

M. MPA = massa em mg de MPA no implante

M. IMP = massa final do implante.

#### **1.2.2.6 Estudo de estabilidade dos implantes obtidos**

Um grupo de dezoito implantes foi separado para um estudo de estabilidade logo após sua confecção. Tais implantes foram colocados individualmente em tubos tipo Eppendorf e armazenados em local adequado (com temperatura e umidade controlada, 24 ± 2 °C e 50% ± 15% UR, respectivamente) por período de um ano. Os implantes

foram divididos em seis grupos (três implantes por grupo) e, em intervalos de 0, 1, 3, 6, 9 e 12 meses, foram analisados para verificação de alteração na concentração do fármaco ao longo do tempo, pela mesma metodologia em UPLC para quantificação de MPA utilizada na seção 1.2.2.5.

Os implantes também foram submetidos a uma análise quanto à presença de produtos de degradação do MPA. Nesse caso, a metodologia utilizada foi a mesma descrita no trabalho de Costa 2009 para a identificação de produtos de degradação do MPA. Foi utilizado um cromatógrafo com detector na região do ultravioleta e leitura fixada em 250 nm, coluna cromatográfica C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel constituída de acetonitrila e trietilamina 1% (v/v) em solução aquosa na proporção de 3:7, vazão de 1,5 mL/min., temperatura do forno da coluna a 45 °C e injeção de 10 µL. As amostras utilizadas foram as mesmas preparadas previamente para a quantificação de MPA nos implantes submetidos ao estudo de estabilidade.

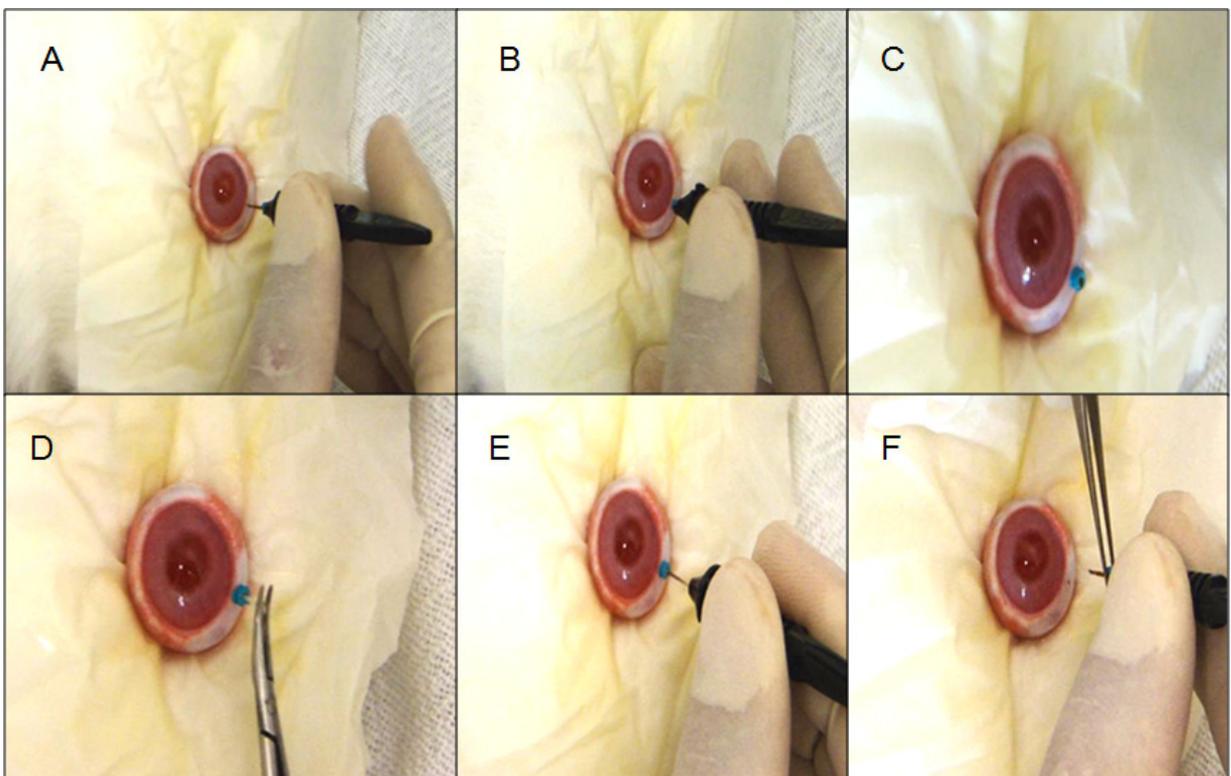
#### **1.2.2.7 Estudo de liberação *in vitro***

Um estudo de liberação *in vitro* foi realizado em câmara incubadora simulando-se as condições fisiológicas do olho. Nesse estudo, seis implantes foram colocados em tubos de vidro (um implante por tubo) contendo 2 mL de tampão fosfato pH 7,4 e mantido a 37°C sob agitação constante de 30 rpm. Em intervalos de sete dias, a solução tampão era retirada e substituída por uma nova. A solução retirada foi então analisada pela metodologia em UPLC, utilizada na seção 1.2.2.5, desenvolvida e validada para doseamento do MPA liberado do implante. Ao fim do estudo, uma curva de liberação de MPA x Tempo foi construída para avaliação da cinética de liberação do fármaco a partir do implante. O estudo durou 15 semanas.

#### **1.2.2.8 Estudo de farmacocinética e de liberação *in vivo* dos implantes**

Os estudos de farmacocinética e de liberação *in vivo* foram realizados empregando-se olhos de coelhos fêmeas da espécie New Zealand, com idade média de 4 meses e peso entre 2,0 e 2,5 kg, conforme procedimento descrito por Fialho (2006). Nesse

procedimento, os novos sistemas desenvolvidos foram inseridos cirurgicamente na cavidade vítrea dos animais com auxílio de uma cânula transescleral de 25 Ga pelo veterinário colaborador deste trabalho, o Doutor Gustavo Oliveira Fulgêncio. Os animais foram previamente anestesiados com injeção muscular de uma mistura de cloridrato de cetamina (30 mg/kg, Ketamin®, 50,0 mg/100 mL, Cristália, Brasil) e cloridrato de xilazina (5,0 mg/kg, Copanize® 2,0 g/100mL, Schering-Plough Coopers, Brasil), com suplementação, caso necessário, de ¼ da dose de cetamina. Fotos das etapas da cirurgia de inserção dos implantes são mostradas na **Figura 2.1**.



**Figura 2.1 – Etapas da cirurgia de inserção dos implantes. (A) introdução do trocarter; (B) término da introdução do trocarter; (C) trocarter inserido trans-esclera; (D) inserção do implante; (E) inserção do implante através da esclerotomia; (F) retirada do trocarter.**

Para garantir um poder de teste adequado, a proposta foi realizar o experimento com no mínimo 60 coelhos divididos em dez grupos contendo seis coelhos cada. Os animais receberam os implantes intraoculares contendo MPA. Em intervalos de tempo de 1, 7, 14, 21, 24, 28 30, 32, 35 e 40 dias, seis animais de um grupo foram eutanasiados com sobredose letal de pentobarbital por via venosa (veia marginal da orelha esquerda). Em

seguida, o humor vítreo, o bulbo do olho e os implantes foram removidos para as seguintes determinações:

- 1) quantidade de MPA liberada a partir dos sistemas,
- 2) quantidade de MPA restante nos sistemas,
- 3) perfil farmacocinético,
- 4) comportamento de degradação *in vivo* do implante,
- 5) quantificação do MPA no vítreo.

O implante foi aplicado no olho direito de cada animal. O humor vítreo foi colhido nos dois olhos, sendo o olho esquerdo utilizado como controle para a concentração do fármaco determinada no olho direito.

A quantificação do MPA intravítreo e a determinação da concentração do fármaco restante nos implantes foram realizadas por método bioanalítico e analítico, respectivamente (ambos os métodos são apresentados e discutidos no Capítulo 3). Foram realizadas análises estatísticas descritivas e comparativas com medidas longitudinais entre o olho com o implante e o olho controle. Os resultados obtidos foram utilizados na construção das curvas de liberação (cedência) do fármaco pelo implante em função do tempo e concentração de MPA intraocular em função do tempo. Os parâmetros farmacocinéticos do MPA avaliados foram concentração vítrea máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ), tempo para atingir a concentração vítrea máxima ( $T_{m\acute{a}x}$ ), área sob a curva do tempo zero ao último tempo de coleta ( $ASC_{0-t}$ ), constante de eliminação ( $K_{el}$ ) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ). Todos os parâmetros foram determinados por avaliação estatística utilizando-se o software Minitab® (Minitab Inc., State College, Pensilvânia, EUA).

Esse projeto foi aprovado pelo do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG) sob o número de protocolo 45/2011.

#### **1.2.2.10 Avaliação da toxicidade dos implantes obtidos**

A avaliação da toxicidade foi realizada por meio de ensaios clínicos dos olhos dos animais de acordo com o procedimento descrito por Fialho (2006). Os ensaios clínicos foram realizados pelo veterinário Dr. Gustavo de Oliveira Fulgêncio.

A avaliação clínica incluiu exames de inspeção ocular, oftalmoscopia binocular indireta (Topcon®, Japão), pressão intraocular (medida pelo equipamento TonoPen®, Mentor Corporation, EUA) e produção de lágrima (teste de Schirmer) de ambos os olhos de cada coelho. Todos os testes foram realizados logo antes da cirurgia e semanalmente após a implantação dos sistemas.

## 2 Resultados e Discussão

### 2.1 Preparo dos implantes intraoculares

Os implantes foram desenvolvidos a partir de duas formulações. A primeira formulação consistia em produzi-los por meio da moldagem de uma simples mistura física entre fármaco e matriz polimérica, e a outra, em produzi-los via moldagem de microesferas da matriz com o fármaco incorporado. O objetivo era ter duas formulações que, durante os testes para caracterização dos implantes, seriam avaliadas a fim de estabelecer qual seria a melhor formulação em termos de estabilidade e de controle da liberação para que, então, uma fosse escolhida e utilizada no estudo *in vivo*.

Primeiro, foram desenvolvidos os implantes a partir da mistura física. Para se produzir aproximadamente 50 implantes com MPA a 10%, foram misturados 90 mg de PLGA e 10 mg de MPA. Como a quantidade final é muito baixa, apenas 100 mg, a simples mistura dos pós do polímero e do fármaco foi bastante dificultada. Além disso, ainda existe uma grande diferença entre o tamanho das partículas e densidade das matérias primas. Para conseguir uma mistura física bem homogênea, fármaco e polímero foram primeiramente solubilizados em 10 mL de acetonitrila. Em seguida, foram adicionados 2 mL de água como um cosolvente, que estabiliza melhor a formulação quando esta é então congelada – 70 °C no próximo passo. Após o congelamento, a mistura foi liofilizada por dois dias até que apenas uma massa branca e homogênea fosse obtida. Essa massa foi moldada em forma de implantes e, como esperado, o processo se mostrou muito simples e sem problemas durante a produção.

Com os implantes assim obtidos, deu-se início ao desenvolvimento das microesferas que, inicialmente, foram produzidas conforme descrito na seção 1.2.1.

Após a produção das microesferas, o sobrenadante procedente do processo de lavagem, foi analisado por UPLC (mesma metodologia adotada para a quantificação de MPA utilizada na seção 1.2.2.5). Assim, foi conhecida a quantidade de fármaco que se

perdeu durante o processo de fabricação. Desse modo, foi calculado a quantidade de fármaco incorporada pelas microesferas no processo por meio da seguinte equação (2.2).

$$MF_{add} - MF_{sob} = MF_{inc} \cdot X100 / MF_{add} \quad (\text{eq. 2.2})$$

Em que,

$MF_{add}$  = massa de fármaco adicionada

$MF_{sob}$  = massa de fármaco presente no sobrenadante

$MF_{inc}$  = massa de fármaco incorporada

Durante a análise do teor de fármaco nos sobrenadantes obtidos, foi observado que a produção de microesferas não era capaz de incorporar o MPA de forma efetiva. A quantidade de MPA presente nos sobrenadantes analisados foi muito alta, indicando que menos de 5% do fármaco adicionado à formulação havia sido incorporado.

Dessa forma, ao contrário do procedimento simples de obtenção dos implantes a partir da mistura física, o processo de produção a partir das microesferas se mostrou mais trabalhoso e menos eficaz. O problema de baixa incorporação de MPA provavelmente se deve a um caráter predominantemente polar da molécula do fármaco. Moléculas polares tendem a “escapar” da fase orgânica para a fase aquosa durante a formação da emulsão no preparo das microesferas. Assim, a concentração final de MPA nas microesferas fica reduzida.

Devido a esse problema, alterações no processo de produção das microesferas foram propostos. As alterações, os objetivos e os resultados da porcentagem de incorporação obtidos podem ser observados na **Tabela 2.1**

**Tabela 2.1 – Variações propostas no preparo das microesferas de PLGA e MPA e as porcentagens de incorporação obtidas após a análise do sobrenadante por UPLC.**

Proposta	Objetivo	% incorporação e DPR (n=3)
Alterar a concentração de PVA na fase aquosa de 0,5% para 1, 2 e 3%.	Essas alternativas foram testadas visando obter uma melhor estabilização da suspensão e com isso diminuir a fuga do fármaco da fase orgânica para a fase aquosa.	PVA 0,5% = 3,72 DPR = 10,12%
Utilizar Lutrol F68 <sup>®</sup> * a 1 e 2% como tensoativo		PVA 1,0% = 4,01 DPR = 16,21%
		PVA 2,0% = 4,10 DPR = 8,9%
		PVA 3,0% = 4,05 DPR = 17,01%
Realizar o processo de evaporação do solvente orgânico mantendo-se a mistura em banho de gelo	Esperava-se reduzir a solubilização do fármaco na fase aquosa com a redução da temperatura.	4,05 DPR = 18,21%
Acidificar a solução aquosa com ácido acético	Esperava-se diminuir a solubilidade do MPA na fase aquosa com a diminuição do pH	4,82 DPR = 16,93%
Utilizar a técnica de “salting out” na fase aquosa	Esperava-se diminuir a solubilidade do MPA na fase aquosa quando esta fosse saturada com NaCl	4,95 DPR = 9,93%
Aumentar a concentração de fármaco no início da formulação para 20%	Esperava-se que o aumento da concentração do MPA na solução orgânica deslocasse o equilíbrio final da solução de modo a aumentar a incorporação do fármaco	3,86 DPR = 11,66%
Diminuir o volume da fase aquosa para 50 mL	Esperava-se menor solubilização do fármaco na fase aquosa	3,91 DPR = 10,10%
Reduzir a quantidade de lavagens para apenas uma.	Esperava-se que uma menor porção do fármaco fosse perdida no processo de lavagem	4,84 DPR = 8,16%

\* Composto formado por um copolímero de polietilenoglicol - polipropilenoglicol - polietilenogliol

**Tabela 2.1 - continuação**

Trocar o solvente orgânico	Éter e acetato de etila foram testados como solventes da fase oleosa em substituição ao diclorometano	A etapa de evaporação do solvente se estendeu muito. A produção foi então descartada e não houve cálculo do teor de incorporação.
----------------------------	---	---

Conforme pode ser observado na **Tabela 2.1**, mesmo com mais de 10 propostas diferentes para aumentar o teor de incorporação do fármaco nas microesferas, o resultado final obtido foi muito ruim: não se conseguiu alcançar se quer 5% de incorporação. Pode-se inferir que a natureza polar do fármaco conferida pela presença de um grupo carboxila e outro hidroxila em sua molécula, associada a sua baixa concentração na solução de partida, tenham sido os principais fatores para que grande parte do fármaco passasse para a fase aquosa, conferindo taxas de incorporação muito baixas.

O melhor resultado aconteceu quando a fase aquosa foi saturada com NaCl. Inere-se que a saturação da fase aquosa tenha reduzido o poder dessa fase de solubilizar o fármaco. Entretanto, devido a uma concentração baixa de fármaco na formulação, essa diminuição do poder de solvatação da fase aquosa não foi o suficiente para impedir que a maior parte do fármaco fosse solubilizada nessa fase.

Com esses resultados, optou-se por continuar os estudos apenas com a mistura física. A formulação com base na formação de microesferas foi descartada devido à grande perda de fármaco e maior tempo gasto durante sua produção. Também foi levado em consideração o elevado custo do MPA que acabava por ser muito desperdiçado no método de microesferas.

Para melhor caracterizar os novos dispositivos intraoculares desenvolvidos, também foram fabricados implantes sem a adição do fármaco – usados como grupo controle. Esses implantes foram chamados de implantes brancos (placebo) e foram obtidos apenas pela moldagem a quente da matriz polimérica.

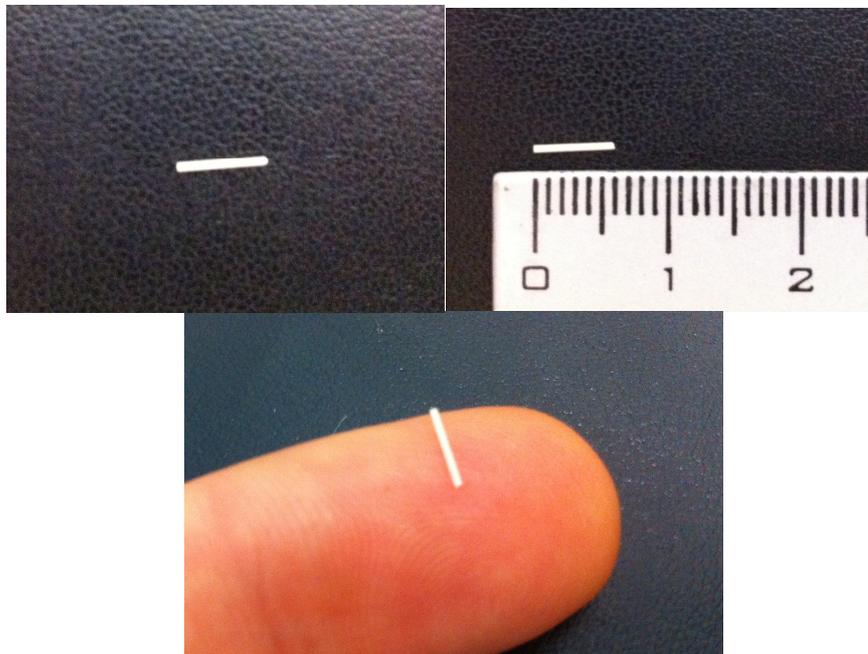
## 2.2 Caracterização dos implantes desenvolvidos

### 2.2.1 Peso médio, tamanho e espessura

O tamanho dos implantes deve ser pequeno para não obstruir a passagem de luz nos olhos e acabar afetando a acuidade visual. Eles devem também ser finos o suficiente para passar em uma cânula trans escleral que será utilizada para introduzir o implante no olho no estudo *in vivo*.

Os implantes foram moldados manualmente sobre chapa de teflon aquecida, e foram cortados individualmente de modo a possuírem 6 mm de comprimento e 0,5 mm de espessura. A caracterização foi feita com o auxílio de um paquímetro e com a cânula trans escleral de 25 Ga que seria utilizada durante a cirurgia de implantação. Os implantes foram medidos um a um e depois foram passados através da cânula para verificação da espessura. O peso médio dos implantes foi de  $1,7 \pm 0,15$  mg.

O implante desenvolvido é mostrado na **Figura 2.2**.

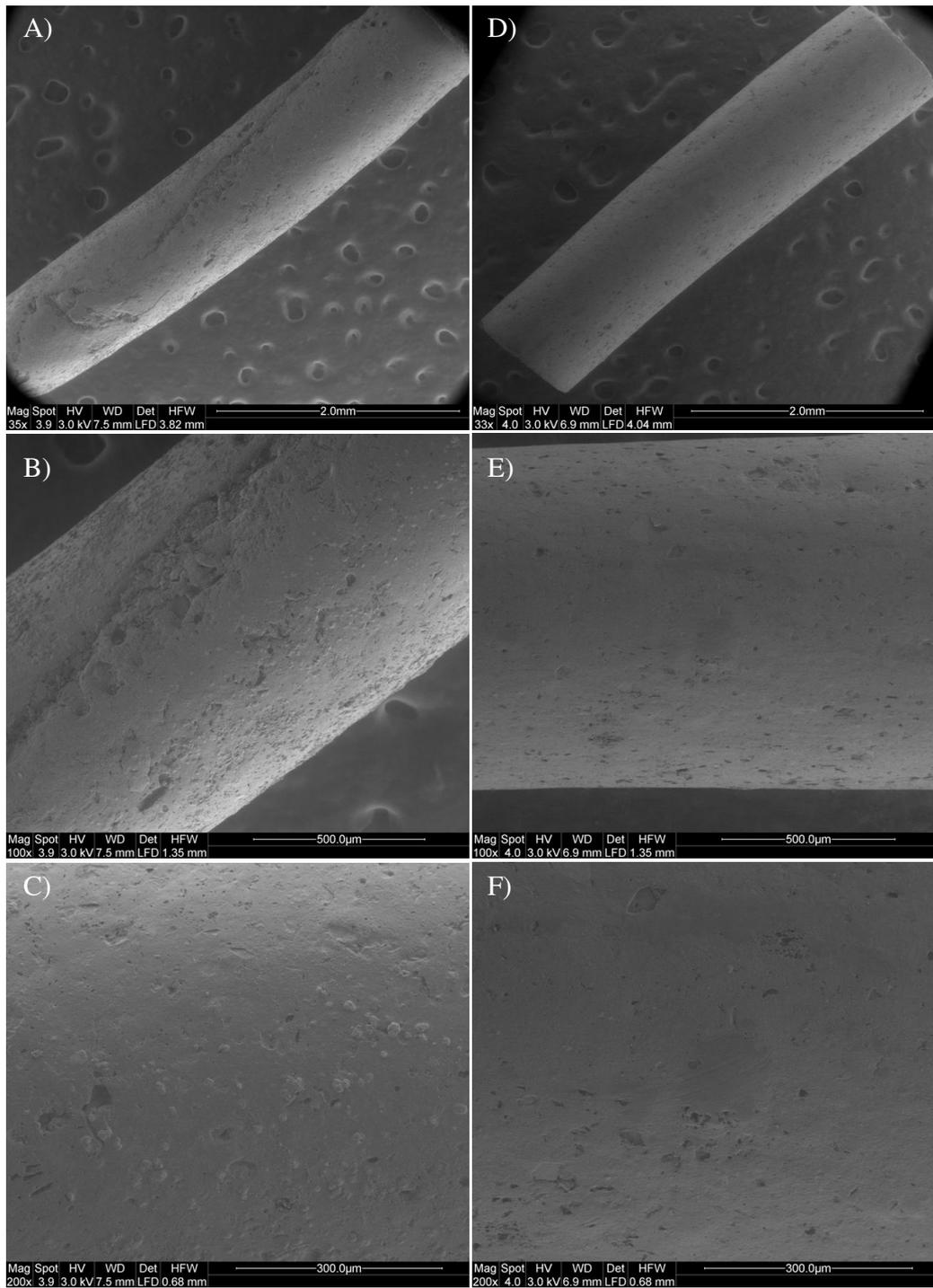


**Figura 2.2** – Fotografias do implante desenvolvido.

### 2.2.2 Morfologia da superfície

Para avaliação da superfície, os implantes com e sem o fármaco foram metalizados com uma camada de 6,5nm de ouro e analisadas por MEV. As fotografias da microscopia são mostradas na **Figura 2.3**.

Pela análise da **Figura 2.3**, pode-se perceber que a superfície dos implantes contendo ou não o fármaco não se diferem muito. Sendo que o implante branco possui superfície levemente mais lisa e regular. A existência de fármaco adsorvido na superfície dos implantes poderia ser um dos causadores de tal diferença, entretanto, tal hipótese foi descartada devido ao perfil de liberação *in vitro* apresentado pelo dispositivo. Essa informação será discutida adiante, no item *2.2.6 Estudo de liberação in vitro*. A causa de tal fato foi então atribuída ao processo de moldagem dos implantes. Ao sair da chapa aquecida e retornar a temperatura ambiente, a presença do fármaco na matriz possivelmente influenciou, durante o resfriamento, na formação da superfície e alterou um pouco sua forma. Como a diferença foi mínima, esse fato não foi considerado relevante.

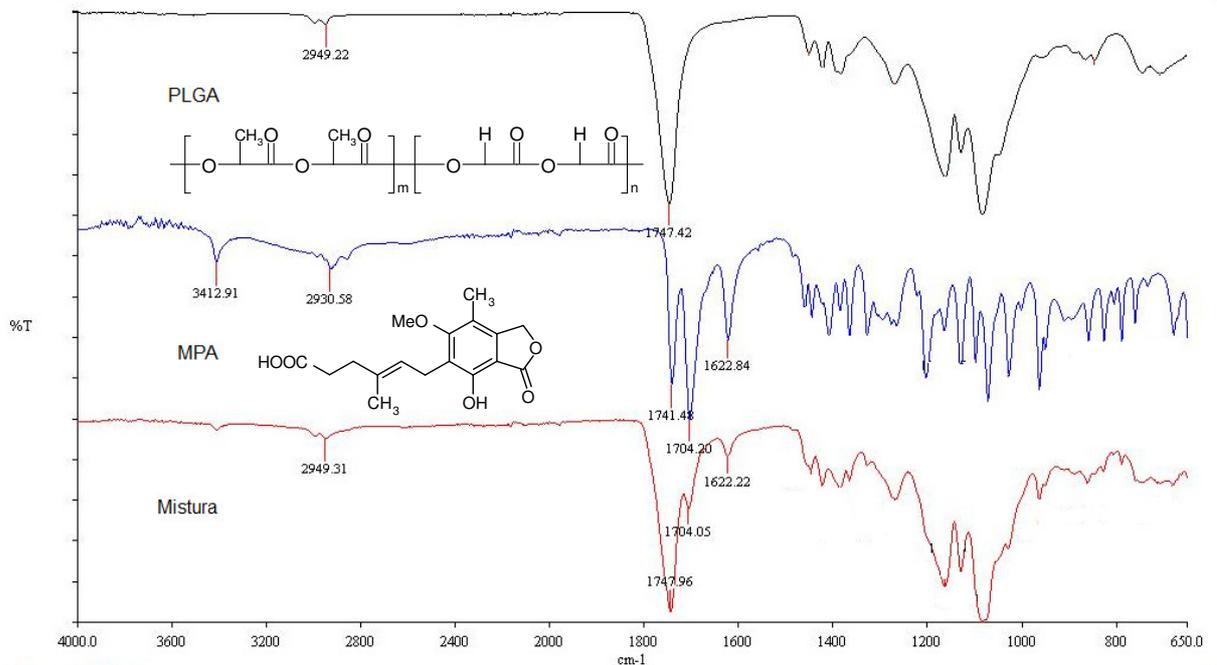


**Figura 2.3 – Microfotografias de MEV do implante contendo o MPA a 10% e do implante branco. A, B e C representam o implante com o MPA a 10% em aumentos de 35, 100 e 200 vezes, respectivamente. D, E e F representam o implante branco em aumentos de 35, 100 e 200 vezes, respectivamente.**

### 2.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho possibilita a identificação de grupos funcionais de moléculas que são expostas a uma radiação no infravermelho, na faixa de 10.000 a 100  $\text{cm}^{-1}$ . Essa radiação, quando absorvida por uma molécula orgânica, promove rotação e vibrações moleculares, produzindo um espectro de onda com as posições específicas de cada banda.

A identificação de grupos funcionais é útil na caracterização de substâncias químicas e fármacos (SILVERSTEIN et al., 2000). Por meio da espectroscopia na região do infravermelho, foram identificadas as funções químicas das moléculas da matriz polimérica e do MPA. Essa identificação permite a avaliação de possíveis interações entre as duas substâncias uma vez que cada material possui grupos químicos distintos e apresentam bandas específicas nos espectros do infravermelho. Os espectros do MPA, PLGA e da mistura física entre os dois são mostrados na **Figura 2.4**.



**Figura 2.4.** Espectroscopia de infravermelho na região de 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 650  $\text{cm}^{-1}$  para o PLGA, MPA e a mistura física.

No espectro do MPA, observa-se uma banda em 3412 cm<sup>-1</sup> de fraca intensidade referente à deformação axial da ligação O – H do fenol. A banda larga em aproximadamente 3200 a 2800 cm<sup>-1</sup>, também de intensidade fraca, é referente à deformação axial da ligação O-H do ácido carboxílico. Em 2930 cm<sup>-1</sup> observa-se uma banda, também de intensidade fraca, que indica a deformação axial da ligação C-H de alcanos. As bandas de maior intensidade em 1741 e 1704 cm<sup>-1</sup> são referentes à deformação axial da ligação C=O de  $\gamma$ -lactona insaturada e ácido carboxílico, respectivamente. A banda de intensidade moderada em 1622 cm<sup>-1</sup> se refere à deformação axial de ligação dupla C=C. O espectro do PLGA tem como principal banda a que ocorre em 1747 cm<sup>-1</sup>, referente à ligação C=O de ésteres. No espectro da mistura física entre PLGA e MPA a 10%, as bandas mais intensas presentes no espectro do fármaco em 1704 e 1622 cm<sup>-1</sup> assim como a banda característica do PLGA em 1747 cm<sup>-1</sup> encontram-se presentes. Essas preservações das principais bandas na combinação indicam a inexistência de reações químicas entre a matriz polimérica e o MPA, sugerindo que tanto fármaco quanto a matriz não tiveram suas características alteradas quando misturadas.

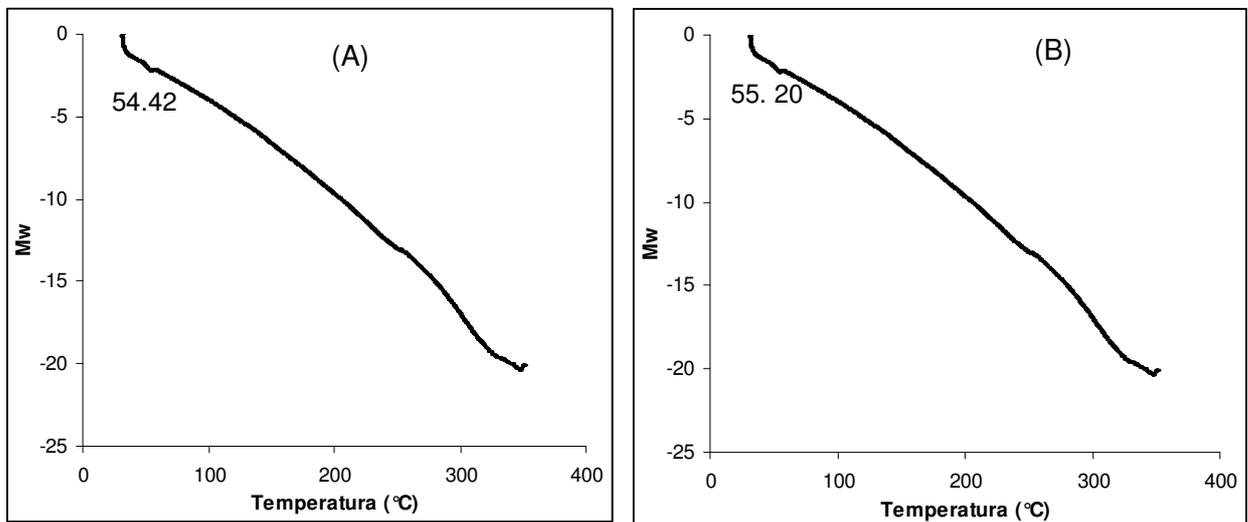
#### 2.2.4 Análise térmica

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é amplamente utilizada no setor farmacêutico tanto caracterização de materiais como no controle de qualidade de produtos. Nessa técnica, um material de referência\* e uma amostra a ser investigada são colocados em dois cadinhos dispostos sobre uma base de metal potencialmente condutor e aquecidos sob temperatura controlada. Por meio da troca de calor entre a amostra e a referência, a curva de DSC expressa picos referentes a eventos físico-químicos do material, tais como fusão, cristalização e transição vítrea.

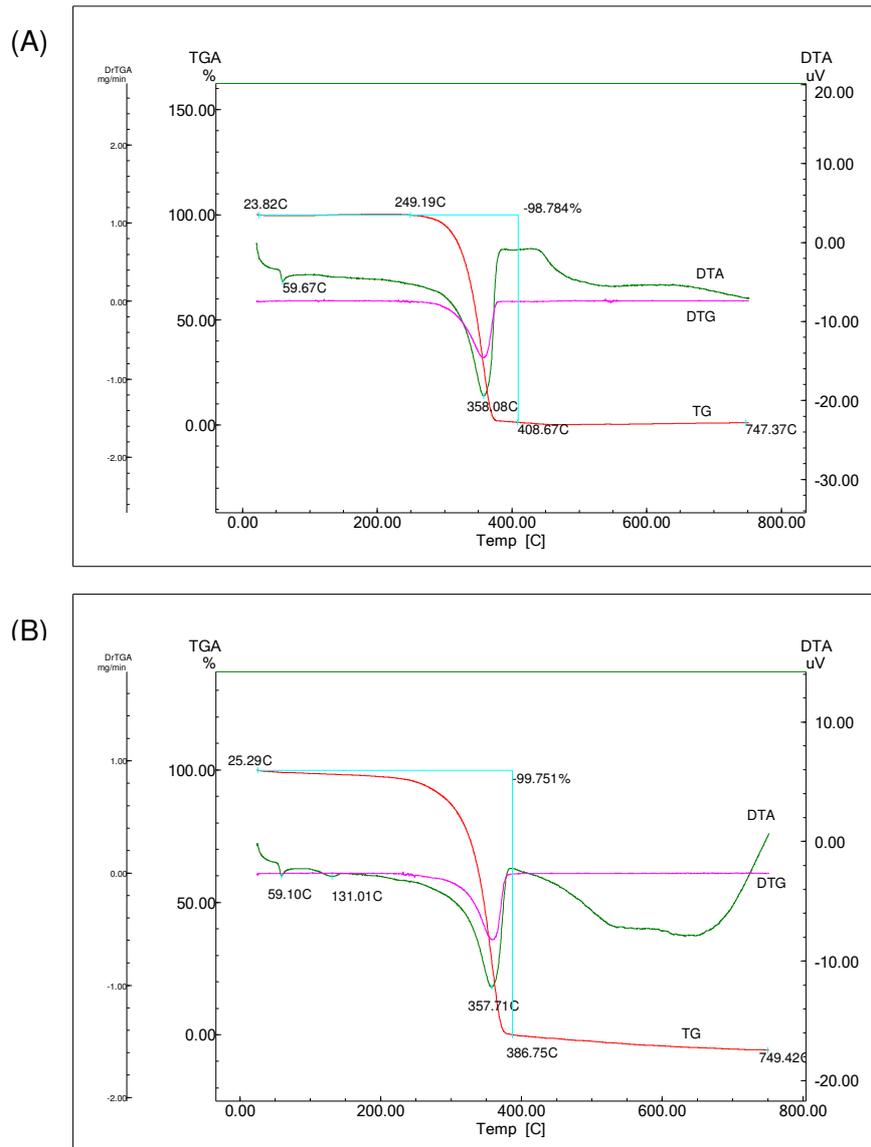
As técnicas termoanalíticas possuem grande importância no âmbito farmacêutico devido à grande variedade de aplicações, as quais podem ser utilizadas tanto no controle da matéria-prima quanto do produto acabado, possuindo potencial de emprego no desenvolvimento e na caracterização de novas formas farmacêuticas, como é o caso dos implantes desenvolvidos neste trabalho. (SANTANA et al., 2008).

\*Nesse experimento foi utilizado um cadinho vazio como referência.

Pelas curvas DSC da amostra de PLGA e da mistura física entre o polímero e o fármaco (**Figura 2.5**), obtidas na segunda corrida das amostras, foi possível observar a transição térmica relacionada à transição vítrea (mudança de inclinação da linha de base da curva DSC) a 54 – 55 °C. Percebe-se também, nessas curvas, a ausência de evento de transição de fase referente à fusão. Devido ao comportamento semelhante entre as duas curvas, pode-se inferir que o arranjo da matriz polimérica não sofreu alteração quando misturada ao MPA. Na curva de TG (**Figura 2.6**), pode-se constatar que a perda de massa entre o polímero e a mistura não foi alterada significativamente, tendo permanecido entre uma faixa de 98,7 -99,7 % de perda de massa. Com os dados da DTG e DTA (**Figura 2.6**), verificou-se que o perfil das duas amostras também não se difere no que diz respeito a sua degradação. A ocorrência de apenas uma inflexão nas curvas indica que a degradação ocorre em uma única etapa. A temperatura de transição vítrea observada nessas curvas também é muito próxima (59,67 °C para o PLGA e 59,10 °C) para a mistura. A diferença nesses valores da transição vítrea em relação aos encontrados na curva de DSC se deve, provavelmente, a uma variação na taxa de aquecimento dos equipamentos utilizados.



**Figura 2.5 – Curvas DSC de: (A) Mistura física e (B) PLGA.**



**Figura 2.6 – Curvas TG, DTG e DTA de: (A) PLGA e (B) Mistura física.**

As técnicas termoanalíticas empregadas no estudo, que são de extrema importância na identificação e controle de qualidade de fármacos em geral, fornecem parâmetros acerca do desenvolvimento e caracterização dos implantes de PLGA com MPA. Os resultados sugeriram ausência de interações entre o fármaco e o polímero, o que sugere a ocorrência de manutenção das propriedades físico-químicas dos constituintes da formulação após processo de produção. Vale ressaltar que isso é de fundamental importância para assegurar a atividade do dispositivo.

### **2.2.5 Quantidade de MPA nos implantes (porcentagem de incorporação)**

Conhecer a real concentração de MPA presente no implante é essencial para a definição da dose que será veiculada com a aplicação do dispositivo. No caso da formulação produzida por meio da simples mistura entre fármaco e polímero, o cálculo da dose teórica é facilitado devido à ausência de outros procedimentos durante a produção. Mesmo assim, o doseamento do fármaco no implante é importante para saber se existem perdas do fármaco durante o processo.

Para a determinação do teor de MPA presente nos implantes, uma fração de aproximadamente 20% dos implantes produzidos em cada lote foi separada e analisada.

O valor médio encontrado para a análise de 3 lotes de implantes, com valor de  $n$  igual a 15, foi de 10,12%. Ou seja, considerando-se um peso médio de 1,7 mg, cada implante apresentou aproximadamente 172  $\mu\text{g}$  de MPA.

O valor encontrado foi satisfatório e dentro do esperado, mostrando que o processo de produção, por ser simples, não gera perda de fármaco. O valor encontrado, ligeiramente acima dos 10 % esperados, pode ser explicado por pequenas variações no momento da pesagem dos constituintes da formulação, e também por erros analíticos embutidos na metodologia de análise, como a pesagem do padrão, dissolução e diluição dos implantes.

### **2.2.6 Estudo de estabilidade dos implantes obtidos**

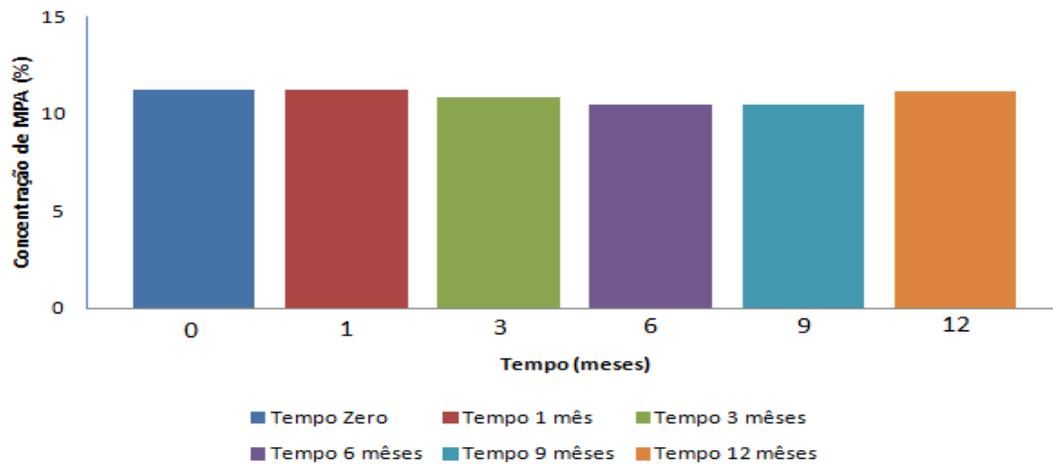
A exigência do conhecimento dos produtos de degradação de matérias primas e de produtos acabados tem sido uma tendência dos órgãos reguladores pelo mundo. Por esse motivo, o estudo da estabilidade dos novos dispositivos foi realizado.

A RDC nº50, de 20 de setembro de 2011 da ANVISA, dispõe sobre os procedimentos e condições de realização de estudos de estabilidade. Além disso, ela preconiza, para os

estudos de longa duração, a permanência dos produtos acabados em uma câmara com temperatura e umidade controladas durante todo o período de validade proposto para os estudos. As condições de temperatura e umidade propostas foram de  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  e  $60\% \pm 5\%$ , respectivamente. Embora nosso laboratório não possua uma câmara climática, ele é dotado de equipamentos de ar condicionado e diariamente sua temperatura e umidade são verificadas por meio de um termohigrômetro. A temperatura e umidade do laboratório são controladas em  $24 \pm 2\text{ °C}$  e  $50\% \pm 15\%$ , respectivamente. Por se tratar de um estudo piloto e da temperatura e umidade do laboratório serem muito próximas das preconizadas pela ANVISA, decidiu-se realizar os estudos de estabilidade dos implantes acomodando-os em um lugar separado para esse fim no laboratório.

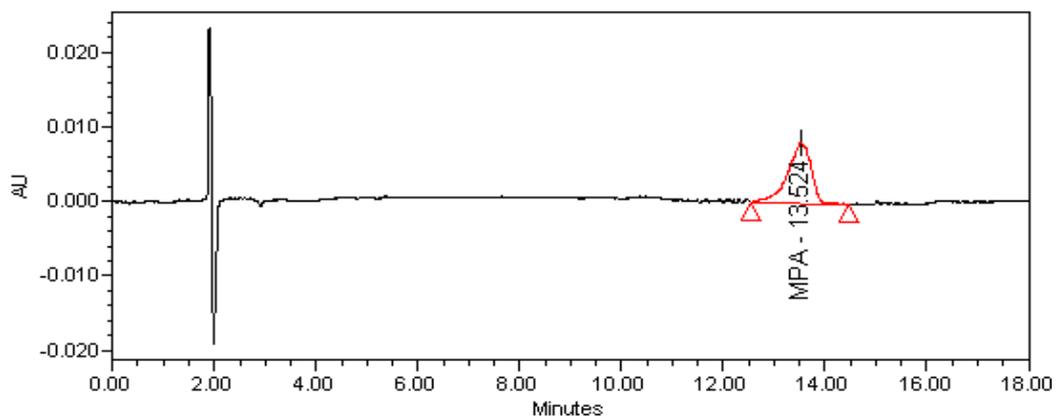
Dezoito implantes de um mesmo lote, divididos em seis grupos de três, foram utilizados no estudo de estabilidade. Os implantes foram armazenados no laboratório por um período de um ano. Em intervalos de 0, 1, 3, 6, 9 e 12 meses, foram analisados pelo método de UPLC para quantificação de MPA. Após a análise, foram construídos gráficos em que foram plotadas as concentrações médias em função do tempo (**Figura 2.7**).

Como pode ser observada na **Figura 2.7**, a concentração de MPA nos implantes foi próxima a 10% durante todo o estudo, e em nenhuma das dezoito amostras analisadas o desvio encontrado foi maior do que 20% da concentração inicial. O desvio de 20% em relação à concentração inicial, adotado como critério de aceite, teve como padrão o mesmo critério utilizado para desvio de formas farmacêuticas unitárias da Farmacopéia Brasileira. É importante comentar também que não foi observada uma tendência de aumento ou diminuição da concentração do fármaco durante o período de tempo estudado. Esses dados sugerem que a formulação é estável durante todo o período estudado.



**Figura 2.7 – Concentração média de MPA nos implantes em um intervalo de 12 meses.**

Os implantes também foram submetidos à análise quanto à presença de produtos de degradação do MPA. Nesse caso, a metodologia utilizada foi a mesma descrita pelo trabalho de Costa (2009) para a identificação de produtos de degradação do MPA. As amostras utilizadas foram as mesmas preparadas previamente para a quantificação de MPA nos implantes submetidos ao estudo de estabilidade. As amostras injetadas foram comparadas com a injeção de padrões conhecidos dos produtos de degradação do MPA. Para as condições de análise utilizadas os produtos de degradação possuem tempos de retenção de 7,9 e 11,9 minutos, enquanto que o MPA possui tempo de retenção de 13,5 minutos. Um cromatograma resultante da análise para verificação dos possíveis produtos de degradação de uma amostra que ficou armazenada durante um ano é mostrado na **Figura 2.8**.



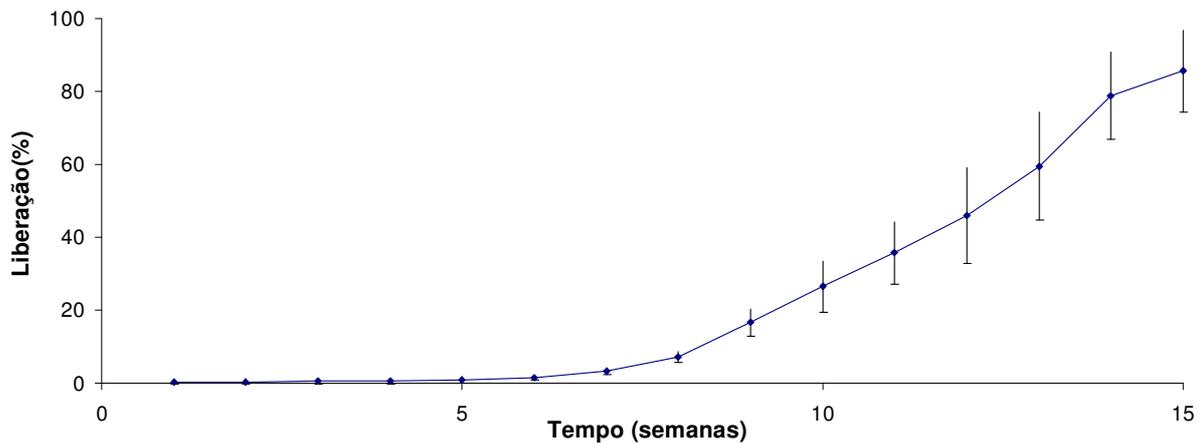
**Figura 2.8 – Cromatograma resultante da análise para identificação da presença de produtos de degradação do MPA.**

Conforme observado no cromatograma da **Figura 2.8**, nenhum pico referente a um produto de degradação conhecido do MPA foi observado. Isso já era esperado devido ao resultado observado na **Figura 2.7**, na qual não foi constatado decaimento na concentração do MPA. Essa observação corrobora com o fato de que os implantes de PLGA contendo MPA a 10% são estáveis dentro das condições estudadas durante o período de um ano.

### 2.2.7 Estudo de liberação *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* são essenciais para a avaliação da reprodutibilidade do comportamento de liberação do sistema e para a validação do método de preparo. Neste trabalho, seis implantes produzidos em um mesmo lote foram submetidos ao estudo de liberação *in vitro*, que foi realizado em câmara incubadora com tampão fosfato pH 7,4 como meio de liberação. O estudo durou 15 semanas.

O perfil de liberação acumulada da MPA obtido neste estudo está representado na **Figura 2.9**.

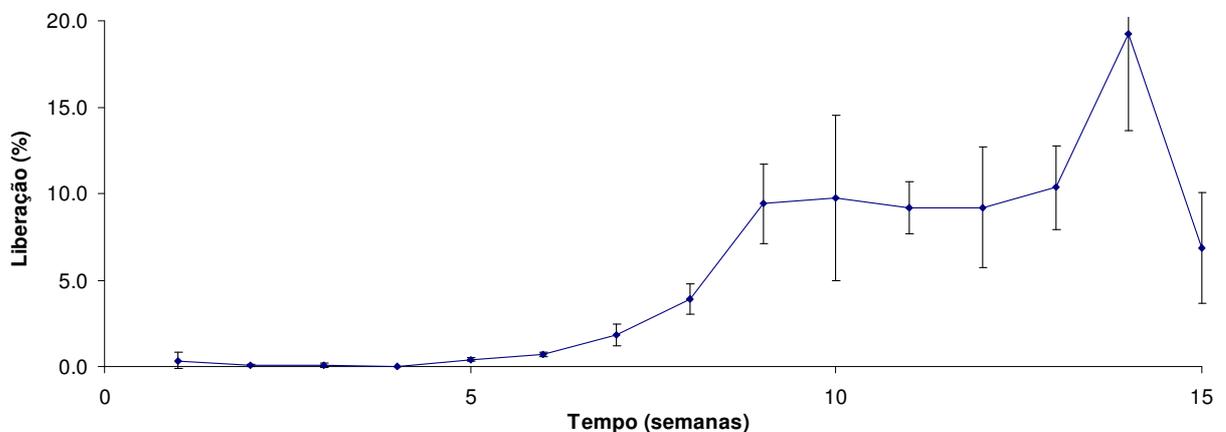


**Figura 2.9 – Liberação acumulada de MPA a partir dos implantes desenvolvidos. (Os valores são representados como média (n= 6)).**

Conforme ilustrado na **Figura 2.9**, aproximadamente 90% do MPA foi liberado durante o experimento, sendo que nas primeiras cinco semanas o dispositivo teve uma liberação

lenta, aumentando a partir de então. Dos 90% liberados, cerca de 80% foram liberados da sexta semana em diante.

A partir disso, um gráfico de liberação semanal foi construído com os resultados (**Figura 2.10**). Sua análise confirma o fato de que nas primeiras cinco semanas a liberação a partir dos implantes desenvolvidos foi bem próxima de zero. Esse fato confirma a hipótese levantada durante a caracterização da morfologia da superfície dos implantes, na qual não foi observada a presença de fármaco adsorvido na superfície.



**Figura 2.10– Liberação semanal de MPA a partir dos implantes desenvolvidos. (Os valores são representados como média n= 6).**

Alguns estudos descritos na literatura descrevem possíveis mecanismos para a liberação do fármaco a partir de sistemas monolíticos poliméricos cuja matriz é constituída de PLGA. A difusão e a erosão da matriz causada por degradação ou dissolução do polímero, ou por uma combinação destes, seriam os principais mecanismos (JAIN, 2000; SCHLIECKER, 2004).

Outra análise da **Figura 2.10** mostra que o perfil de liberação pode ser dividido em quatro etapas. A primeira etapa, da primeira à sexta semana, consiste de uma taxa de liberação muito lenta, provavelmente pelo fato de a matriz polimérica ainda permanecer intacta. A segunda etapa, que vai da sétima à oitava semana, indica início de uma maior liberação, provavelmente devido ao fato de que a matriz polimérica vai sendo melhor penetrada pelo meio de liberação. A terceira etapa, que vai da nona à décima

terceira semana, mostra uma etapa de liberação constante, na qual ocorre, possivelmente, a liberação do fármaco por meio de difusão do fármaco da matriz para o meio externo, sem que ocorra uma erosão dessa matriz. A quarta fase, representada pela décima quarta semana, corresponde a um repentino “burst” de liberação, provavelmente devido ao intumescimento e desintegração da matriz polimérica.

Existem muitas discussões na literatura sobre os principais mecanismos de liberação de fármacos a partir de matrizes poliméricas. Siepmann e colaboradores (2008) listaram os mais prováveis:

- Umedecimento da superfície do sistema com água.
- Penetração de água para o interior do dispositivo (por exemplo, através de poros e / ou através das redes poliméricas).
- Transições de fase (amorfo/cristalino).
- Dissolução do fármaco ou excipiente.
- Degradação do fármaco ou do excipiente.
- Dissolução e/ou precipitação dos produtos de degradação.
- Formação de poros.
- Aumento de pressão hidrostática dentro do sistema.
- Formação de um ambiente ácido ou básico dentro do dispositivo devido a produtos de degradação.
- Mudanças na solubilidade do excipiente ou fármaco devido à alteração das condições microambientais (por exemplo, pH e força iônica).
- Difusão de fármacos e/ou excipientes para fora dispositivo com potencial influência da posição do dispositivo.

Os autores afirmam ser impossível listar todos os fatores que estão envolvidos na liberação. Contudo, existem muitos modelos matemáticos propostos para tentar uma melhor compreensão dos sistemas de liberação e, a partir daí, melhorar seu funcionamento.

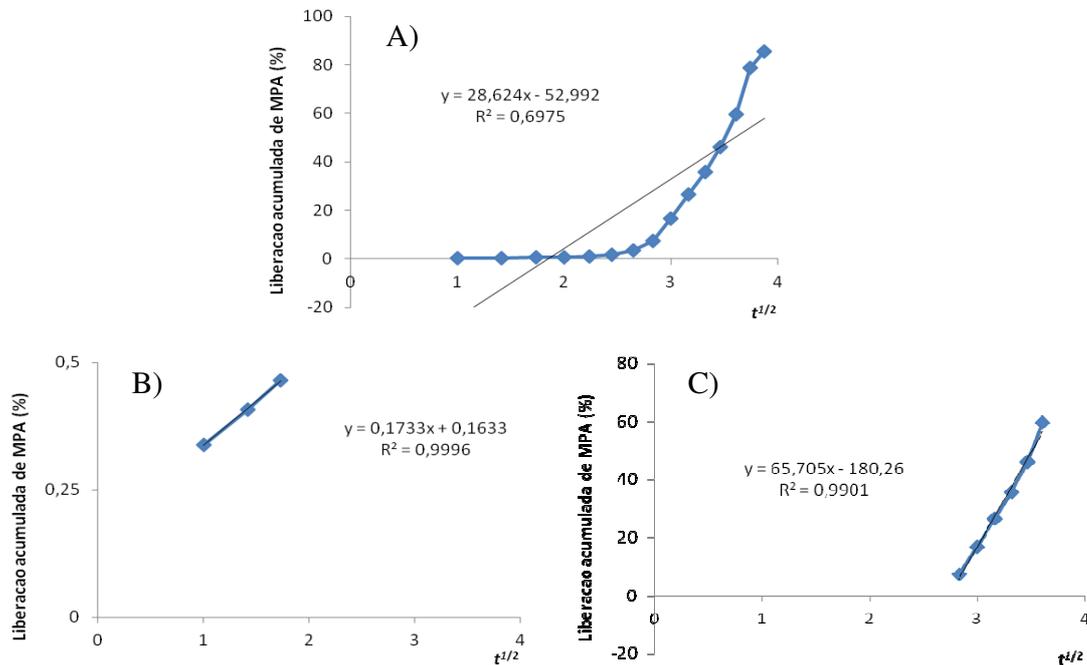
Existem modelos matemáticos complexos que levam em consideração, além da concentração do fármaco e do tempo do estudo, as constantes de solubilização do fármaco e matriz no meio, geometria do dispositivo de liberação (cilíndrica, filme esférica, etc.) e tipo do dispositivo (reservatório ou monolítica). Todavia existem também modelos simplificados, como o modelo matemático de Higuchi, que descreve um modelo para a liberação baseado apenas na difusão (SCHLIECKER, 2004; SIEPMAN 2008, 2012).

Segundo o modelo de Higuchi, quando a difusão do fármaco através da matriz representa o principal papel no mecanismo da liberação, o perfil de liberação de um fármaco a partir de uma matriz homogênea pode ser representado pela equação (2.3).

$$Q = K_h t^{1/2} \text{ (eq. 2.3)}$$

Onde  $Q$  é a quantidade de fármaco liberada no tempo  $t$ , e  $K_h$  é a constante de dissolução de Higuchi. De acordo com esse modelo, se a difusão é o principal mecanismo de liberação de um dispositivo, uma linha reta é esperada quando se constrói um gráfico com os valores de  $Q$  em função da raiz quadrada do tempo. (SCHLIECKER, 2004)

A fim de melhor compreender a liberação do implante desenvolvido e analisar se a difusão exerce um papel importante no mecanismo, o modelo de Higuchi foi aplicado ao estudo de liberação *in vitro*. Para tal, foram construídos gráficos (**Figura 2.11**) nos quais a concentração acumulada da liberação do fármaco foi relacionada com a raiz quadrada do tempo. A relação foi avaliada pela determinação do coeficiente de relação ( $r^2$ ) da equação da reta obtida.



**Figura 2.11 – Liberação acumulada de MPA dos implantes relacionados à raiz quadrada do tempo. A) Relação da semana 1 à 15. B) Relação da semana 1 à 3. C) Relação da semana 8 à 13.**

Frente aos resultados mostrados na **Figura 2.11**, concluiu-se que no comportamento da liberação como um todo, segundo o modelo de Higuchi, a difusão não seria o único ou o principal mecanismo de liberação do fármaco ( $r^2 = 0,69$ ). Contudo, ao se fragmentar a liberação em diferentes momentos, nos quais se conseguiu observar diferentes comportamentos de liberação, pode-se sugerir que a difusão exerce papel principal em dois momentos, um nas primeiras semanas ( $r^2 = 0,9996$ ) e outro da semana 8 à 13 ( $r^2 = 0,990$ ). Essas ocorrências, observadas por meio do modelo matemático, corroboram com o que já fora discutido anteriormente em relação aos possíveis efeitos que influenciam a liberação do fármaco nos diferentes estágios observados.

Por fim, foi realizada uma comparação estatística por ANOVA referente às liberações obtidas com as seis amostras. Os valores encontrados mostram que não houve diferenças estatísticas significativas entre as amostras ( $p = 0,231$  para a liberação acumulada, e  $p = 0,429$  para a liberação semanal). Esse dado indica a uniformidade dos implantes como agentes de controle da liberação do MPA e indica também a reprodutibilidade do modo de produção utilizado.

Os resultados obtidos permitem sugerir que o sistema polimérico desenvolvido apresenta perfil característico de um sistema de liberação prolongada, pois o mesmo não liberou todo fármaco presente de uma única vez, tendo proporcionado sua lenta liberação em um período de 15 semanas, o que habilita o implante desenvolvido para um estudo de liberação *in vivo*.

### **2.7.2. Estudo de farmacocinética e de liberação *in vivo* dos implantes**

Antes do início do estudo farmacocinético todos os animais (n=60), foram avaliados quanto ao peso, à pressão ocular e à produção de lágrima. Depois disso, foram divididos em 10 grupos de acordo com o tempo em que ficariam com o implante (**Tabela 2.2**).

Todos os animais foram avaliados semanalmente para verificação da alteração da pressão ocular ou de alguma outra anormalidade que pudesse surgir. Os parâmetros de consumo de ração/água e ganho de peso também foi observado e se mostrou normal durante todo experimento, indicando que o procedimento não causou alteração no comportamento dos animais. Entretanto, no decorrer do estudo, três animais apresentaram problemas oculares e foram excluídos dos resultados. Esses animais excluídos pertenciam aos grupos 3, 6 e 8. Os seguintes problemas foram detectados em tais animais: desenvolvimento de uveíte (animais dos grupos 3 e 6) e desenvolvimento de catarata seguido de cegueira e atrofia do olho (animal do grupo 8). A baixa incidência (apenas 5% dos animais utilizados) de complicações sugere que os problemas observados parecem estar mais relacionados ao procedimento cirúrgico, que é bem delicado e exige muita perícia do cirurgião, do que a uma toxicidade inerente dos implantes.

**Tabela 2.2 – Dados sobre os animais e os grupos que participaram do estudo farmacocinético do MPA.**

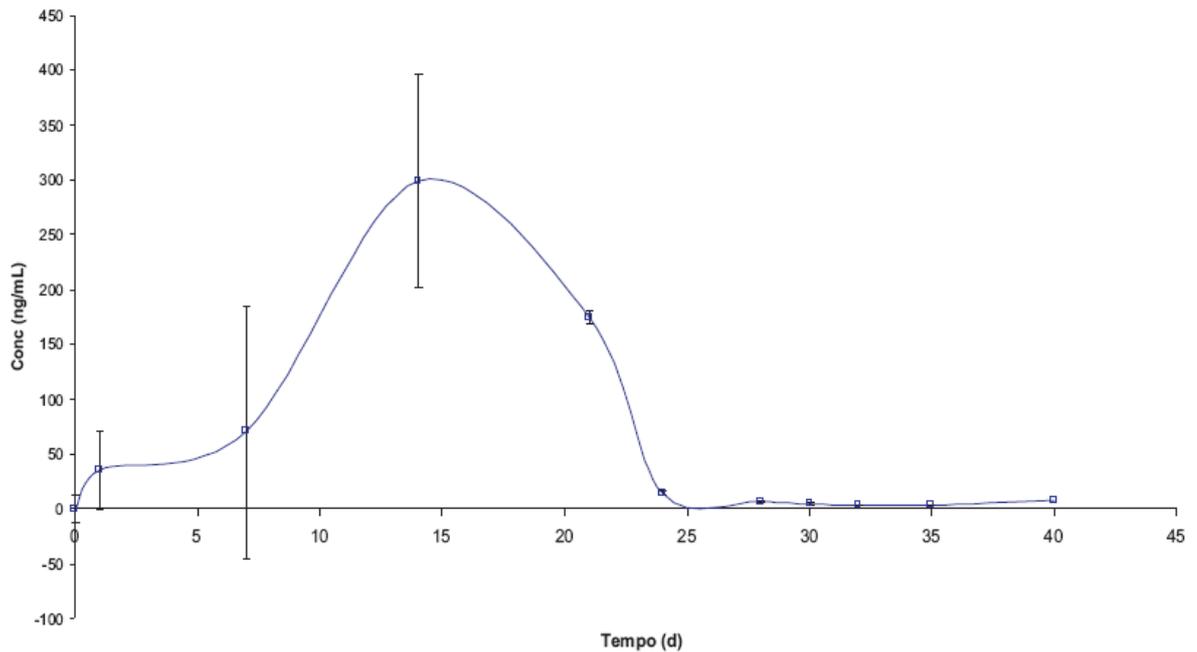
Grupo	Número de animais	Tempo de permanência com o implante (dias)	Pressão Ocular média (mmHg)	Produção de lágrima (mm)	Peso médio (kg)
1	6	1	16	10	1,75
2	6	7	19	10	1,8
3*	5	14	16	12	1,78
4	6	21	18	11	1,82
5	6	24	14	10	1,77
6*	5	28	17	11	1,8
7	6	30	15	10	1,72
8*	5	32	18	10	1,76
9	6	35	16	12	1,73
10	6	40	16	11	1,78
Média	-	-	16,5	10,7	1,77

\* Grupos em que um animal foi excluído dos resultados devido surgimento de complicações.

Após o tempo determinado para cada grupo, os animais foram eutanasiados e o vítreo, de ambos os olhos, foi coletado para análise. O que restou do implante também foi coletado.

Procedeu-se então com a quantificação do MPA liberado no vítreo. Em seguida, com a média dos resultados obtidos, foi construída uma curva com o perfil farmacocinético dos implantes (**Figura 2.12**).

A análise do perfil farmacocinético demonstrado pela **Figura 2.12** mostra que, também no experimento *in vivo*, o implante foi capaz de controlar a liberação do MPA. Em função disso, foi possível determinar o fármaco no vítreo após 40 dias da cirurgia de implantação.



**Figura 2.12 – Curva de concentração vítrea média de MPA versus tempo obtida após administração de implante ocular em coelhos.**

A concentração máxima ( $C_{max}$ ) e o tempo máximo ( $T_{max}$ ) do MPA foram determinados diretamente a partir dos dados da **Figura 2.12**. A área sob a curva do tempo zero ao tempo final ( $ASC_{0-t}$ ) foi calculada com os dados obtidos durante os 40 dias utilizando-se a regra linear trapezoidal. A constante de eliminação ( $K_{el}$ ) foi calculada por regressão linear das concentrações logarítmicas dos últimos sete dias. O tempo de meia vida ( $T_{1/2}$ ) foi calculado com base na  $K_{el}$ . Os resultados cinéticos do implante estão descritos na **Tabela 2.3**. Para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos foram utilizados os programas Excel<sup>®</sup> (Microsoft) e MiniTab<sup>®</sup> (MiniTab Inc.).

**Tabela 2.3 – Parâmetros farmacocinéticos do implante de MPA.**

Parâmetros farmacocinéticos	Resultados
$ASC_{0-t}$	3676,48 ng.h/mL
$C_{max}$	393,74 ng/mL
$T_{max}$	14 dias
$K_{el}$	0,15 dias
$T_{1/2}$	4,7 dias

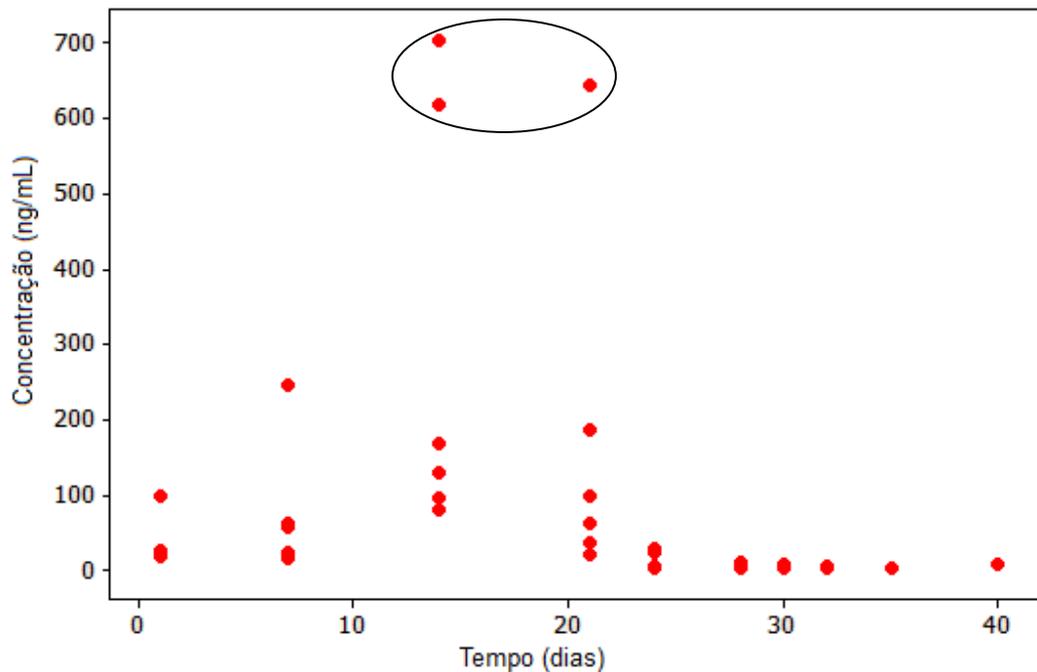
A C<sub>max</sub> foi observada após 14 dias e as concentrações de MPA foram similares depois do 24º dia. A K<sub>el</sub> e o T<sub>1/2</sub> calculados a partir do ponto em que ocorre o C<sub>max</sub> têm valores de 0,15 dias e 4,7 dias, respectivamente.

Quanto ao comportamento do implante, foi observado que a ASC dos primeiros 24 dias corresponderam a 91,17% da ASC<sub>0-t</sub>, e que a partir desse ponto a concentração no vítreo dos animais foi constante e próxima a 10 ng/mL. Cabe ainda ressaltar que, conforme era esperado, nenhuma concentração de MPA foi observada nos olhos utilizados como controle.

Outra observação que fica clara com este estudo foi a grande diferença apresentada em relação ao resultado observado no estudo *in vitro*. Enquanto em 40 dias no *in vivo* praticamente não se podia detectar mais o implante no olho dos animais, no estudo *in vitro*, o implante durou até 15 semanas. Infere-se que a principal causa dessa diferença seja a alta taxa de eliminação do MPA do olho, que é maior do que a imaginada. Isso elevaria a taxa de difusão do fármaco para fora da matriz, fazendo com que essa sofresse penetração do meio mais precocemente do que em relação ao estudo *in vitro*. Assim, a matriz sofreria erosão em passo mais acelerado e isso explicaria o perfil de liberação mais rápido observado. A influencia de ação de enzimas presentes no vítreo, mesmo que em baixas concentrações, também pode ter influenciado na hidrólise mais rápida da matriz polimérica, porém, não se acredita na influência de infiltrados inflamatórios e/ou outras células. Isso porque o olho e o corpo vítreo apresentavam-se, no momento das coletas, sem irritações aparentes e límpidos como o das amostras do olho controle.

Para melhor compreensão do mecanismo de liberação do implante, era pretendido analisar o MPA restante nos implantes que foram retirados dos olhos dos coelhos, e assim traçar uma curva de liberação acumulada *in vivo*. Porém, essa etapa não pode ser realizada. Os implantes recuperados dos olhos dos animais a partir do 24º dia já se encontravam muito deteriorados, e em alguns casos, divididos em várias partes. Isso impossibilitou a execução desse experimento uma vez que não se poderia afirmar com certeza qual concentração de MPA ainda restava nos implantes.

Outra análise quanto ao funcionamento do implante como sistema de liberação controlada de MPA, foi a uniformidade de seu comportamento. Essa análise foi feita a partir de um gráfico de dispersão das concentrações encontradas nos olhos de todos os animais (**Figura 2.13**).



**Figura 2.13** – Gráfico de dispersão das concentrações vítreas de MPA versus tempo obtida após o estudo de farmacocinética ocular dos implantes.

A análise da **Figura 2.13** permite inferir que o comportamento dos implantes analisados foi muito parecido, uma vez que apenas três deles (destacados na figura) se diferenciam em maior grau dos demais. Esse resultado corrobora com os já observados no estudo *in vitro* sobre a robustez do método de preparação dos implantes e a homogeneidade do seu comportamento.

O perfil farmacocinético determinado neste trabalho foi desenvolvido utilizando animais sadios com olhos normais. Para tanto, novos estudos devem ser realizados a fim de determinar o perfil farmacocinético em olhos de coelhos inflamados. Frente a isso, pode-se afirmar que o MPA disponibilizado a partir do implante desenvolvido

permanece no vítreo por 40 dias, resultado que indica a sua utilização como sistema de liberação controlada de MPA no tratamento da oftalmopatias do segmento posterior.

### 2.7.3 Avaliação da toxicidade dos implantes obtidos

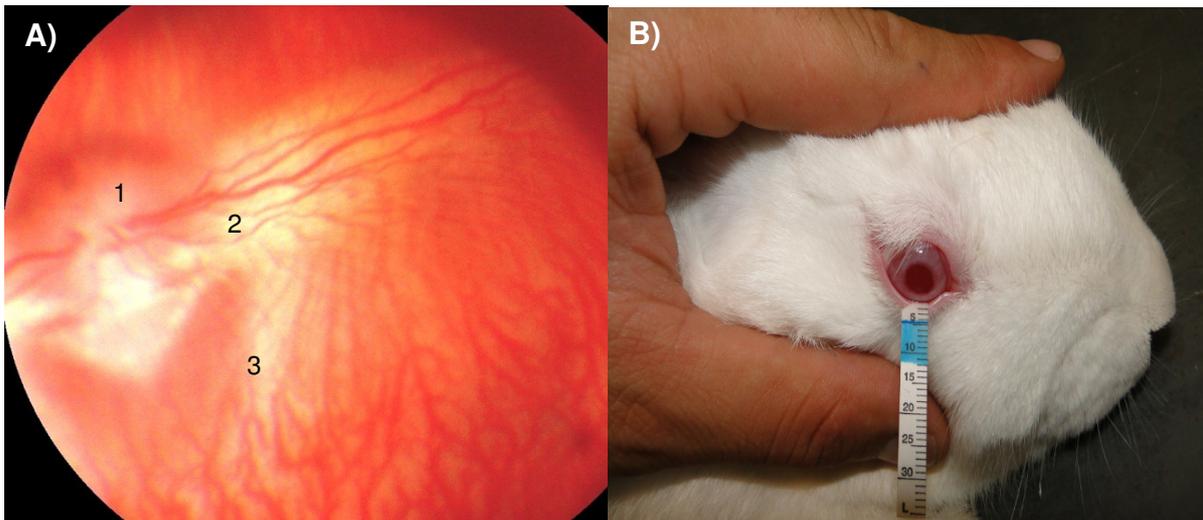
A avaliação da toxicidade foi realizada por meio de avaliação clínica dos olhos dos animais. As avaliações foram feitas com a colaboração do veterinário Dr. Gustavo de Oliveira Fulgêncio.

A avaliação clínica incluiu exames de inspeção ocular, nos quais nenhuma irritação que se considerasse relevante, caracterizada por hiperemia e/ou quemose, foram diagnosticadas. Em alguns animais, hiperemia discreta ou moderada foi percebida nos primeiros dias após a cirurgia, entretanto, esses casos regrediram naturalmente nas semanas seguintes.

Na oftalmoscopia binocular indireta, também não foram diagnosticados danos nas estruturas do fundo do olho. Na **Figura 2.14 (A)** é mostrada uma fotografia de fundo de olho de um dos coelhos tratados com um implante. Não são observadas alterações nos vasos da coroide, retina e nervo óptico.

A produção de lágrima foi avaliada pelo teste de Schirmer **Foto 2.14 (B)**. Esse parâmetro, caso se mostre alterado, também é considerado como um indicador de irritabilidade. Entretanto, os valores encontrados antes e após a cirurgia se mostraram praticamente inalterados ( $11 \pm 1$  mm).

A pressão intraocular média aferida na primeira semana após a implantação se mostrou um pouco elevada (19,6 mmHg). A pressão intraocular média observada antes da cirurgia havia sido de 16,5 mmHg. Contudo, nos animais que ficaram com o implante por mais de uma semana, esses valores se reduziram e se aproximaram dos valores iniciais.



**Figura 2.14– Avaliação clínica da toxicidade dos implantes. (A) - Fotografia da retina na qual não foram observadas alterações no disco óptico (1), retina (2) e vasos da coróide (3). (B) – Fotografia de coelho sendo submetido ao teste de Schirmer para avaliação da produção de lágrima.**

### 3 Conclusões

O dispositivo proposto, um implante constituído de PLGA 75:25 para liberação controlada de MPA intravítrea, foi desenvolvido e seu método de produção é o de moldagem a quente a partir de uma mistura física entre a matriz polimérica e o fármaco. Os implantes produzidos foram caracterizados quanto a suas características físicas, morfologia de superfície, presença de interações químicas entre os constituintes da formulação, teor de incorporação do fármaco, estabilidade, presença de produtos de degradação e liberação *in vitro*. Os implantes têm 6 mm de comprimento, 0,5 mm de espessura, pesam aproximadamente 1,7 mg e contêm 172 µg de MPA. Os resultados demonstram que o sistema obtido possui produção e comportamento homogêneo, ausência de interações entre os constituintes, é estável, não apresenta produtos de degradação e funciona como um dispositivo de liberação controlada de MPA por um período de até 40 dias dentro do olho de coelhos. Frente ao exposto, pode-se inferir que o implante avaliado pode ser testado como uma alternativa no tratamento de oftalmopatias da região posterior do olho.

# **CAPÍTULO 3**

**Desenvolvimento e validação dos métodos, analítico e bioanalítico, utilizados na caracterização do implante desenvolvido**

## **1 Materiais e Métodos**

### **1.1 Materiais**

#### **1.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras**

- Ácido micofenólico SQR 98% (Sigma Aldrich – Missouri – Estados Unidos).
- Cetoprofeno SQR 100% (United States Pharmacopeia – USP – Rockville – Estados Unidos).
- Implantes de PLGA contendo MPA.
- Vítreo de coelhos.

#### **1.1.2 Reagentes e vidraria**

- Reagentes em grau analítico e cromatográfico (ácido acético, ácido fórmico, hidróxido de amônio, acetato de amônio, acetonitrila e metanol)
- Água destilada e deionizada.
- Tubos de centrífuga com fundo cônico (tipo Falcon) de 15 e 50 mL.
- Microtubos de 1,5 e 2 mL (tipo Eppendorf).
- Pipetas e balões volumétricos calibrados.
- Béqueres, provetas, Erlenmeyers e kit de filtração de fase móvel.
- Membranas de celulose regenerada de 0,45 e 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### **1.1.3 Equipamentos**

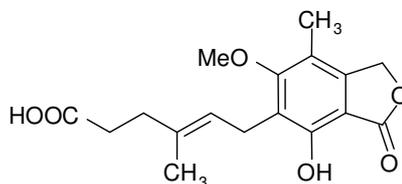
- Banho de ultrassom Branson.
- Balança analítica SARTORIUS modelo BP 211D com precisão de 0,01 mg.
- Agitador tipo vórtex (IKA<sup>®</sup>).
- Centrífuga Himac CR 21 (Hitachi)
- Pipetas automáticas Gilson monocanal modelos P20, P200 e P1000.
- Repipetador automático Brand HandyStep<sup>®</sup> eletrônico.
- Centrífuga refrigerada Jouan modelo MR23i.
- Freezer Revco -70 °C.

- Refrigerador Cònsul 240.
- Cromatógrafo à líquido de ultra eficiência (UPLC) Waters modelo Acquity composto por bomba binária, injetor automático, forno para colunas e detector de arranjo de diodos.
- Cromatógrafo à líquido de alta eficiência modular Waters, composto por bomba binária, injetor automático, forno para colunas e detector UV/Vis acoplado a espectrômetro de massas Micromass modelo Quattro-LC.
- Coluna para HPLC C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm e 5 µm) Shodex.
- Coluna para UPLC C<sub>18</sub> (50 x 2,1 mm e 1.9 µm) Thermo.
- Sistema de purificação de água Milli-Q-Plus MILIPORE.

## 1.2 Métodos

### 1.2.1 Desenvolvimento de método analítico por Cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) para a determinação de MPA nos implantes e no meio de liberação utilizado no estudo *in vitro*.

O conhecimento das características físico-químicas do MPA (praticamente insolúvel em água; solúvel em álcool, diclorometano e clorofórmio; pKa (1) = 4,5 e pKa (2) = 9,5; THE MERCK INDEX, 14 EDITION), de sua estrutura química (**Figura 3.1**) e de informações sobre sua análise, descritas na literatura, foram utilizados para o desenvolvimento do método analítico.



**Figura 3.1-** Estrutura química do ácido micofenólico (MPA).

Um espectro na região do ultravioleta, na faixa de 200 a 400 nm, foi obtido para o padrão de MPA. Para essa análise, preparou-se uma solução de MPA a 20 µg/mL em metanol. No espectro, foram determinados os comprimentos de onda correspondentes

aos máximos de absorção, os quais foram selecionados para a análise por cromatografia com detecção no UV.

#### **1.2.1.1 Condições analíticas e preparo das amostras**

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Acquity provido de detector ultravioleta com arranjo de diodos (DAD, do inglês diode array detector) a 250 nm e coluna Thermo Hypersil Gold C<sub>18</sub> (50 x 2,1 mm; 1,9 µm), mantida a 30 °C. A fase móvel utilizada foi mistura de acetonitrila e solução aquosa de ácido fórmico 0,05% (v/v) (65:35), vazão de 0,2 mL/min. O volume de injeção foi de 5 µL e os espectros no ultravioleta foram armazenados na faixa de 200 a 400 nm, por meio do detector DAD, para identificação dos picos cromatográficos.

Para o preparo das amostras de implantes, estes foram inicialmente colocados em tubos tipo Eppendorf que continham 1 mL de acetonitrila. Os tubos foram então agitados em vórtex por 2 minutos até completa dissolução do implante. Uma alíquota de 100 µL dessa solução foi diluída com acetonitrila em balão volumétrico de 5 mL e, em seguida, 5 µL da solução diluída foram injetados em triplicata no cromatógrafo. A quantificação do MPA foi feita por comparação das áreas de MPA obtidas nos cromatogramas das amostras com a área dos cromatogramas de uma solução padrão de MPA a 10 µg/mL injetado em sextuplicata imediatamente após o preparo das amostras. Para a conformidade do sistema, foi considerado o estudo válido caso o desvio padrão relativo (DPR) para as injeções do padrão fosse no máximo 2%.

Para o preparo das amostras de tampão fosfato pH 7,4 que continham MPA proveniente do estudo de liberação *in vitro*, foram retiradas alíquotas de 500 µL do tampão e colocadas em um tubo tipo Eppendorff. Adicionou-se 500 µL de acetonitrila e agitou-se em vórtex por 10 segundos. A solução foi transferida para um vial e, em seguida, 5 µL foram injetados no cromatógrafo.

#### **1.2.1.2 Preparo da solução padrão de MPA**

Aproximadamente 12,5 mg de MPA SQR foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se 20 mL de acetonitrila e agitou-se por 10 minutos em ultrassom para a solubilização. Em seguida, avolumou-se com acetonitrila de modo a obter uma solução de concentração de MPA igual a 250 µg/mL.

### **1.2.1.3 Validação do método cromatográfico**

Após otimização, o método de quantificação de MPA por UPLC foi validado segundo procedimentos recomendados pela Resolução RDC 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA e o Guia de Validação de Procedimentos Analíticos ICH (1996).

#### **1.2.1.3.1 Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada por meio da avaliação da pureza dos picos de MPA obtidos em cromatogramas de soluções do fármaco. Para essa análise, utilizou-se o detector DAD do cromatógrafo.

Com o objetivo de avaliar possíveis picos interferentes com mesmo tempo de retenção do pico de MPA no cromatograma, amostras de implantes branco também foram extraídas e suas soluções foram injetadas. O mesmo foi feito com uma solução de tampão fosfato pH 7,4 que seria utilizada no teste de liberação *in vitro*.

#### **1.2.3.3.2 Linearidade**

Foram preparadas, em triplicata, soluções estoque de MPA a 250 µg/mL, em acetonitrila. A partir de cada solução estoque, foram feitas diluições para cinco concentrações diferentes, conforme mostrado na **Tabela 3.1**. Para as análises cromatográficas, as soluções foram avolumadas com fase móvel. A faixa analisada foi de 0,5 a 50 µg/mL.

Curvas analíticas foram plotadas para concentração de MPA versus a área do pico ou absorvância, e os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear.

**Tabela 3.1 – Soluções diluídas para construção de curva analítica e avaliação da linearidade do método cromatográfico para quantificação de MPA.**

Ponto da curva	Concentração (µg/mL)	Volume a pipetar (µL)	Solução Estoque (µg/mL)	Balão (mL)
1	0,5	100	50 (sol. 5)	10
2	1,5	60	250	10
3	5,0	100	250	5
4	20,0	400	250	5
5	50,0	1000	250	5

#### 1.2.3.3.3 Precisão

A precisão foi avaliada por meio de seis determinações de MPA a uma concentração de 10 µg/mL (precisão intra-corrída). Para avaliação da precisão inter-corrídas, o mesmo procedimento foi adotado, realizando-se análises em dois dias consecutivos. Em ambos os testes, o desvio padrão relativo (DPR) foi determinado.

#### 1.2.3.3.4 Limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados baseados na inclinação e no desvio padrão do intercepto obtido na curva analítica, de acordo com as equações (3.1) e (3.2), respectivamente. Em seguida, realizaram-se diluições sucessivas a partir dos valores estimados até a obtenção de uma relação entre sinal e ruído próxima de 3 para o limite de detecção e próxima de 10 para o limite de quantificação (INTERNATIONAL..., 2005; SNYDER et al., 1997).

$$LD = 3 DPa / a \quad (\text{eq. 3.1})$$

$$LQ = 10 DPa / a \quad (\text{eq. 3.2})$$

Em que:

LD = limite de detecção

LQ = limite de quantificação

DPa = desvio padrão do intercepto;

a = inclinação da curva analítica.

#### 1.2.3.3.5 Robustez

A robustez do método foi verificada quanto às variações na proporção da fase móvel, variação na proporção de ácido fórmico na fase aquosa e variação na temperatura do forno da coluna. As variações avaliadas estão demonstradas na **Tabela 3.2**.

**Tabela 3.2 – Parâmetros considerados para avaliação da robustez do método analítico.**

Parâmetro	Normal	1	2
Proporção da fase móvel (orgânico/aquoso)	65:35	67:33	63:37
Temperatura (C°)	30	25	35
Proporção de ácido fórmico na fase aquosa	0,05	0,1	x

Realizaram-se três análises com solução padrão de MPA na concentração de 10 µg/mL. Os resultados das áreas obtidas foram comparados por Anova ( $\alpha = 0,05$ ).

### **1.2.2 Desenvolvimento de método bioanalítico para a determinação de MPA em vítreo de coelhos, por LC-MS.**

#### **1.2.2.1 Detecção por espectrometria de massas**

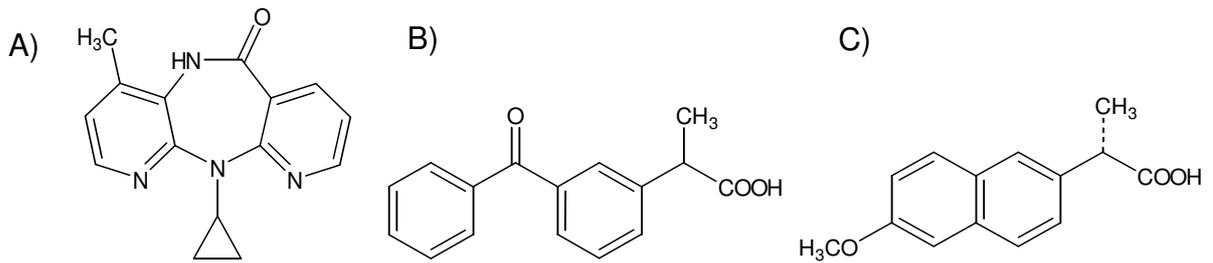
A primeira etapa do desenvolvimento do método por LC-MS/MS para quantificação MPA em vítreo de coelhos consistiu na avaliação e otimização da detecção do fármaco no espectrômetro de massas.

Foi feita uma otimização do sinal do fármaco no equipamento, pois um valor de sinal alto durante a detecção é uma das chaves para conseguir um limite de quantificação baixo.

Uma vez que a análise da estrutura química do MPA nos permitiu inferir que o analito seria capaz de receber ou perder um próton, foram testadas as ionizações em “eletrospray” no modo positivo (ESI(+)) e negativo(ESI(-)). Esses dois modos de ionização são os mais comumente utilizados para se dar uma carga ao analito de maneira que ele possa ser detectado pelo espectrômetro de massas. Foram realizadas, isoladamente, infusões diretas no espectrômetro de soluções de MPA acidificada com ácido fórmico 0,01% (v/v) e de MPA alcalinizada com hidróxido de amônio 0,01% (v/v), cada uma a 500 ng/mL, em mistura de acetonitrila e ácido/base (60:40), com vazão de 1200 µl/h.

Nos espectros de massa (MS Scan), em ambos os tipos de ionização, ESI(+) e ESI(-), os principais parâmetros otimizados para obtenção de íons precursores de alta intensidade  $[M+H]^+$  e  $[M-H]^-$  foram, respectivamente, a voltagem do capilar, voltagem do cone, temperaturas da fonte e de desolvatação e resolução LM-HM (Low mass/high mass). Visando à obtenção de fragmentos de alta intensidade nos espectros de fragmentação (Daughter Scan), a voltagem de colisão foi otimizada.

Para escolha do padrão interno a ser empregado na análise, foram testados fármacos que possuíam estrutura química e características físico-químicas semelhantes às do analito. O objetivo era escolher um composto com comportamentos semelhantes ao MPA tanto na ionização/detecção, quanto na extração e cromatografia. Os fármacos naproxeno, cetoprofeno e nevirapina foram os selecionados como candidatos a padrão interno e, da mesma forma que o MPA, tiveram a ionização e a detecção otimizadas no espectrômetro de massas, de modo a obter íons precursores e fragmentos de alta intensidade nos espectros. As estruturas químicas dos candidatos a padrão interno são mostradas na **Figura 3.2**.



**Figura 3.2-** Estrutura química dos fármacos testados como padrão interno: Nevirapina (A), cetoprofeno (B) e naproxeno (C).

### **1.2.2.2 Análise cromatográfica**

A partir de injeções do MPA e padrão interno, alguns parâmetros foram alterados, com objetivo de otimizar a intensidade do sinal dos fármacos no espectrômetro de massas, o tempo de análise e a separação de interferentes da matriz.

Como solventes orgânicos da fase móvel, acetonitrila e metanol foram avaliados quanto à intensidade do sinal e seletividade em relação aos fármacos. O solvente aquoso inicialmente testado também foi alterado. A proporção do solvente orgânico na fase móvel também foi otimizada, visando à obtenção de tempos de corrida curtos. Apenas o modo isocrático foi avaliado, visto que os resultados obtidos foram satisfatórios e a utilização de um gradiente não se fez necessária.

A coluna cromatográfica utilizada foi uma C18 Shodex (150 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) mantida a 40 °C. A vazão da fase móvel foi 1 mL/min.

Como a vazão de análise utilizado na cromatografia líquida é consideravelmente superior à vazão de entrada no qual o espectrômetro de massas pode operar, foi utilizada uma conexão T entre a saída do cromatógrafo e a entrada do detector. Assim, foi feita uma divisão da vazão (split), de forma que 90% do solvente proveniente do cromatógrafo eram descartados e apenas 10% eram introduzidos no espectrômetro de massas. Esse procedimento foi realizado para evitar saturação do detector de massas e uma consequente perda de sinal.

### **1.2.2.3 Extração dos fármacos do vítreo**

Para extração do MPA e padrão interno do vítreo, o método empregado foi o de precipitação de proteínas, por ser muito utilizada quando se deseja processar um número grande de amostras em função de sua rapidez e simplicidade. Esse método foi priorizado em detrimento da extração em fase sólida e extração líquido-líquido devido ao custo consideravelmente maior desses últimos, seja pelo material em si ou pelo maior consumo de solventes.

Para otimização das etapas de extração, foi feita a adição de MPA e do padrão interno em vítreo branco de coelhos, obtido de animais de abate que não estavam recebendo qualquer medicação. As faixas de concentração avaliadas foram inicialmente definidas com base nos dados sobre a farmacocinética dos fármacos no estudo *in vitro* previamente realizado. Como a concentração de MPA nos implantes é relativamente baixa e a liberação do fármaco é feita aos poucos, priorizou-se uma recuperação maior do fármaco a uma extração mais limpa. A faixa de concentração vítrea foi 3 a 10000 ng/mL.

Metanol, acetonitrila e acetona, com ou sem a adição de ácido fosfórico 10% ou hidróxido de amônio 10%, foram avaliados como agentes precipitantes visando a aumentar a eficiência de extração dos fármacos e minimizar a extração simultânea de interferentes da matriz.

Para avaliação da extração, foram preparadas soluções padrão de MPA a 45, 20000 e 40000 ng/mL em metanol. Todas essas soluções continham também o padrão interno em uma concentração fixa de 20000 ng/mL. Em tubos do tipo Ependorf de 2 mL, uma alíquota de 25  $\mu$ L dessas soluções foi adicionada a 100  $\mu$ L de amostras de vítreo branco, de forma a obter soluções com concentrações vítreas finais de 9, 4000 e 8000 ng/mL para o MPA e 4000 ng/mL para o padrão interno. Foram então adicionados aos tubos 275  $\mu$ L de solvente extrator e, em seguida, agitou-se em vórtex por 1 minuto. Os tubos foram centrifugados a 15000 rpm por 5 minutos e 300  $\mu$ L do sobrenadante foram retirados e colocados em vials com inserts.

#### **1.2.2.4 Validação do método bioanalítico**

O método bioanalítico desenvolvido foi validado seguindo os procedimentos preconizados na Resolução RE n° 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA e no Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos recomendado pelo U.S. Food and Drug Administration (Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation, 2001).

##### **1.2.2.4.1 Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada pela análise de seis amostras de vítreo branco para verificação da existência de interferentes provenientes do humor vítreo. Dentre as seis amostras analisadas, duas eram compostas por vítreo hemolisado e quatro por vítreo puro, todas obtidas de diferentes animais sadios que não estavam recebendo qualquer medicação.

Os cromatogramas dessas amostras foram comparados com aqueles obtidos isoladamente para o padrão interno na concentração de trabalho e para o MPA na concentração do Limite Inferior de Quantificação (LIQ) (3 ng/mL). A presença de interferentes no mesmo tempo de retenção de algum dos fármacos analisados pode ser aceita, desde que a resposta de picos interferentes seja inferior a 20% da resposta do fármaco no LIQ. No caso do padrão interno, a resposta de picos interferentes deve ser inferior a 5% da resposta na concentração utilizada. Qualquer amostra branco que apresentar interferência significativa no tempo de retenção do fármaco ou do padrão interno deve ser rejeitada.

##### **1.2.2.4.2 Linearidade**

A linearidade do método foi avaliada por meio de curvas analíticas de seis pontos plotadas para resposta (área do fármaco/área do padrão interno) versus a concentração do fármaco. Foram preparadas soluções estoque de MPA e padrão interno, que foram então diluídas para soluções de contaminação contendo ambos os fármacos, e que, em seguida, foram adicionadas a vítreos brancos. A faixa de concentração no humor vítreo

avaliada foi de 3 a 10000 ng/mL para o MPA. O preparo das soluções estoque de MPA e de padrão interno estão descritas a seguir.

*Solução estoque MPA (500 µg/mL):* 12,5 mg de MPA SQR foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se 15 mL de metanol, submeteu-se a banho de ultrassom por 2 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente.

*Solução estoque de padrão interno (1000 µg/mL):* 10 mg de padrão interno SQR foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 8 mL de metanol, submeteu-se a banho de ultrassom por 2 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente.

Em seguida, as soluções estoque dos fármacos foram diluídas em metanol para balões volumétricos únicos, dando origem a soluções de contaminação conforme demonstrado na **Tabela 3.3**.

Além das soluções correspondentes aos seis pontos da curva analítica, foram preparadas também soluções de Controle de Qualidade, em três diferentes concentrações: baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA). As amostras de controle de qualidade foram analisadas com as amostras da corrida analítica para verificar a conformidade do sistema e das condições empregadas. A concentração do CQB deve ser menor ou igual a três vezes o limite inferior de quantificação, o CQM deve ser aproximadamente a média entre o CQB e o CQA, e o CQA deve estar compreendido entre 75% e 90% da maior concentração da curva de calibração. As diluições para construção das soluções de contaminação das soluções controle assim como suas concentrações no vítreo também estão mostradas na **Tabela 3.3**.

**Tabela 3.3 – Diluições para construção das soluções de contaminação de MPA para avaliação da linearidade do método bioanalítico por LC-MS/MS.**

Ponto da curva	Concentração no vítreo (ng/mL)	Solução de contaminação (ng/mL)	Volume pipetado (µL)	Solução Mãe (ng/mL)	Balão (µL)
1	3	15	300	500 (sol. 3)	10000
2	30	150	300	5000 (sol. 4)	10000
3	100	500	1000	5000 (sol. 4)	10000
4	1000	5000	100	500000	10000
5	5000	25000	500	500000	10000
6	10000	50000	1000	500000	10000
CQB	9	45	900	500 (sol. 3)	10000
CQM	4000	20000	400	500000	10000
CQA	8000	40000	800	500000	10000

CQB, CQM e CQA são soluções Controle de Qualidade em concentrações: Baixa, Média e Alta, respectivamente.

Cada solução de contaminação se refere a um ponto da curva, e todas possuem o padrão interno em concentração constante. Dessa forma, para preparar a solução correspondente ao sexto ponto da curva, por exemplo, transferiu-se 1000 µL da *solução estoque de MPA* e 0,2 mL da *solução estoque de padrão interno* para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com metanol.

Para o preparo das amostras em vítreo, 25 µL das soluções descritas na Tabela 3.3 foram adicionadas em 100 µL de vítreo branco, seguido da agitação em vórtex por 40 segundos para homogeneização. As concentrações no humor vítreo obtidas e empregadas para construção da curva analítica também estão demonstradas na **Tabela 3.3**.

As amostras de vítreo nas concentrações descritas na Tabela 3.3 foram submetidas ao processo de extração e analisadas conforme o procedimento otimizado. Além disso, incluiu-se também a análise de uma amostra branco (vítreo isento de padrão do fármaco e de padrão interno) e de uma amostra zero (vítreo isento de padrão do fármaco e com o padrão interno).

Para avaliação da linearidade do método, curvas analíticas com seis concentrações, cada uma em duplicata, foram plotadas em três dias consecutivos. Os critérios de aceitação utilizados foram coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,98, desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LIQ e desvio menor ou igual 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva. No mínimo 10 das doze concentrações da curva analítica devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o ponto 1 e a maior concentração da curva.

#### 1.2.2.4.3 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas por meio da análise em quintuplicata de amostras de vítreo contendo MPA em três diferentes concentrações. Essas amostras são chamadas de amostras Controle de Qualidade baixo, médio e alto (CQB, CQM e CQA, respectivamente) e suas concentrações foram determinadas baseadas na faixa linear utilizada e foram: 3 ng/mL (CQB), 4000 ng/mL (CQM) e 8000 ng/mL (CQA). As amostras de vítreo contendo o fármaco nessas concentrações foram extraídas e analisadas conforme o procedimento otimizado. As análises foram realizadas em três dias consecutivos, de forma que foram avaliadas precisão e exatidão, intra-corrída e inter-corrídas. A precisão do método é expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV), sendo que não foram admitidos valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admitiu valores menores ou iguais a 20%. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, multiplicada por 100. A exatidão de métodos bioanalíticos deve estar compreendida entre 85% e 115%, exceto para o LIQ, para o qual se admitem valores dentro da faixa de 80% a

120%. Esses valores, que foram considerados para avaliar a adequação do método, estão de acordo com os estabelecidos na RDC 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA.

#### 1.2.2.4.4 Recuperação

A recuperação do método foi avaliada por meio da análise em quintuplicata de amostras de vítreo contendo MPA em três diferentes concentrações: CQB (3 ng/mL), CQM (4000 ng/mL) e CQA (8000 ng/mL). A recuperação do padrão interno também foi avaliada na concentração de trabalho utilizada (4000 ng/mL).

Para se calcular a recuperação conseguida com todos os solventes testados durante a extração, o mesmo procedimento foi feito para todas as análises substituindo-se o vítreo por água ultrapura. Os resultados foram comparados e consideraram-se como 100% os resultados das amostras “extraídas” da água. Em todos os procedimentos avaliados, foi realizada a extração simultânea de uma amostra de vítreo branco, que não havia recebido os fármacos nem os padrões internos, visando à avaliação de possíveis interferentes provenientes do meio. Além disso, analisou-se também uma amostra de vítreo branco sem o MPA, no qual foi adicionada apenas a solução dos padrões internos para avaliação de interferentes do padrão interno na análise.

Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximas a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

#### 1.2.2.4.5 Efeito Matriz

Para avaliação do efeito de matriz, amostras de vítreo branco foram submetidas ao processo de extração de acordo o procedimento otimizado. Em seguida, a 300 µl do sobrenadante obtido, foram adicionados 100 µl de solução dos fármacos (MPA e padrão interno) em fase móvel. Para comparação, a 300 µl de fase móvel, foram adicionados 100 µl da mesma solução dos fármacos em fase móvel. Assim, se o sobrenadante do vítreo contivesse alguma substância endógena capaz de alterar a

ionização dos fármacos, as áreas dos picos dos fármacos nessa amostra seriam diferentes daquelas obtidas com a solução diluída apenas em fase móvel.

Essa avaliação foi feita empregando-se amostras de vítreo branco obtidas de seis animais diferentes, em duas concentrações dos fármacos: CQB (3 ng/mL) e CQA (8000 ng/mL). A concentração analisada do padrão interno foi a de trabalho (4000 ng/mL). Considera-se que não há efeito de matriz quando a diferença entre a área do pico do analito na solução diluída no sobrenadante extraído do vítreo e aquela obtida em fase móvel é inferior a 15%.

#### 1.2.2.4.6 Limite inferior de quantificação (LIQ)

O limite inferior de quantificação pode ser estabelecido por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. Para isso, amostras vítreas com concentrações próximas ao LIQ foram analisadas em quintuplicata e foram determinadas a precisão e exatidão. A resposta do fármaco no LIQ deve ser reprodutível com precisão de 20% e exatidão de 80% a 120%. Ao mesmo tempo, por meio da avaliação da relação sinal/ruído do cromatograma, a resposta do LIQ deve ser, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção do fármaco.

#### 1.2.2.4.7 Estabilidade

Para avaliar a estabilidade das amostras no método desenvolvido, foram realizados testes de estabilidades de curta duração (ECD), longa duração (ELD), pós-processamento (EPP) e ciclos de congelamento e descongelamento (ECCD). Todos os tipos de estabilidade foram avaliados empregando-se concentrações baixa e alta dos fármacos (CQB e CQA), cada uma em quintuplicata. As amostras foram consideradas estáveis quando não se verificou desvio superior a 15% em relação ao valor obtido em amostras recém preparadas. Além disso, em todas as análises, o desvio padrão relativo

deve ser inferior a 15% e a exatidão deve estar compreendida dentro da faixa de 85% a 115%.

#### *1.2.2.4.7.1 Estabilidade de curta duração (ECD)*

Para avaliação da estabilidade de curta duração, as amostras de humor vítreo permaneceram por um período de tempo em temperatura ambiente antes da extração e análise.

Amostras de vítreo contendo o fármaco foram descongeladas e mantidas a temperatura ambiente por 6 horas. Após esse tempo, outras amostras de vítreo foram descongeladas e todas foram submetidas ao processo de extração e análise. As concentrações de MPA das amostras de estabilidade de curta duração foram comparadas às aquelas de amostras recém preparadas.

#### *1.2.2.4.7.2 Estabilidade de longa duração (ELD)*

O tempo de armazenamento das amostras de vítreo em freezer para o estudo de estabilidade de longa duração deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última, de acordo com o cronograma proposto no protocolo do estudo clínico.

Para avaliação da estabilidade de longa duração, amostras de vítreo contendo MPA nas concentrações dos controles CQB e CQA foram preparadas e armazenadas em freezer a -70 °C por 4 meses. Após esse período de tempo, as amostras foram então descongeladas e analisadas, e as concentrações obtidas foram comparadas com aquelas de amostras recém preparadas.

#### *1.2.2.4.7.3 Estabilidade pós-processamento (EPP)*

Em caso de utilização de equipamentos que empregam sistemas automáticos de injeção, deve-se avaliar a estabilidade dos fármacos nas amostras processadas

(incluindo o padrão interno), na temperatura sob a qual o teste será realizado e por período de tempo superior à duração das corridas analíticas do conjunto de amostras.

Para avaliação da estabilidade pós-processamento, amostras de vítreo foram submetidas ao processo de extração e mantidas na bandeja do injetor automático por 9 horas antes da injeção. A temperatura da bandeja do injetor automático foi programada para 4 °C, de forma que as amostras foram mantidas sob refrigeração. As concentrações obtidas foram comparadas com aquelas de amostras injetadas imediatamente após a extração.

#### *1.2.2.4.7.4 Estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento (ECCD)*

A estabilidade dos analitos deve ser avaliada após três ciclos de congelamento e descongelamento. Para isso, amostras de vítreo recém preparado foram congeladas a -70 °C e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento até atingir a temperatura ambiente. Após completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas a -70 °C por 24 horas e assim sucessivamente, até completar três ciclos. Ao final do terceiro ciclo, as amostras foram analisadas e a concentração do fármaco foi comparada com aquelas obtidas em amostras recém preparadas.

## 2 Resultados e Discussão

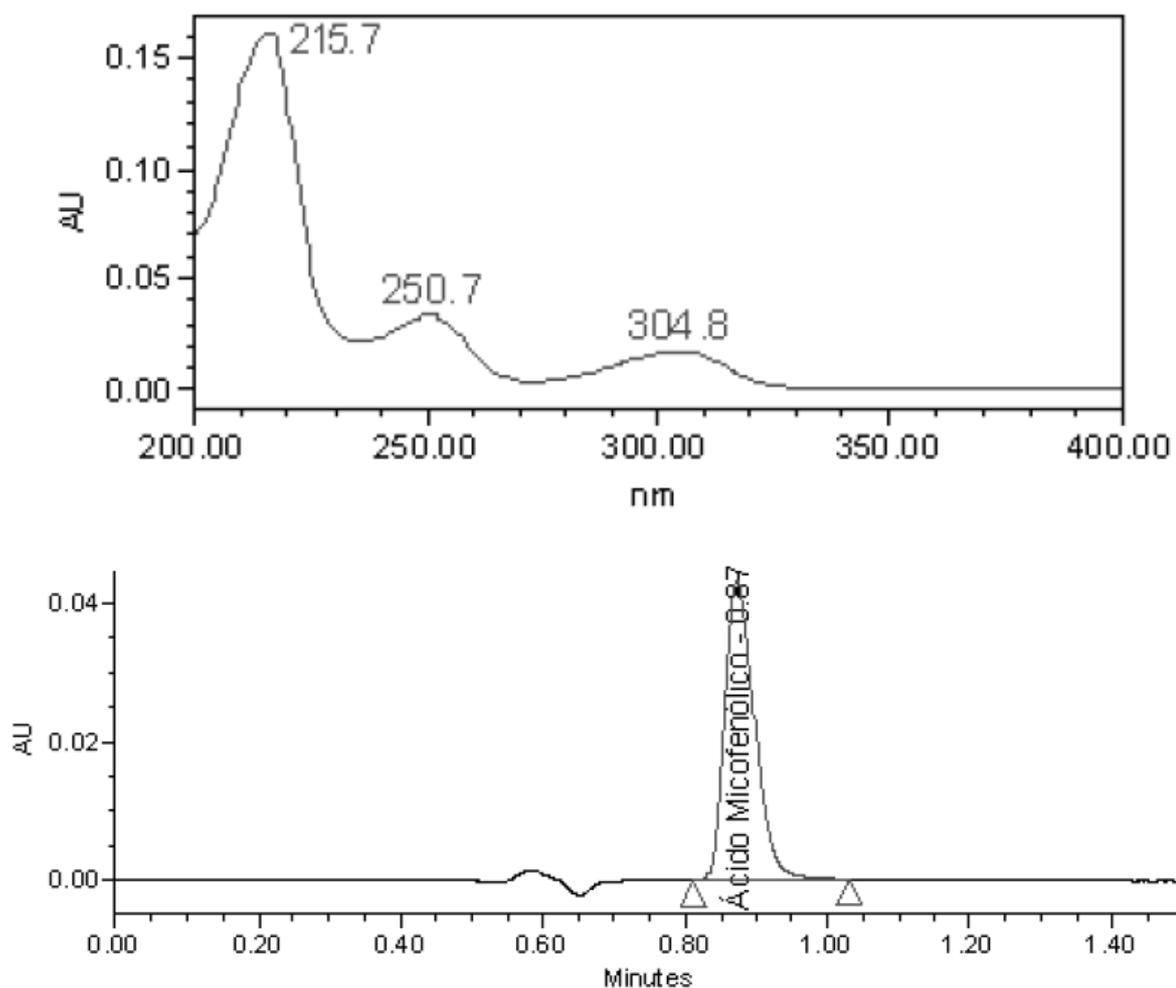
### 2.1 Desenvolvimento de método analítico em Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) para a determinação de MPA nos implantes e no meio de liberação utilizado no estudo *in vitro*.

UPLC (do inglês, Ultra Performance Liquid Chromatographic) é o avanço mais recente das técnicas de separação. Baseia-se nos mesmos princípios da cromatografia líquida de alta eficiência e utiliza fases estacionárias com partículas menores que 2  $\mu\text{m}$ . O uso dessas partículas menores associado a altas velocidades lineares da fase móvel aumentam muito a pressão do sistema. Consequentemente, a resolução é aumentada, e o tempo de análise e o gasto com solventes são diminuídos (MALDANER 2009). Para possibilitar a execução dessa modalidade de técnica cromatográfica, equipamentos que podem operar em pressões acima de 5000 psi devem ser utilizados. Neste estudo utilizou-se um cromatógrafo Waters modelo Acquity com capacidade de suportar pressões de até 15000 psi.

Durante o desenvolvimento do método cromatográfico, metanol e acetonitrila foram testados como fase orgânica e, talvez pelo baixo tempo de corrida das análises, não demonstraram grande diferença em relação à seletividade do MPA. Em proporções semelhantes, o tempo de retenção e a simetria dos picos obtidos com ambos os solventes testados foram muito próximos. Contudo, a intensidade dos picos foi consideravelmente mais alta quando se utilizou a acetonitrila, provavelmente devido ao fato de o metanol absorver mais energia do que a acetonitrila na região do ultravioleta. O ácido fórmico foi utilizado para se promover uma acidez no meio de modo que o MPA permanecesse em sua forma não ionizada e aumentasse sua interação com a fase estacionária da coluna de modo a permanecer um pouco mais retido. A utilização do ácido também promoveu maior repetibilidade dos resultados em dias diferentes de análise uma vez que ele minimiza a variação do pH da fase móvel.

Após avaliação do espectro do MPA na região do ultravioleta (200 a 400 nm),  $\lambda = 250$  nm foi selecionado para detecção e realização das análises. Esse comprimento de

onda foi escolhido devido à maior intensidade e presumível maior seletividade em relação a possíveis interferências provenientes de solventes e da matriz das amostras. Na **Figura 3.3**, são mostrados um espectro na região do ultravioleta e um típico cromatograma de uma amostra de MPA.



**Figura 3.3 – Espectro na região do ultravioleta e cromatograma típico de amostras de MPA.**

### 2.1.1 Validação do método cromatográfico

Após realização do desenvolvimento cromatográfico, o método otimizado foi validado segundo os procedimentos recomendados na Resolução RDC n° 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA e no Guia de Validação de Procedimentos Analíticos ICH (1996).

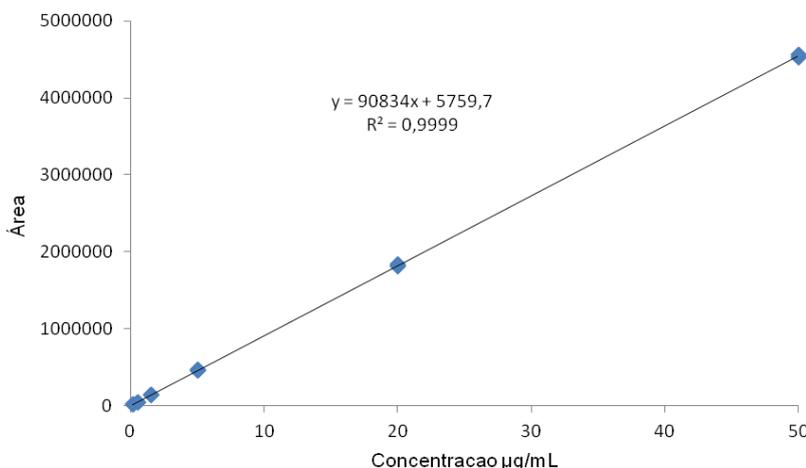
### **2.1.1.1 Seletividade**

A determinação da pureza do pico cromatográfico de MPA foi realizada com auxílio do detector de arranjo de diodos e o resultado encontrado foi de 99,98%. Esse elevado valor de pureza de pico obtido indica que outros compostos provenientes da extração dos implantes ou do meio de liberação *in vitro* não coeluíram com o pico de interesse.

### **2.1.1.2 Linearidade**

Para se determinar uma faixa linear de trabalho levou-se em consideração que o método deveria ser muito sensível, pois seria aplicado ao estudo de liberação *in vitro*, no qual se esperava encontrar pequenas concentrações de MPA liberadas por tempo. Todavia, o método também deveria ser capaz de quantificar concentrações mais altas de MPA, pois seria igualmente utilizado na determinação de MPA presente nos implantes recém fabricados. Levando-se em consideração que os implantes produzidos têm em média 1,7 mg e que 10% corresponde ao fármaco, é esperado um máximo de 170 µg de MPA. Como haveria uma etapa de preparação da amostra na qual os implantes ainda seriam diluídos, julgou-se que um máximo de detecção em 50 µg/mL seria suficiente. O limite de quantificação será discutido posteriormente na seção 2.1.2.4. A concentração de trabalho otimizada teve então uma faixa de 0,5 a 50 µg/mL. A curva analítica está representada na **Figura 3.4**.

As curvas de calibração obtidas sugeriram correlação linear adequada entre a resposta do método e a concentração de MPA. A regressão foi significativa e o valor do coeficiente de correlação encontrado foi de 0,9999. Os gráficos de resíduos versus as concentrações de MPA demonstraram distribuição aleatória indicando ausência de tendências.



**Figura 3.4 - Curva analítica do MPA para avaliação da linearidade do método de quantificação por UPLC.**

### **2.1.1.3 Precisão**

A precisão, intra-corrída e inter-corrídas, do método foi avaliada por meio de seis determinações de MPA a 10 µg/mL. Os valores de DPR obtidos nas análises da precisão intra-corrída (n=6) e inter-corrídas (n=12) foram 1,15% e 1,12%, respectivamente. Assim sendo, a precisão do método foi demonstrada pela obtenção de valores de DPR abaixo de 2,0%

### **2.1.1.4 Limite de quantificação**

Os limites de detecção e de quantificação estimados a partir da curva analítica foram 0,10 µg/mL e 0,3 µg/mL, respectivamente. Os cromatogramas de MPA nessas concentrações apresentaram relações entre sinal e ruído superiores ao preconizado por THE INTERNATIONAL... (2005). O limite de quantificação obtido foi sensível o suficiente para prosseguir com a quantificação de fármaco presente nos implantes assim como analisar a liberação *in vitro*.

### **2.1.1.5 Robustez**

A robustez do método foi verificada quanto a variações na proporção da fase móvel, variação na proporção de ácido na fase aquosa e variação na temperatura no forno da coluna. Os resultados das três análises de MPA em cada condição foram comparados estatisticamente por análise de variância (ANOVA).

Verificou-se que dentre todos os parâmetros testados, o único que mostrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ), entre os valores obtidos, foi o de temperatura do forno da coluna a 25 °C. Sendo assim, verificou-se que o método foi sensível à variação de temperatura e que valores abaixo dos 30 °C estipulados como uma temperatura nominal devem ser evitados para não se comprometer os resultados das análises. Variações para temperaturas superiores a 30 °C foram toleradas.

## **2.2 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação de MPA em vítreo de coelhos por LC-MS/MS**

### **2.2.1 Detecção por espectrometria de massas**

A ionização e detecção do MPA por ESI(+) foi avaliada por meio de infusão direta de uma solução a 500 ng/mL acidificada com ácido fórmico (0.05% v/v). Os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados, e a voltagem do cone foi gradativamente aumentada, de modo a obter íon precursor de alta intensidade. Assim, utilizou-se voltagem do capilar de 4 V, voltagem do cone de 18 eV, cone extrator de 4 V, lentes RF 0,5, resolução LM/HM de 10/7,5, temperatura da fonte 120 °C e temperatura de desolvatação 400 °C. Nessas condições, foi obtido íon precursor  $[M+H]^+$  com relação massa/carga ( $m/z$ ) igual a 320,9 que corresponde à massa molar do MPA (319,95 g/mol) somada à massa molar do hidrogênio.

Em seguida, foram aplicadas voltagens crescentes na câmara de colisão, com o objetivo de fragmentar o íon precursor do MPA. No espectro de fragmentação obtido com uma energia de colisão de 22 eV (Daughter Scan), o fragmento de maior

intensidade foi  $m/z$  207,2. Assim, adotou-se a transição de  $m/z$  320,9 para  $m/z$  207,2 para a detecção do MPA por espectrometria de massas em ESI(+).

Devido ao grupamento químico ácido presente na molécula do MPA, também se tentou a ionização da molécula no modo negativo ESI(-) para que fosse feita uma comparação com o objetivo de descobrir em qual modo de ionização se obteriam íons mais intensos. O procedimento foi o mesmo daquele realizado para a ionização por ESI(+). Após a infusão direta da solução de MPA a 500 ng/mL (alcalinizada com hidróxido de amônio 0,05%) e otimização das voltagens do cone, capilar, cone extrator, lentes e temperaturas da fonte e desolvatação, o íon precursor esperado,  $[M-H]^-$ , com relação massa/carga ( $m/z$ ) igual a 318,9, apresentou intensidade muito baixa. Os maiores picos encontrados com o modo negativo se tratavam de íons adultos do MPA formados com o íon amônio ( $NH_4$ ), sendo que o mais intenso exibia sinal na ordem de mil vezes menor que o pico conseguido com o modo positivo. Devido a isso, a ionização no modo negativo não foi utilizada e o modo positivo foi selecionado para promover a ionização do MPA no método.

Após otimização da detecção para o MPA, foram feitas, isoladamente, infusões diretas de soluções de todos os candidatos a padrão interno: cetoprofeno, nevirapina e naproxeno. Para a quantificação simultânea de dois ou mais fármacos no espectrômetro de massas, todos os parâmetros do detector devem ser os mesmos, com exceção das energias do cone e de colisão, que podem ser otimizadas individualmente para cada fármaco. As condições previamente otimizadas para o MPA se mostraram adequadas também à ionização e à detecção de todos os candidatos a padrão interno.

Para o naproxeno, empregou-se energia do cone de 20 eV e energia de colisão de 15 eV. O íon precursor selecionado  $[M+H]^+$  foi de  $m/z$  231,1. No processo de fragmentação, o íon de maior intensidade obtido foi  $m/z$  185,4.

Para a nevirapina, as energias de cone e colisão otimizadas foram 45 e 25 eV, respectivamente. O íon precursor selecionado  $[M+H]^+$  foi  $m/z$  267,3, e o fragmento de maior intensidade foi  $m/z$  226,6.

Para o cetoprofeno, as energias de cone e colisão otimizadas foram 25 e 15 eV, respectivamente. O íon precursor selecionado  $[M+H]^+$  foi  $m/z$  254,9, e o fragmento de maior intensidade foi  $m/z$  209,1.

### **2.2.2 Extração dos fármacos do vítreo e análise cromatográfica**

As análises cromatográficas de MPA e de seus candidatos a padrão interno foram realizadas em coluna Shodex C18 (150 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) a 40 °C. A vazão da fase móvel foi 1 mL/min. A composição e proporção dos solventes na fase móvel foram otimizadas de modo a obter sinais de alta intensidade no espectrômetro de massas e tempo de corrida curto.

Para otimizar o sinal e a separação cromatográfica, uma solução contendo MPA, naproxeno, nevirapina e cetoprofeno, todos a 250 ng/mL, foi injetada em diferentes constituições de fase móvel. Os parâmetros área do pico do MPA, tempo de retenção e formato dos picos foram avaliados para se escolher a melhor fase móvel.

Para a ionização do MPA no modo ESI(+), foram testadas algumas composições de fases aquosas contendo ácido. Ácido acético e ácido fórmico nas proporções de 0,025%, 0,05%, 0,1%, foram testados isoladamente. Ácido fórmico e formiato de amônio na proporção 0,025% e 2 mM, respectivamente, também foi uma fase aquosa testada. Todas essas fases aquosas foram testadas em diferentes proporções utilizando metanol ou acetonitrila para compor a fase orgânica.

Percebeu-se que a acetonitrila melhora a ionização do MPA resultando em sinais mais intensos. Contudo, os formatos dos picos com a utilização do metanol ficam muito mais simétricos. Uma vez que o ganho de sinal com acetonitrila em relação ao metanol não eram tão acentuados, deu-se preferência pelo uso do metanol visto que a melhor

simetria dos picos também é um fator importante no momento da integração, além de o metanol ser um solvente menos oneroso.

Como na cromatografia acoplada à espectrometria de massas cada fármaco é detectado por meio de uma transição distinta, não é necessário obter resolução de linha base entre os picos no cromatograma, o que também contribui para obtenção de tempos de corrida curtos. Entretanto, é imprescindível avaliar a interferência de constituintes da matriz que coeluem com os fármacos de interesse, que podem suprimir ou induzir a ionização dos mesmos. Nesse caso, as condições cromatográficas devem ser alteradas, visando a separação adequada entre picos de interesse e os interferentes em potencial.

A presença de ácido acético 0,1% na fase aquosa, dentre todas as testadas, foi a que mais aumentou o sinal do MPA e conferiu simetria aos picos. A proporção entre metanol e ácido acético 0,1% foi otimizada em (8:2) para se conseguir uma boa retenção capaz de separar os fármacos dos constituintes da matriz que por ventura também possam ser extraídos. Uma proporção de metanol mais elevada na fase móvel é desejável para obtenção de sinais de alta intensidade e tempo de corrida curto. Nessa condição, o método foi finalizado obtendo-se um tempo de corrida de 4,5 minutos.

Após o estabelecimento da condição cromatográfica capaz de determinar os fármacos, procedeu-se um teste de comparação para selecionar qual seria o melhor padrão interno para a análise. A nevirapina ficou menos retida na coluna e seu comportamento não foi muito constante nessas condições, pois em alguns momentos o pico se deformou. O naproxeno apresentou bons resultados e boa semelhança com o MPA durante a cromatografia e provavelmente seria um bom fármaco para se utilizar como padrão interno na análise. Contudo, o fármaco selecionado para ser o padrão interno do método foi o cetoprofeno. Esse fármaco apresentou maior sinal cromatográfico e uma resposta mais próxima à do analito principal durante a cromatografia, na qual os dois picos praticamente coeluíram. Na **Figura 3.5**, são mostrados os espectros de massas com e sem fragmentação do MPA e do cetoprofeno. Um cromatograma típico de uma corrida analítica é mostrado na **Figura 3.6**.

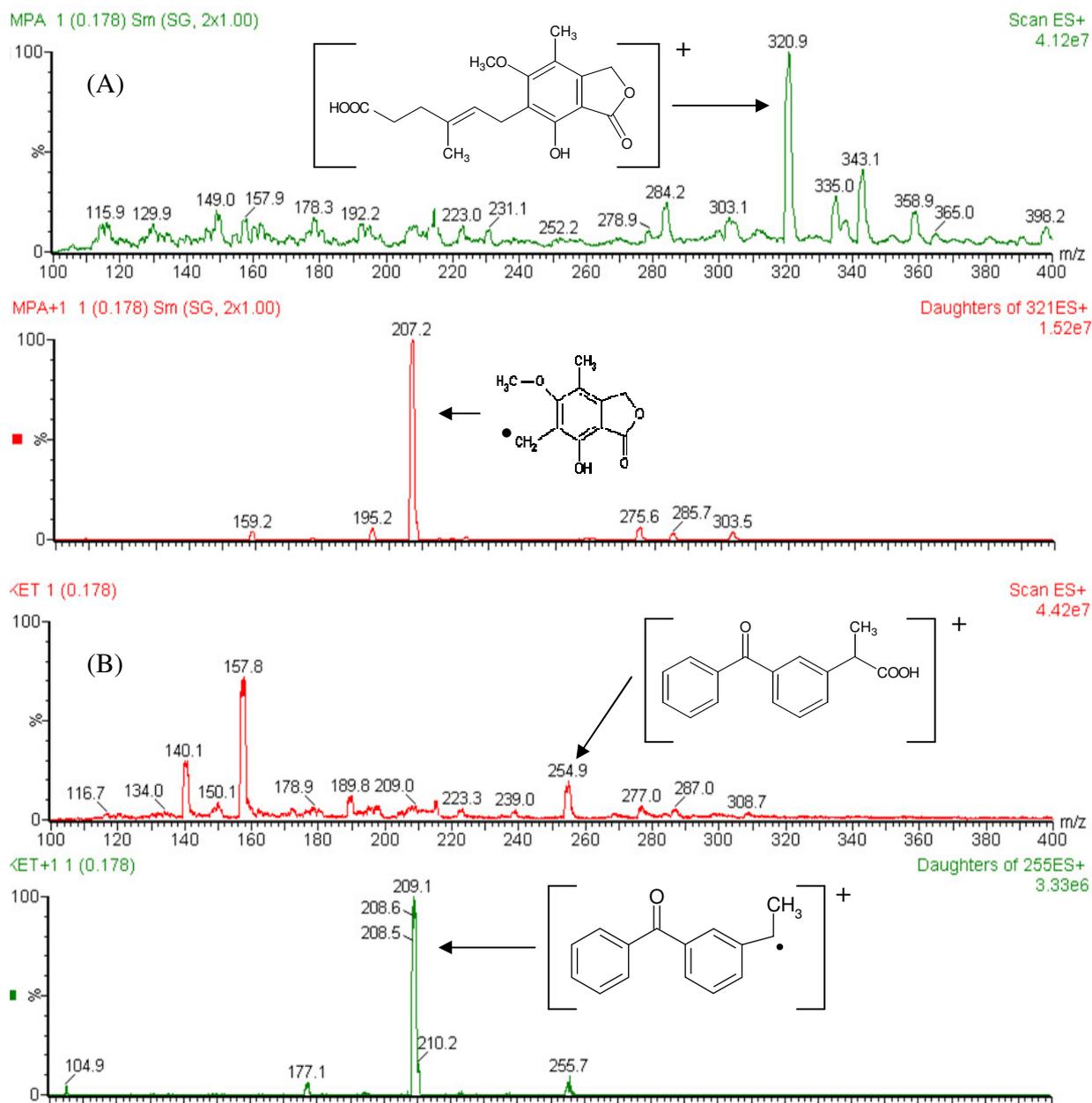
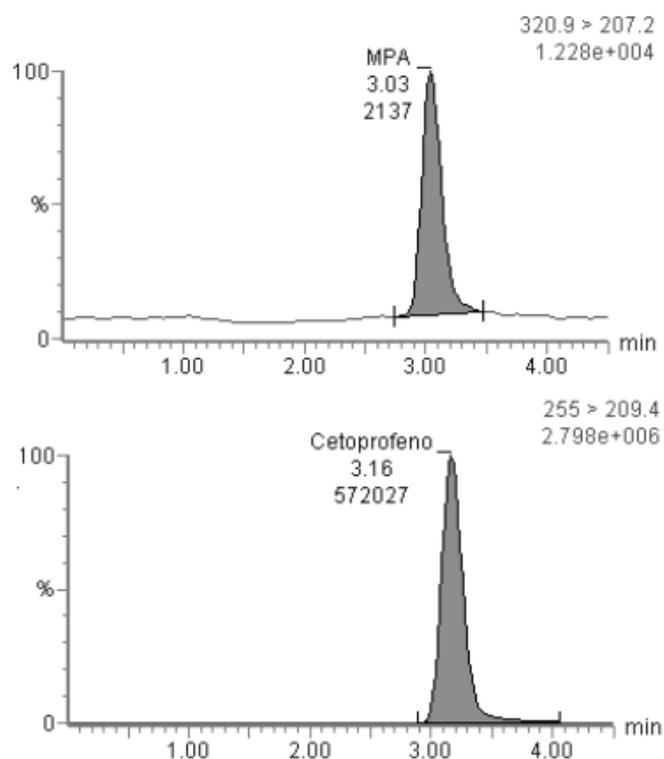


Figura 3.5 – Espectros de massas com e sem fragmentação para: (A) MPA e (B) cetoprofeno.



**Figura 3.6 – Cromatograma de uma corrida analítica do método**

Com a condição cromatográfica estabelecida e o padrão interno escolhido, vários procedimentos de extração foram avaliados para se dar prosseguimento ao método.

Um fator limitante do método de extração foi a pequena quantidade de vítreo que se dispunha. Não é possível retirar mais do que 1 mL de vítreo de cada animal, sendo que, em alguns casos, pouco mais 500  $\mu\text{L}$  foram conseguidos. Logo, tomadas de amostra com volumes grandes (maiores que 200  $\mu\text{L}$ ) seriam arriscadas, uma vez que, caso fosse necessário fazer uma reanálise, provavelmente não haveria volume de amostra suficiente.

Inicialmente, foi testado um método por precipitação de proteínas no qual 25  $\mu\text{L}$  de solução de padrão interno eram adicionados a 100  $\mu\text{L}$  de amostra de vítreo, seguido de agitação por 10 segundos em vórtex. Como a fase móvel era constituída em sua maioria por metanol (80%), utilizou-se primeiro o metanol como agente precipitante. Adicionou-se 375  $\mu\text{L}$  de metanol à solução e agitou-se em vórtex por 1 minuto. Após

centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e colocado em vial com insert. Injetou-se 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante no cromatógrafo.

Esse procedimento originou bons resultados, mas foi repetido substituindo-se o metanol por acetonitria ou acetona, em busca de resultados ainda melhores. A todos os agentes precipitantes avaliados, a adição de ácido fosfórico ou hidróxido de amônio a 10% (v/v) foi testada. O objetivo foi tentar promover uma extração maior do analito e/ou obter extratos mais limpos.

Nas extrações com acetonitrila ou acetona, houve problemas durante a cromatografia. O que se observou foi uma deformação dos picos dos fármacos, provavelmente por uma alteração na força do solvente da fase móvel quando esses solventes presentes no sobrenadante extraído eram injetados. A adição de uma base com o metanol durante a extração diminuiu consideravelmente a recuperação dos analitos enquanto a adição de ácido não alterou em nada a recuperação. Logo, o melhor procedimento testado foi o primeiro.

O procedimento de extração por precipitação de proteínas acaba por diluir a amostra. No primeiro caso, 100  $\mu\text{L}$  de vítreo foram diluídos com 25  $\mu\text{L}$  de padrão interno e 375 de agente precipitante (diluição de quatro vezes). Um novo teste foi feito visando conseguir sinais mais intensos diluindo-se menos a amostra, mas sem prejudicar a precipitação. Adicionou-se 275  $\mu\text{L}$  de metanol como agente precipitante em vez de 375  $\mu\text{L}$ , o que resultou em uma diluição de três vezes. Os resultados apresentaram sinais mais intensos e um sobrenadante igualmente límpido em relação ao primeiro, ou seja, sem prejuízo na precipitação. Dessa forma, o procedimento de extração otimizado foi:

- 100  $\mu\text{L}$  de vítreo.
- Adição de 25  $\mu\text{L}$  de solução de padrão interno.
- Vortex por 10 segundos.
- Adição de 275  $\mu\text{L}$  de metanol.
- Vortex 60 segundos
- Centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos.

- Retirar 300  $\mu$ L do sobrenadante.

O método de extração se mostrou simples, rápido e robusto, o que favorece a aplicação em procedimentos nos quais muitas amostras serão processadas.

### **2.2.3 Validação do método bioanalítico**

Após desenvolvimento e otimização do método por LC-ESI-MS/MS para quantificação de MPA em vítreo, procedeu-se o processo de validação, segundo procedimentos preconizados na Resolução RDC n° 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA e no Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos recomendado pelo U.S. Food and Drug Administration (Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation, 2001).

#### **2.2.3.1 Seletividade**

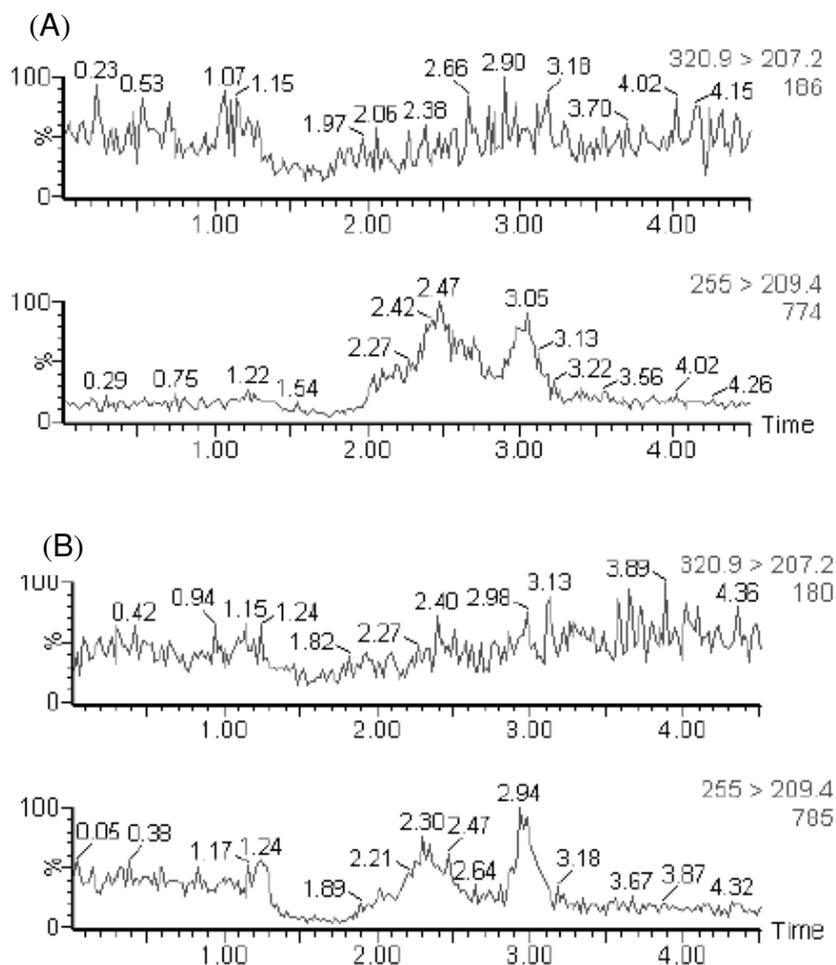
A seletividade do método foi avaliada pela análise de seis amostras de vítreo branco. Dentre as amostras analisadas, duas eram compostas por vítreo hemolisado e quatro por vítreo puro - todas obtidas de diferentes animais sadios que não estavam recebendo qualquer medicação. Esse teste visa averiguar a existência de interferentes provenientes do humor vítreo e que possam interferir na análise.

Empregou-se o procedimento de análise desenvolvido e otimizado às seis amostras. Em nenhuma foram verificados picos interferentes no mesmo tempo de retenção do MPA ou cetoprofeno. Um cromatograma das amostras de seletividades é demonstrado na **Figura 3.7**.

Nos cromatogramas obtidos, pode-se observar que em ambas as transições utilizadas apenas ruídos da linha de base são observados. Isso demonstra uma ausência de picos interferentes nos tempos de retenção dos fármacos, comprovando a seletividade do método bioanalítico para quantificação desses analitos no vítreo.

Foram feitas injeções de amostras de vítreo contendo MPA na concentração do limite inferior de quantificação (3 ng/mL), como demonstrado na **Figura 3.7**. Tal procedimento

foi realizado com o objetivo de verificar se o fármaco apresenta possíveis interferentes na transição do cetoprofeno (padrão interno) e para comparar a área de eventuais picos interferentes com a área dos analitos de interesse.



**Figura 3.7 - Cromatogramas das amostras de vítreo branco nos canais do MPA e do padrão interno. (A) vítreo normal e (B) vítreo hemolisado.**

A resposta de picos interferentes deve ser inferior a 20% da resposta do fármaco no limite inferior de quantificação e inferior a 5% da resposta do padrão interno na concentração utilizada. Contudo, em todas as análises realizadas, não foram visualizados picos interferentes nos mesmos tempos de retenção MPA e do cetoprofeno. Além disso, o sinal de um fármaco não apresentou interferência na transição do outro.

### **2.2.3.2 Linearidade**

A linearidade do método foi avaliada por meio de curvas analíticas de seis pontos, cada um em duplicata, plotadas pela resposta (área do fármaco/área do padrão interno) versus a concentração do fármaco, na faixa de 3 a 10000 ng/mL para o MPA. As curvas foram analisadas em três dias consecutivos e indicaram correlação linear adequada para o MPA, na faixa de concentração avaliada. Os dados obtidos para as curvas analíticas do MPA nos três dias estão demonstrados na **Tabela 3.4**.

**Tabela 3.4 – Dados obtidos para construção das curvas analítica de MPA nos 3 dias de análise.**

Conc. teórica (ng/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	Conc. obtida (ng/mL)	%Desvio	Conc. obtida (ng/mL)	%Desvio	Conc. obtida (ng/mL)	%Desvio
3	3,11	3,5	2,84	-5,4	2,90	-3,5
3	2,95	-1,7	3,14	4,7	3,11	3,6
30	28,11	-6,3	30,39	1,3	30,34	1,1
30	27,11	-9,6	30,79	2,6	29,02	-3,3
100	78,82	<b>-21,2*</b>	101,24	1,2	102,92	2,9
100	93,53	-6,5	110,22	10,2	101,24	1,2
1000	1117,98	11,8	1027,70	2,8	1027,37	2,7
1000	798,41	<b>-20,2*</b>	1006,57	0,7	952,35	-4,8
5000	5589,57	11,8	12732,69	<b>154,7*</b>	4690,00	-6,2
5000	4876,88	-2,5	4611,77	-7,8	5189,51	3,8
10000	9350,41	-6,5	9660,49	-3,4	10101,36	1,0
10000	10602,43	6,0	9308,51	-6,9	10128,56	1,3

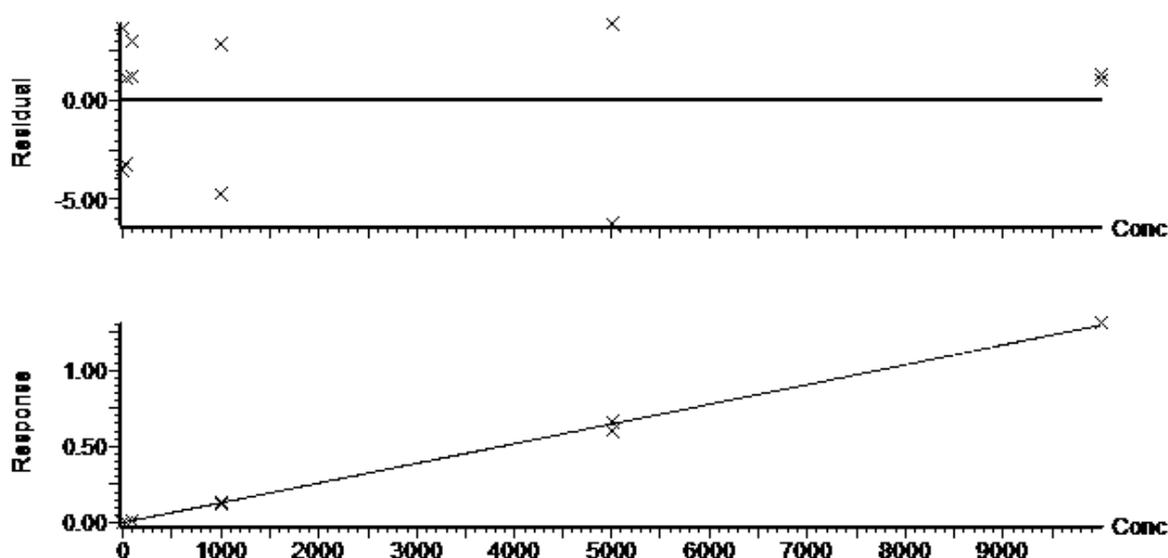
Os dados (destacados) que se mostraram fora dos limites pré-estabelecidos foram excluídos dos cálculos.

As três curvas analíticas de MPA, obtidas em dias consecutivos, atenderam aos critérios de aceitação preconizados, uma vez que todas apresentaram coeficiente de correlação superior a 0,98, desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LIQ, desvio menor ou igual 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva e no mínimo dez das doze concentrações da

curva analítica cumpriram com os critérios anteriores. As equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação estão demonstrados na **Tabela 3.5**. Na **Figura 3.8** está representada a curva analítica de MPA obtida no terceiro dia, assim como o gráfico de resíduos correspondente. Observa-se que os resíduos estão distribuídos de forma aleatória no gráfico, de forma que não se verificou qualquer tendência na curva.

**Tabela 3.5 – Equações das retas e respectivos coeficientes de correlação obtidos para o MPA, na avaliação da linearidade do método bioanalítico.**

Dia	Equação da reta	Coefficiente de correlação
1	$y = 0,000168746*x + 8.83985e-005$	0,992717
2	$y = 0,000150937*x + 0.000306737$	0,996547
3	$y = 0,000129444*x + 0.000106985$	0,998598



**Figura 3.8 – Gráfico de resíduos e curva analítica do MPA obtidos por regressão linear no terceiro dia de análise.**

Para construção das curvas analíticas de MPA, utilizou-se fator de ponderação ou fator de peso (weighting factor) igual a  $1/x^2$ . Em métodos bioanalíticos, a utilização de fatores de ponderação é um procedimento usual, adotado para compensar o aumento da variância decorrente do aumento da concentração dos analitos. Quando a faixa de concentração no eixo x é consideravelmente ampla (normalmente maior do que uma ordem de magnitude), pode-se esperar que as variâncias de cada ponto individual

sejam diferentes umas das outras. Desvios maiores observados nas concentrações mais elevadas tendem a influenciar a regressão linear de forma mais acentuada do que desvios menores associados às concentrações mais baixas (ROZET et al., 2007). Esse fato pode ser visualizado na plotagem do gráfico de resíduos versus as concentrações dos analitos, no qual se observa a distribuição dos resíduos em forma de corneta, ou seja, ocorre aumento da variância dos resíduos (tanto positivos quanto negativos) à medida que a concentração no eixo x aumenta. Assim, em métodos bioanalíticos, nos quais amplas faixas de concentração são necessárias, que é o caso desse método em que a faixa é de 3 a 10000 ng/mL, é comum não se verificar variâncias equivalentes ao longo das concentrações da curva, condição denominada heterocedasticidade. Uma forma efetiva de compensar essa situação é empregar a regressão linear ponderada (weighted linear regression) no ajuste da linha de regressão aos pontos da curva, o que diminui a influência das maiores variâncias verificadas nas maiores concentrações. Deve-se, então, escolher o fator de ponderação mais adequado ( $1/x$ ,  $1/x^2$ ,  $1/x^{1/2}$ ,  $1/y$ ,  $1/y^2$ ,  $1/y^{1/2}$ ) ao ajuste da reta aos pontos, de forma a obter menores desvios entre as concentrações experimentais e as nominais e coeficiente de correlação mais elevado. Além disso, com a utilização do fator de ponderação, é possível obter uma distribuição de resíduos aleatória ao longo das concentrações do eixo x (ALMEIDA et al., 2002)

### **2.2.3.3 Precisão e exatidão**

A precisão de um método analítico avalia a proximidade de medidas individuais do analito quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas amostras. A exatidão avalia a proximidade do resultado médio fornecido pelo método em relação ao valor verdadeiro (concentração conhecida) do analito.

A precisão e exatidão do método bioanalítico foram avaliadas em três concentrações diferentes de MPA (CQB, CQM e CQA), em quintuplicata, em três dias consecutivos. Os valores obtidos nas análises intra-corrida e inter-corridas estão demonstrados nas **Tabelas 3.6 e 3.7**, respectivamente.

De acordo com os resultados das **Tabelas 3.6** e **3.7**, observa-se que o método demonstrou ser preciso e exato para quantificação de MPA, uma vez que todos os valores de desvio padrão relativo (DPR) foram inferiores a 15% e, em todas as concentrações, a exatidão se manteve dentro da faixa de 85% a 115%. Verifica-se, ainda, que a precisão do método variou de acordo com a concentração dos analitos, sendo que concentrações maiores apresentaram menor desvio padrão relativo para ambos os fármacos (analito e padrão interno). A exatidão, por sua vez, se mostrou um parâmetro independente da concentração.

**Tabela 3.6 – Resultados da precisão e exatidão intra-corrída obtidos pelo método bioanalítico para quantificação de MPA.**

Replicata	Concentração de MPA (ng/mL)		
	9	4000	8000
1	8,65	4177,02	8075,19
2	8,37	4353,76	7873,67
3	8,46	4239,51	7416,45
4	8,17	4199,42	7618,57
5	9,32	4202,02	7457,23
Média (n=5)	8,59	4234,35	7688,22
DPR (%)	5,12	1,66	3,66
Exatidão (%)	95,49	105,86	96,10

**Tabela 3.7 – Resultados da precisão e exatidão inter-corridas obtidos pelo método bioanalítico para quantificação de MPA.**

Dia	Replicata	Concentração de MPA (ng/mL)		
		9	4000	8000
1	1	7,68	3835,14	8377,54
	2	9,71	3467,96	7056,20
	3	7,66	3600,65	6950,71
	4	7,98	3482,61	7029,00
	5	8,10	3685,14	7381,90
2	1	7,98	3862,68	6820,06
	2	7,90	3532,40	7098,68
	3	8,29	3669,54	7173,30
	4	7,92	3575,00	6960,10
	5	8,30	3644,23	7439,89
3	1	8,65	4177,02	8075,19
	2	8,37	4353,76	7873,67
	3	8,46	4239,51	7416,45
	4	8,17	4199,42	7618,57
	5	9,32	4202,02	7457,23
Média (n=15)		8,30	3835,14	7381,90
DPR (%)		7,10	8,18	6,30
Exatidão (%)		92,22	95,88	92,27

#### **2.2.3.4 Recuperação**

A recuperação avalia a eficiência do procedimento de extração de um método analítico, ou seja, a quantidade do fármaco que é efetivamente extraída no processo, em relação à quantidade originalmente presente na matriz biológica.

A recuperação do método bioanalítico foi avaliada em três concentrações diferentes de MPA (CQB, CQM e CQA), em quintuplicata, por meio da comparação entre as áreas de soluções dos fármacos em fase móvel com aquelas obtidas com amostras vítreas submetidas ao processo de extração, nas mesmas concentrações. A recuperação do cetoprofeno (padrão interno) também foi avaliada na concentração de trabalho utilizada (4000 ng/mL). Os resultados obtidos estão demonstrados na **Tabela 3.8**.

A porcentagem de recuperação média obtida para o MPA e cetoprofeno foram muito próximas, 73,38 e 75,13%, respectivamente. Tal fato mostra que a escolha do padrão

interno foi ideal uma vez que, segundo Snyder et al. (1997), o requisito mais importante para o padrão interno é que ele apresente o mesmo comportamento químico do analito no processo de extração e preparo da amostra. Embora uma recuperação de 100% seja a ideal, a recuperação próxima de 75 % para o MPA foi alta o suficiente para contribuir de forma direta para a sensibilidade do método bioanalítico. Isso demonstra que o procedimento de extração por precipitação de proteínas, apesar de ser consideravelmente simples e rápido, apresenta elevada eficiência de extração para o fármaco sem elevar o custo da análise quando comparada a outros métodos de extração, como a extração líquido-líquido e a em fase sólida.

**Tabela 3.8– Taxas de recuperação de MPA e de cetoprofeno obtidas pelo procedimento de extração.**

Fármaco	Taxas de recuperação (%)			Recuperação média (%)
	CQB	CQM	CQA	
MPA	79,32	74,40	66,40	73,38
Cetoprofeno	76,74	75,13	73,50	75,13

#### **2.2.3.5 Efeito de matriz**

O teste de avaliação da existência de efeito matriz tem como objetivo verificar se compostos endógenos da matriz biológica, que podem ser coeluídos com os fármacos de interesse, promovem supressão ou indução de ionização quando espectrometria de massas é empregada como método de detecção. Embora o vítreo seja uma matriz bem menos complexa quando comparada a outras matrizes, como o plasma, considerou-se prudente investigar a alteração que constituintes dessa matriz poderiam causar ao método.

Segundo Taylor (2005), os efeitos de matriz são o “calcanhar de Aquiles” de métodos bioanalíticos por LC-ESI-MS/MS. Esses efeitos são decorrentes de alterações na eficiência de ionização pela presença de substâncias oriundas da matriz biológica que coeluem com os analitos. O mecanismo exato do efeito de matriz ainda não é

conhecido, todavia, possivelmente se origina da competição entre o analito e componentes da matriz não detectados que coeluem. Dependendo do ambiente no qual os processos de ionização e evaporação dos íons ocorrem, essa competição pode efetivamente diminuir (supressão de ionização) ou aumentar (indução de ionização) a eficiência da formação dos íons desejados do analito, presentes na fonte de ionização. Desse modo, a eficiência da formação de íons do analito é diretamente dependente da matriz que entra simultaneamente na fonte de ionização (MATUSZEWSKY et al., 2003).

Matuszewsky e colaboradores 2003 destacam que tanto a supressão quanto a indução de ionização têm um efeito negativo na precisão do método, pois, uma vez que os compostos responsáveis pelo efeito matriz são provenientes da matriz, considerando-se a extensa variabilidade interindividual, amostras biológicas de diferentes voluntários podem promover efeitos de matriz em diferentes extensões. Além disso, a supressão de ionização apresenta efeito prejudicial no limite inferior de quantificação do método, uma vez que diminui sua sensibilidade de forma considerável.

A maioria dos efeitos matriz ocorre próximo ao tempo zero na corrida cromatográfica. Assim, intuitivamente, se os analitos forem retidos em certa extensão na coluna, os efeitos de matriz podem ser minimizados (TAYLOR, 2005). No presente trabalho, verificou-se que, ao tentar atingir menores tempos de corrida cromatográfica com a utilização de uma fase móvel com maior força de eluição, o efeito matriz de indução da ionização era observado. A redução na proporção de solvente orgânico diminuía a ocorrência dos efeitos matriz, provavelmente devido ao aumento no tempo de retenção dos fármacos e melhor separação dos interferentes presentes no vítreo. Entretanto, tal redução também diminuía a intensidade dos picos dos analitos, isso acontecia provavelmente devido a uma maior dificuldade de evaporação do solvente quando a proporção de solvente aquoso aumenta. Um ajuste fino foi feito para se atingir um ponto em que o efeito matriz foi aceitável sem que se perdesse sensibilidade e sem que o tempo das análises fosse aumentado.

A avaliação do efeito matriz foi realizada pela comparação das áreas dos picos dos analitos diluídos em fase móvel e diluídos no sobrenadante do vítreo obtido após o

processo de extração, segundo procedimento descrito por Matuszewski et al. (2003). Duas concentrações de MPA (CQB e CQA) e a concentração de trabalho de cetoprofeno (4000 ng/mL) foram avaliadas em amostras de vítreo obtidas de seis animais diferentes. Os resultados obtidos estão demonstrados na **Tabela 3.9** e **Tabela 3.10**. O desvio individual da área de cada amostra vítrea foi calculado em relação à área média da solução em fase móvel.

Segundo descrito nas referências empregadas para a realização desse teste (MATUSZEWSKI et al., 2003 e TAYLOR, 2005), a variação máxima permitida entre os resultados das amostras extraídas e aquelas em fase móvel é de 15%.

Os resultados obtidos demonstram que não houve efeito de matriz significativo para o MPA ou para o padrão interno, uma vez que todos os desvios obtidos ficaram dentro da faixa de  $\pm 15\%$ . De todas as amostras analisadas a maior variação foi de 14,9%, de forma que ainda foi possível identificar leve tendência de indução da ionização do MPA quando ele se encontra em concentrações mais elevadas. Entretanto, esse efeito encontrou-se dentro da faixa aceitável.

É importante ressaltar que a avaliação do efeito de matriz foi realizada com amostras de vítreo provenientes de diferentes animais, uma vez que os compostos endógenos responsáveis pela supressão ou indução de ionização podem ser suscetíveis à variação interindividual (MATUSZEWSKY et al., 2003). Dessa forma, pode-se verificar efeitos de matriz distintos em amostras provenientes de animais diferentes. Valores negativos de desvio indicam supressão de ionização, enquanto valores positivos indicam indução de ionização.

**Tabela 3.9 – Resultados do teste de efeito matriz para o MPA.**

Amostra	9 (ng/mL)			8000 (ng/mL)		
	Área média em solução (n=6)	Área em vítreo	Desvio (%)	Área média em solução (n=6)	Área em vítreo	Desvio (%)
1	869,9	751	-13,7	328732	373784	13,7
2		747	-14,2		378011	15,0
3		781	-10,2		350807	6,7
4		880	1,2		376743	14,6
5		1000	14,9		354803	7,9
6		920	5,7		335923	2,2

**Tabela 3.10 – Resultados do teste de efeito matriz para o cetoprofeno.**

Amostra	4000 (ng/mL)		
	Área média em solução (n=6)	Área em vítreo	Desvio (%)
1	518567,1	580757	12,0
2		501585	-3,3
3		560808	8,1
4		458429	-11,6
5		555468	7,1
6		477462	-7,9

### **2.2.3.6 Limite inferior de quantificação (LIQ)**

O LIQ do método foi confirmado por meio da análise em quintuplicata, em três dias consecutivos, de amostras vítreas contendo MPA e avaliação da relação sinal/ruído nos cromatogramas. A concentração de 3 ng/mL apresentou resultados satisfatórios de precisão e exatidão, conforme demonstrado na **Tabela 3.11**.

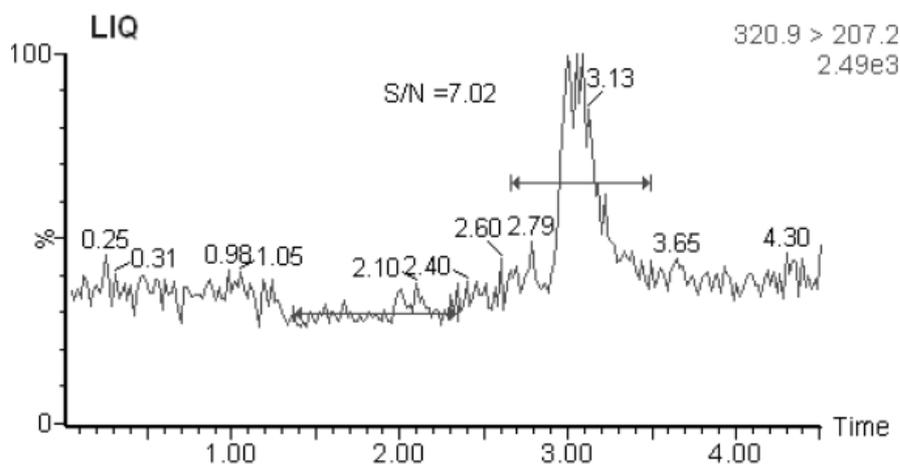
Todos os valores de desvio padrão relativo foram inferiores a 20% e a exatidão se manteve dentro da faixa de 80% a 120%.

A relação sinal/ruído nos cromatogramas obtidos nessa concentração também foi avaliada. O resultado foi de 7,02, valor superior ao mínimo preconizado (5), demonstrando que a concentração de 3 ng/mL pode ser considerada seguramente

como o limite inferior de quantificação do método. Os cromatogramas de MPA a 3 ng/mL estão mostrados na **Figura 3.9**.

**Tabela 3.11 – Resultados da precisão e exatidão para o limite inferior de quantificação do método bioanalítico de quantificação de MPA.**

Parâmetro	MPA a 3 ng/mL
Precisão intra-corrída (n=5)	5,70 (DPR %)
Precisão inter-corrídas (n=15)	14,01(DPR %)
Exatidão intra-corrída (n=5)	105,09 (%)
Exatidão inter-corrídas (n=15)	97,18 (%)



**Figura 3.9 – Relação sinal/ruído para o cromatograma de MPA na concentração do LIQ.**

### **2.2.3.7 Estabilidade**

A avaliação da estabilidade das amostras utilizadas durante as diferentes etapas do estudo visa determinar se os analitos mantêm-se, em determinados intervalos de tempo, quimicamente inalterados na matriz.

A estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e das condições de armazenamento empregadas. A avaliação da estabilidade dos fármacos na matriz biológica deve ser realizada após a validação dos parâmetros de exatidão, precisão, linearidade, seletividade e limite de

quantificação. Essa avaliação é necessária para se conhecer a estabilidade das amostras em questão e determinar o tempo no qual as mesmas se mantêm inalteradas nas condições utilizadas no método e na rotina do laboratório. Dessa forma, todas as amostras de humor vítreo devem ser analisadas dentro do período de tempo no qual foi comprovada sua estabilidade. A constatação de que as amostras apresentam estabilidade relativamente baixa em determinada condição não invalida o método, desde que todas as amostras sejam analisadas dentro do tempo no qual se verificou estabilidade.

Em todas as avaliações de estabilidade, duas concentrações de MPA (CQB e CQA) foram analisadas em quintuplicata e as concentrações obtidas foram comparadas com aquelas de amostras recém preparadas. Variações inferiores a 15% indicam que não há diferença significativa entre as concentrações das amostras recém preparadas e amostras de estabilidade. Além disso, a precisão e exatidão da análise devem ser comprovadas pela obtenção de valores de desvio padrão relativo inferiores a 15% e exatidão dentro da faixa de 85% a 115%.

#### 2.2.3.7.1 Estabilidade de curta duração (ECD)

A estabilidade de curta duração foi avaliada por um período de 6 horas. Durante esse tempo, as amostras de vítreo contendo o fármaco permaneceram à temperatura ambiente, sendo em seguida submetidas ao processo de extração. As concentrações foram comparadas com aquelas obtidas de amostras de vítreo recém preparadas, conforme demonstrado na **Tabela 3.12**. Verificou-se que não houve diferença significativa entre as mesmas, uma vez que a variação foi inferior a 15% para as concentrações analisadas de ambos os fármacos. Os valores de precisão e exatidão também se mantiveram dentro da faixa preconizada.

**Tabela 3.12 – Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de curta duração do método bioanalítico para quantificação MPA.**

Parâmetros	MPA 9 ng/mL		MPA 8000 ng/mL	
	Amostra recente	Amostra ECD	Amostra recente	Amostra ECD
Conc. média (ng/mL) (n=5)	9,80	8,51	7808,30	7596,85
DPR (%)	4,66	8,64	11,31	5,77
Exatidão (%)	108,85	94,57	97,60	94,96
Variação (%)		-13,12		-2,71

2.2.3.7.2 Estabilidade de longa duração (ELD)

A estabilidade de longa duração foi avaliada em amostras de vítreo que foram preparadas e, em seguida, congeladas durante quatro meses em freezer a -70 °C. Após esse período, as concentrações determinadas foram comparadas com amostras recém preparadas, conforme demonstrado na **Tabela 3.13**. Verificou-se que não houve diferença significativa entre as mesmas.

**Tabela 3.13 – Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de longa duração do método bioanalítico para quantificação MPA.**

Parâmetros	MPA 9 ng/mL		MPA 8000 ng/mL	
	Amostra recente	Amostra ELD	Amostra recente	Amostra ELD
Conc. média (ng/mL) (n=5)	8,89	8,84	7928,22	7775,93
DPR (%)	3,56	3,83	1,83	2,11
Exatidão (%)	98,82	98,25	99,10	97,20
Variação (%)		-0,58		-1,92

### 2.2.3.7.3 Estabilidade pós-processamento (EPP)

A avaliação da estabilidade de pós-processamento é importante em casos nos quais muitas amostras são processadas e analisadas juntas, como nos estudos de farmacocinética. Nesses casos, existe a possibilidade de a amostra ser processada e ficar aguardando na fila do autoinjeter do equipamento por períodos longos.

A análise da EPP foi realizada mantendo-se amostras extraídas no auto injetor automático, a 4 °C, por um período de 9 horas. Esse tempo foi considerado adequado, pois, considerando que o tempo de corrida do método é de 4,5 minutos, cerca de 120 amostras poderiam ser analisadas em 9 horas. A estabilidade do padrão interno também foi avaliada. Comparou-se as áreas das amostras obtidas na avaliação da estabilidade com aquelas de amostras recém injetadas. Com os resultados demonstrados na **Tabela 3.14**, observa-se que o MPA, assim como o padrão interno, se mantiveram estáveis no injetor automático pelo tempo avaliado.

**Tabela 3.14 – Resultados obtidos na avaliação da estabilidade pós-processamento do método bioanalítico para quantificação de MPA.**

Parâmetros	MPA a 9 ng/mL		MPA a 8000 ng/mL	
	Amostra recente	Amostra EPP	Amostra recente	Amostra EPP
Conc. média (ng/mL) (n=5)	8,59	9,59	7688,22	8197,67
DPR (%)	5,12	8,19	3,66	5,00
Exatidão (%)	95,49	106,58	96,10	102,47
Variação (%)	11.61		6.63	
Parâmetros	Cetoprofeno a 4000 ng/mL			
	Amostra recente		Amostra EPP	
Área média (ng/mL) (n=5)	246751		264608	
DPR (%)	4,61		3,80	
Variação (%)			7,24	

2.2.3.7.4 Estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento (ECCD)

Amostras de vítreos contendo o fármaco foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento e analisadas ao final do terceiro ciclo. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 3.15**. Foi verificado que os processos de congelamento e descongelamento não causaram degradação dos fármacos no vítreo, por até três ciclos, conforme indicado pelas taxas de variação obtidas entre as amostras recém preparadas e aquelas do estudo de estabilidade.

**Tabela 3.15 – Resultados obtidos na avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento do método bioanalítico para quantificação de MPA.**

Parâmetros	MPA 9 ng/mL		MPA 8000 ng/mL	
	Amostra recente	Amostra ECCD	Amostra recente	Amostra ECCD
Conc. média (ng/mL) (n=5)	9,80	8,51	7808,30	7596,85
DPR (%)	4,66	8,64	11,31	5,77
Exatidão (%)	108,85	94,57	97,60	94,96
Variação (%)	-13,12		-2,71	

Após avaliação dos tipos de estabilidade preconizados, verificou-se que as amostras de vítreo contendo o MPA são estáveis por até 6 horas à temperatura ambiente, por 9 horas no injetor automático após extração, após 4 meses em freezer a -70 °C e após três ciclos de congelamento/descongelamento. A análise dos resultados obtidos até aqui demonstra estabilidade do MPA e cetoprofeno nas amostras de humor vítreo.

### 3 Conclusões

O método analítico de quantificação de MPA por UPLC mostrou-se sensível, simples e rápido. O método foi completamente validado e aplicado no doseamento do fármaco presente nos implantes desenvolvidos, assim como na quantificação do fármaco liberado no estudo *in vitro*.

O método bioanalítico desenvolvido em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de massas mostrou-se simples, rápido e sensível, possibilitando a quantificação MPA em vítreo de coelhos. O método de extração aplicado, de precipitação de proteínas, mostrou-se de fácil e rápida execução, além de eficiente em extrair o fármaco das amostras. O método foi aplicado com sucesso em um estudo de cinética de liberação de MPA em olhos de animais.

# **CAPÍTULO 4**

## **Conclusões Gerais**

Esse trabalho mostrou através de uma detalhada revisão da literatura os problemas oftálmicos de cunho inflamatório que atingem a região posterior do olho, das dificuldades de tratamento dessas doenças e as complicações diretas que elas causam para as pessoas, que muitas vezes levam a cegueira. A revisão abordou também a recente descoberta da eficácia do fármaco Ácido micofenólico - que até o presente momento é indicado pela Organização Mundial de Saúde apenas para o tratamento de rejeição de pacientes transplantados - no tratamento de algumas oftalmopatias inflamatórias.

A proposta de utilizar um veículo polimérico constituído de PLGA para a liberação controlada intraocular de fármacos já vem sendo muito utilizada e estudada, porém a proposta de veicular o ácido micofenólico diretamente no olho é inédita. Todos os trabalhos publicados até aqui trabalharam com a administração oral do fármaco e inevitavelmente casos de intolerância e efeitos adversos foram observados. Nesse trabalho foi mostrada uma maneira eficaz e reprodutiva de se produzir um dispositivo a base de PLGA contendo 10% de ácido micofenólico que se mostrou eficaz em controlar a liberação do fármaco dentro do olho de coelhos por um período superior a um mês, indicando que pode ser útil no tratamento de inflamações oculares.

Juntamente com o desenvolvimento do dispositivo implantável foi apresentado um método completo para o controle de qualidade do produto farmacêutico obtido além da também inédita apresentação de um método bioanalítico para quantificação de Ácido micofenólico em vítreo de animais. Esse método pode ser o ponto de partida para muitos outros estudos onde se necessita identificar algum fármaco no vítreo, e pode ser também a ferramenta que falta em outros trabalhos para responder questões como qual a dose terapêutica adequada para o tratamento de oftalmopatias inflamatórias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMO, E. M. and URTTI, A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. **Drug Discovery Today**, v. 13, p.135-143, 2008.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.H.; ALLEN JUNIOR, L.V., **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**, 8.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005, 775 p.

ATHANASIOU, K. A; NIEDERAUER, G.G.; AGRAWAL, C.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. **Biomaterials**, v. 17, p.93-102, 1996.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005. 677 p.

BAEYENS, O.F.; EPERON, S.; MORA, P.; LIMAL, D.; SAGODIRA, S.; BRETON, P.; SIMONAZZI, B.; NOBS, L.B.; CROSIER, Y.G.; GURNY, R. Biodegradable scleral implants as new triamcinolone acetonide delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 322, p.6-12, 2006.

BAHRAMI G.; MOHAMMADI B. An isocratic high performance liquid chromatographic method for quantification of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in human serum using liquid-liquid extraction: Application to human pharmacokinetic studies. **Clinica Chimica Acta**, v. 317, p. 185-190, 2006

BALTATZIS, S.; TUFAIL, F.; YU, E. N.; VREDEVELD, C. M.; FOSTER, C. S. Mycophenolate mofetil as an Immunomodulatory Agent in the Treatment of Chronic Ocular Inflammatory Disorders. **Ophthalmology**, v. 10, p. 1061-1065, 2003.

BENNET, J. C. and CECIL, R. L. **Tratado de medicina interna**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.v. 2.

BIANCAMANO M.; CARON P.; LEVESQUE.; DELAGE R.; COUTURE F.; GUILLEMETTE C. Sensitive high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in human plasma and urine. **Journal of Chromatography B**, v. 858, p. 159-167, 2007.

BOURGES J. L.; BLOQUEL C.; THOMAS A.; FROUSSART F.; BOCHOT A.; AZAN F.; GURNY, R.; BENEZRA, D.; BEHAR-COHEN F. Intraocular implants for extended drug delivery: therapeutic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1182-1202, 2006.

BOYD, S.R.; YOUNG, S.; LIGHTMAN, S. Immunopathology of noninfectious posterior and intermediate uveitides. **Survey of Ophthalmology**, v. 46, n.3, p.209-233, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE no. 899, de 29 de Maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Poder Executivo, de 02 de Junho de 2003.

BRANDHORST G.; STREIT F.; GOETZE S.; OLLERICH M.; ARMSTRONG M. Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry of Mycophenolic Acid and Its Phenol and Acyl Glucuronide Metabolites. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 1962-1964, 2006.

BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. **Journal of chromatography B: Biomedical applications**, v. 686, p. 3-10, 1996.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **Journal of chromatography B: Biomedical applications**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CHANAUD N. P.; VISTICA B. P.; EUGUI E.; NUSSENBLATT R. B.; ALLISON A. C.; GERY I. Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis by Mycophenolate Mofetil, an inhibitor of purine metabolism. **Experimental Eye Research**, v. 61, p. 431-436, 1995.

COSTA, A. L. O. **Éster 2-morfoetil e sal sódico do ácido micofenólico: desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade de matéria-prima e comprimidos..** Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2009. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos).

DONG, X.; SHI, W.; YUAN, G.; XIE, L.; WANG, S.; LIN, P. Intravitreal implantation of the biodegradable cyclosporine A drug delivery system for the experimental chronic uveitis. **Graefe's Archive Experimental Ophthalmology**, v. 244, p.492-497, 2006.

DOYCHEVA, D.; ZIERHUT, M.; BLUMENSTOCK, G.; STUEBIGER, N.; DEUTER, C. Long-term results of therapy with mycophenolate mofetil in chronic non-infectious uveites. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 249, p.1235–1243, 2011.

FANTE, R. J.; DURAIRAJ, V. D.; OLIVER S. C. N. Diabetic Retinopathy: An update on Treatment. **The American Journal of Medicine**, v.123, p. 213 – 216, 2010.

FIALHO, S. L. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões e implantes biodegradáveis para aplicação oftálmica.** Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2003. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos).

FIALHO, S.L.; JORGE, R.; SIQUEIRA, R.C.; SILVA-CUNHA, A. Biodegradable implants for ocular delivery of anti-inflammatory drugs. **Journal Drug Delivery Sciences and Technolgies**, v.17, p. 93-97, 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*. Rockville, May 2001. Disponível em:

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>. Acesso em 26 de novembro de 2012.

FOONG. A. W.; FONG. C. W.; WONG. T. Y. SAW. S.; HENG. D.; FOSTER. P. Visual acuity and Mortality in a Chinese Population. **Ophthalmology**, v. 115, n.5, p. 802-807, 2008.

GEROSKI, D. H. and EDELHAUSER, H. F. Drug Delivery for Posterior Segment Eye Disease. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, p. 961-964, 2000.

GILGER, B.C.; MALOK, E.; STEWART, T.; HOROHOV, D.; ASHTON, P.; SMITH, T.; JAFFE, G.L.; ALLEN, J.B. Effect of an cyclosporine implant on experimental uveitis in horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 76, p. 239-255, 2000.

GRIFFITH, L.G. Polymeric biomaterials. **Acta Materialia**, v. 48, p.263-277, 2000.

HATTON, M. P.; RUBIN, P. A. D.; FOSTER, C. S. Successful Treatment of Idiopathic Orbital Inflammation With Mycophenolate Mofetil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 140, 216-218, 2005.

HESSELINK, D.A.; BAARSMA, G.S.; KUIJPERS, R.W.A.M.; HAGEN, P.M. Experience with cyclosporine in endogenous uveitis posterior. **Transplantation Proceedings**, v. 36, p. 372-377, 2004.

JABS, D.A.; ROSEMUNBAUM, J.T.; FOSTER, C.S.; HOLLAND, G.N.; JAFFE, G.J.; LOUIE, J.S.; NUSSENBLAT, R.B.; STIEHM, E.R.; TESSLER, H.; GELDER, R.N V.; WHITCUP, S.M.; YOCUM, D. Guidelines for the use of immunosuppressive drugs in patients with ocular inflammatory disorders: recommendatios of an expert panel. **American Journal of Ophthalmology**, v.130, n.4, p. 492-513, 2000.

JAFFE, G.J.; BEN-NUN, J.; GUO, H.; DUNN, J.P.; ASHTON, P. Fluocinolone acetonide sustained drug delivery device to treat severe uveitis. **Ophthalmology**, v.17, p. 2024-2033, 2000.

JAFFE, G.J.; MARTIN,D.;CALLANAN, D; PEARSON, A.P; LEVY,B.; COMSTOCK, T. Fluocinolone acetonide implant (Retisert) for noninfectious posterior uveitis. **Ophthalmology**, v. 113, n 6, p. 1020-1027, 2006.

JAFFE, G.J.; YANG, C.S.; WANG, X.C.; COUSINS, S.W.; GALLEMORE, R.P.; ASHTON, P. Intravitreal sustained-release cyclosporine in the treatment of experimental uveitis. **Ophthalmology**, v. 105, p. 46-56, 1998.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2475- 2490, 2000.

JANOT, P. Anatomia do olho. Brasília: Oftalmologia, 2006.

JARVINEN, K., JARVINEN, T., URTTI, A. Ocular absorption following topical delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p.3-19, 1995

KANSKI, J.J. **Clinical Ophthalmology**: a systematic approach. 3.ed. Oxford: Butterworth-Heinemann International Editions, 1994.

KILMARTIN, D. J.; FORRESTER, J. V.; DICK, A. D. Rescue therapy with mycophenolate mofetil in refractory uveites. **The Lancet**, v. 352, p. 35-36, 1998.

KNUDSTON M. D.; KLEIN B.; KLEI R.; CRUICKSHANKS K. J.; LEE K. E. Age- related eye disease, quality of life, and functional activity. **Archives in Ophthalmology**, v. 123, p. 807-814, 2005.

KUNOU, N.; OGURA, Y.; HASHIZOE, M.; HONDA, Y. Controlled intraocular delivery of ganciclovir with use of biodegradable scleral implant in rabbits. **Journal of Controlled Release**, v. 37, p. 143-150, 1995.

LALLEMAND, F.; BAEYENS, O.F.; NESSEGHIR, K.; COHEN, F.B.; GURNY, R. Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.56, p. 307-318, 2003.

LARKIN G.; LIGHTMAN S. A useful immunosuppressive in inflammatory eye disease. **Ophthalmology**, v. 106, n. 2, p. 370-374, 1999.

LAU, C. H.; COMER, M.; LIGHTMAN, S. Long-term efficacy of mycophenolate mofetil in the control of severe intraocular inflammation. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 31, p. 487 - 491, 2003.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Quimica Nova*, v. 32, p. 214-222, 2009

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical chemistry**, v. 75, , p. 3019-3030, 2003.

MERKLI, A.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; HELLER, J. Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. **Progress of Polymers Science**, v. 23, p. 563-580, 1998.

MUSCH, D. C.; MARTIN, D. F.; GORDON, J. F.; DAVIS, M. D.; KUPPERMANN, B. D. Treatment of cytomegalovirus retinitis with a sustained release ganciclovir implant. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 83-90, 1997.

NETTER H. F. **Atlas de Anatomia Humana**. 2.ed. Porto Alegre, Artmed, 2000.

NORONHA I.L.; OLIVEIRA A.C.; ARAÚJO R. M.; ABENSUR H.; QUINTAES P.S.; GENZINI T.; PEROSA M.; CAMPAGNARI J.C.; MARCONDES M.; ROMÃO J.E. Micofenolato mofetil (MMF) em transplante de órgãos. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 19, n. 4, p. 398-406, 1997.

OGURA, Y. Drug delivery to the posterior segments of the eye. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, n.1, p. 1-3, oct. 2001.

OKADE, J.; KIMURA, H.; KONU, N.; OKADE, K.; OGURA, Y. Biodegradable intrascleral implant for sustained intra-ocular delivery of betamethasone phosphate. **Investigate Ophthalmology and Visual Science**, v. 44, n.2, p.740-744, 2003.

OKHRAVI N.; ODUFUWA B.; MCCLUSKEY P.; LIGHTMAN S. Scleritis. **Survey of Ophthalmology**, v. 50, p. 351-363, 2005.

PENG, Y.; ANG., M.; FOO, S.; LEE, W. S.; MA, Z.; VENKATRAMAN, S. S.; WONG, T.T. Biocompatibility and Biodegradation Studies of Subconjunctival Implants in Rabbit Eyes, **PLoS ONE**, v. 6, p. 1-11, 2011.

PEYMAN, G.A.; GANIBAN, G.J. Delivery systems for intraocular routes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 107-123, 1995.

PRAS, E.; NEUMANN, R.; GODDARD, G.; LEVY, Y.; ASSIA, E.I.; SHOENFELD, Y.; LANGEVITZ, P. Intraocular inflammation in autoimmune disease. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 34, p. 602-609, 2004.

QUATTROCCHI, O. A. *et al.* **Introducción a la HPLC: aplicación y práctica**. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro, 1992. 407 p.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RATHORE V. M.; AGRAWAL R.; CHAUDHARY S.P.; BISWAS J.; Mycophenolate mofetil therapy in uveitis: analysis of eight cases in a tertiary ophthalmic care centre in India. **International Ophthalmology**, v. 29, n. 2, p. 117-122, 2009.

RITTENHOUSE, K. D.; POLLACK, G. M. Microdialysis and drug delivery to the eye. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, n. 2-3, p. 229-241, dec. 2000.

SAINZ DE LA MAZA, M.; MOLINA, N.; GONZALEZ L.A.; DOCTOR, P. P.; TAUBER J.; FOSTER, S. Scleritis therapy. **Ophthalmology**, v. 119, p. 51-58, 2012.

SALIBA, J. B.; G, F. A. A.; YOSHIDA, M. I.; VASCONCELOS, W. L.; MANSUR, H. S.; CUNHA JUNIOR, A. S. Development and characterization of an intraocular biodegradable polymer system containing cyclosporine-A for the treatment of posterior uveitis. **Materials Research**, v. 11, p. 1-5, 2008.

SANTANA, D.P.; FONSECA, S.G.C.1; BEDOR, D.C.G.; LEAL, L.B.; SILVA, J.A. Aplicação termoanalítica no desenvolvimento e caracterização de micropartículas de PLGA contendo lapachol. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 29, p. 261-266, 2008

SAKURAI, E.; NOZAKI, M.; OKADE, K.; KONU, N.; KIMURA, H.; OGURA, Y. Scleral plug of biodegradable polymers containing tacrolimus (FK506) for experimental uveitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, p. 4845 - 4852, 2003.

SEN H. N.; SUHLER E. B.; AL-KHATIB S. Q.; DJALILIAN A. R. NUSSENBLATT B.R. B.; BUGGAGE R. R. Mycophenolate mofetil for the treatment of scleritis. **Ophthalmology**, v. 110, n. 9, p. 1750-1755, 2003.

SCHLIECKER, G.; SCHMIDT, C.; FUCHS, S.; EHINGER, A.; SANDOW J.; KISSEL, T. *In vitro* and *in vivo* correlation of buserelin release from biodegradable implants using statistical moment analysis. **Journal of Controlled Release**, v. 94, p. 25 - 37, 2004.

SIEPMAN, J.; SIEPMAN, F. Mathematical modeling of drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 328-343, 2008.

SIEPMAN, J.; SIEPMAN, F. Modeling of diffusion controlled drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 351-362, 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.

SIMONINI, G.; CANTARINI, L.; BRESCI, C.; LORUSSO, M.; GALEAZZI, M.; CIMAZ, R. Current therapeutic approaches to autoimmune chronic uveitis in children. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, p. 674 - 683, 2010.

SNELL R. S.; LEMP, M. A. The eyeball. In: SENLL, R. S.; LEMP, M. A. **Clinical Anatomy of The Eye**. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 1998, p 132-213.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Pratical HPLC Method Development. 2. ed. New York: John Wiley Interscience, 1997. 765p.

SOUZA NV. Doenças do corpo vítreo, retina e uveíte. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 30, p. 69-73, 1997.

TANGIRI, P.; KHURANA, S. Basics of Ocular Drug Delivery Systems. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, p. 1541-1552, 2011.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Clinical Bbiochemistry**, v. 38, p. 328-334, 2005.

THE INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA. 4.ED. GENEVA: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005. 1499 P.

THE MERCK INDEX. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 14. ed. Rahway: Merck Co., 2001. 1818 p.

THRIMAWITHANA, T. R.; YOUNG, S.; BUNT, C. B.; GREEN, C.; ALANY, R. G. Drug delivery to the posterior segment of the eye. **Drug Discovery Today**, v. 16, p. 270-277, 2011.

TOJO K; ISOWKI A. Pharmacokinetic model for the *in vivo* / *in vitro* correlation of intravitreal drug delivery. **Advanced Drug Reviews**, v. 52, p. 17-24, 2001.

URTTI A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1131-1135, 2006.

WALTON, R.C.; NUSSENBLATT, R.B.; WHITCUP, S.M. Cyclosporine therapy for severe sight-threatening uveitis in children and adolescents. **Ophthalmology**, v. 105, p. 2028-2034, 1998.

WOLFF'S E. The eyeball. In: WOLFF'S E. **Anatomy of The Eye and Orbit**. 6 ed. London: H. K. Lewis & Co. Ltda, 1993. Cap. 2, p. 30-181.

World Health Organization (WHO), ACTION PLAN FOR THE PREVENTION OF AVOIDABLE BLINDNESS AND VISUAL IMPAIRMENT, 2009-2013.

YASUKAWA, T.M.D.; KIMURA, H.; TABATA, Y.; OGURA, Y. Intraocular sustained delivery using implantable polymeric device. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, p. 25-36, 2001.

YASUKAWA, T.M.D.; OGURA, Y.; SAKURAI E.; TABATA, Y.; KIMURA H. Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 2033-2046, 2005.

**ANEXO 1 –  
Artigo aceito para publicação**



## Determination of Mycophenolic acid in the vitreous humor using the HPLC–ESI–MS/MS method: Application of intraocular pharmacokinetics study in rabbit eyes with ophthalmic implantable device

Ricardo Martins Duarte Byrro\*, Gustavo de Oliveira Fulgêncio, Paula Rocha Chellini, Armando da Silva Cunha Júnior, Gerson Antônio Pianetti

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 March 2013

Received in revised form 13 May 2013

Accepted 20 May 2013

Available online xxx

#### Keywords:

Mycophenolic acid

HPLC–ESI–MS/MS

Controlled release

Vitreous drug definition

Ophthalmic drug delivery

### ABSTRACT

Mycophenolic acid (MPA) is an immunosuppressive agent widely used in the treatment of solid organ transplant rejection. The success of MPA in the treatment of inflammatory intraocular diseases has been reported in recent literature. The treatment of inflammatory eye diseases in the posterior chamber is a challenge due to the anatomy of the eye, which presents certain barriers to drug access. Thus, the bioavailability of drugs in the eye is quite low, and successful drug delivery may well represent a key limiting factor to attaining a successful therapeutic strategy. Ophthalmic controlled drug delivery offers the potential to enhance the efficacy of treatment for pathological conditions. Thus, a novel delivery system based on a biodegradable polymeric device, which can be implanted inside the eye and deliver MPA directly to the target, is being developed. Specific analytical methods to determine the use of effective drugs within the eye are needed to characterize this device. A liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC–ESI–MS/MS) method for the quantitation of MPA in the vitreous humor of rabbits was developed and validated. The vitreous was collected from rabbits, extracted by a protein precipitation extraction procedure and then separated on a C<sub>18</sub> column with a mobile phase comprised of 0.15% aqueous acetic acid and methanol (60:40, v/v). The calibration curve was constructed within the range of 3–10,000 ng/mL for MPA. The mean R.S.D. values for the intra-run and inter-run precision were 5.15% and 4.35%. The mean accuracy value was 100.16%. The validated method was successfully applied to determine the MPA concentration in the vitreous humor of rabbits treated with an ocular implantable device.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Mycophenolic acid (MPA) (Fig. 1) is a weak organic acid that inhibits purine biosynthesis and has been shown to be antifungal, antibacterial, antiviral, and immunosuppressive. Morpholinoester of MPA, mycophenolate mofetil (MMF), is a pro-drug with increased bioavailability, which has led to more recent recommendations concerning the prophylaxis of organ rejection. When MMF is administered, the pro-drug undergoes ester hydrolysis to achieve its active form, i.e. MPA [1,2].

Posterior segment ocular diseases are one of the most prevalent causes of visual impairment in industrial countries. The success of MPA in treatment of inflammatory intraocular diseases has been reported in recent literature. Both people and animals with intraocular diseases, such as uveitis and sclerites, have also

been undergoing experimental oral treatment with MPA. These experiments have been presenting positive results and have been producing a better quality of life for patients when compared to treatment with corticosteroids and other immunosuppressive agents [3–12].

It is well known that intraocular bioavailability of drugs, when administered by classical routes (topical, intravenous, and oral), is extremely low because of natural barriers of the eye that block drug penetration. To overcome this problem, controlled and sustained implantable ophthalmic formulations, which can deliver drugs directly into the eye and increase bioavailability, have been developed in recent decades [12,13].

Quantifying drugs in the vitreous humor is a useful tool to study the kinetic behavior of drugs and controlled release devices inside the eye. Therefore, applied analytical methods must be highly sensitive; however, no prior reports in the literature treat the MPA quantification in the vitreous humor. Some methods describe the evaluation of MPA in plasma for pharmacokinetic studies [14–17]. Nonetheless, these methods either provide no significant detection

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 34096967; fax: +55 31 34096976.

E-mail address: [ricardobyrrro@bol.com.br](mailto:ricardobyrrro@bol.com.br) (R. Martins Duarte Byrro).

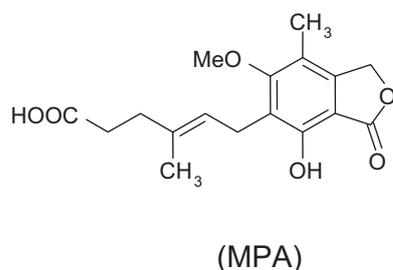


Fig. 1. Chemical structure of Mycophenolic acid (MPA).

of sensitivity or undergo complex sample preparation steps which are unnecessary when analyzing vitreous samples.

Implantable devices for eyes are becoming more and more common due their promising uses. For this reason, a novel formulation for the ocular controlled release of MPA is under development. Hence, this work aimed to develop and validate a sensitive HPLC–ESI-MS/MS method for the quantitation of MPA in the vitreous humor. The method was applied to perform an intraocular pharmacokinetics study of MPA after its administration in rabbit eyes with an ophthalmic implantable device.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and reagents

MPA and reference standard were purchased from Sigma–Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA). Ketoprofen (used as an internal standard) was purchased from the United States Pharmacopeia (Rockville, MD, USA). Ultra-pure water was obtained from a Millipore system (Bedford, MA, USA). Methanol (HPLC grade) was purchased from Tedia (Fairfield, OH, USA), and acetic acid (analytical grade) was obtained from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

### 2.2. Instrumentation and analytical conditions

The HPLC–ESI-MS/MS analyses were carried out on a Waters system (New Castle, DE, USA), consisting of a 1525 binary pump, a 2777 sample manager, a TCM/CHM column oven, and a Quattro LC triple quadrupole mass spectrometer, equipped with an electrospray ion source. MassLynx v.4.1 software was used for data acquisition and analysis. LC separation was performed on a C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm i.d.; 5 μm particle size) at 30 °C. The mobile phase consisted of a 0.1% aqueous formic acid (v/v) and methanol (20:80, v/v) at a flow rate of 1 mL/min. The run time was 4.5 min, and the injection volume was 20 μL. Ketoprofen was used as an internal standard.

Mass spectrometric detection was performed using an electrospray ion source in the positive ionization mode. Nitrogen was used as both the nebulizing and the desolvation gas, while argon was used as the collision gas ( $1.8 \times 10^{-3}$  to  $2.0 \times 10^{-3}$  mbar). Selected reaction monitoring (SRM) was employed for data acquisition. The precursor ions [M+H]<sup>+</sup> were *m/z* 321 and *m/z* 255 for MPA and ketoprofen, respectively. The ion source optimized parameters for both analyte and the internal standard were: capillary 2.75 kV, extractor 3 V, cone 45 V, RF lens 0.5 V, source temperature of 100 °C, and desolvation temperature of 350 °C. The multiplier was set at 750 V. The collision energy was optimized at 22 eV for MPA and 25 eV for Ketoprofen. The SRM fragmentation transition was *m/z* 321 → *m/z* 207 and *m/z* 255 → *m/z* 209 for MPA and ketoprofen, respectively. The scan dwell time was set at 0.5 s.

### 2.3. Preparation of standard solutions

Stock solutions of MPA and ketoprofen were prepared by dissolving the accurately weighed reference substance in methanol. The working solution of MPA was prepared immediately before its use by diluting the stock solution with mobile phase to a final concentration of 100 μg/mL.

The working solution of ketoprofen (IS) was prepared by diluting the stock solution with methanol to a final concentration of 20 μg/mL. All stock solutions were prepared immediately before being used.

### 2.4. Preparation of calibration and QC samples

Six calibrations samples were prepared by spiking appropriate amounts of the MPA working solution into blank vitreous samples. The concentration of the calibration samples in the vitreous were 3, 30, 100, 1000, 5000, and 10,000 ng/mL of MPA. Quality control (QC) samples in the vitreous were prepared in a similar manner, at low, middle, and high concentrations according to the US Food and Drug Administration guideline for bioanalytical method validation [18]: 3, 4000, and 8000 ng/mL.

The calibration standards and QC samples were submitted to the same preparation steps as the real samples, as described in Section 2.5.

### 2.5. Sample preparation

The drugs were extracted from vitreous samples by a protein precipitation extraction procedure. A 25 μL aliquot of the IS solution (20 μg/mL of ketoprofen) was added to 100 μL of the vitreous sample. The samples were mixed for 10 s. Next, 275 μL of methanol were added as a precipitation agent. The samples were mixed in a vortex for 60 s and centrifuged (5 min, 15,000 rpm). After, 300 μL of the supernatant was transferred to vials, and an aliquot of 20 μL was injected into the chromatographic system.

### 2.6. Method validation

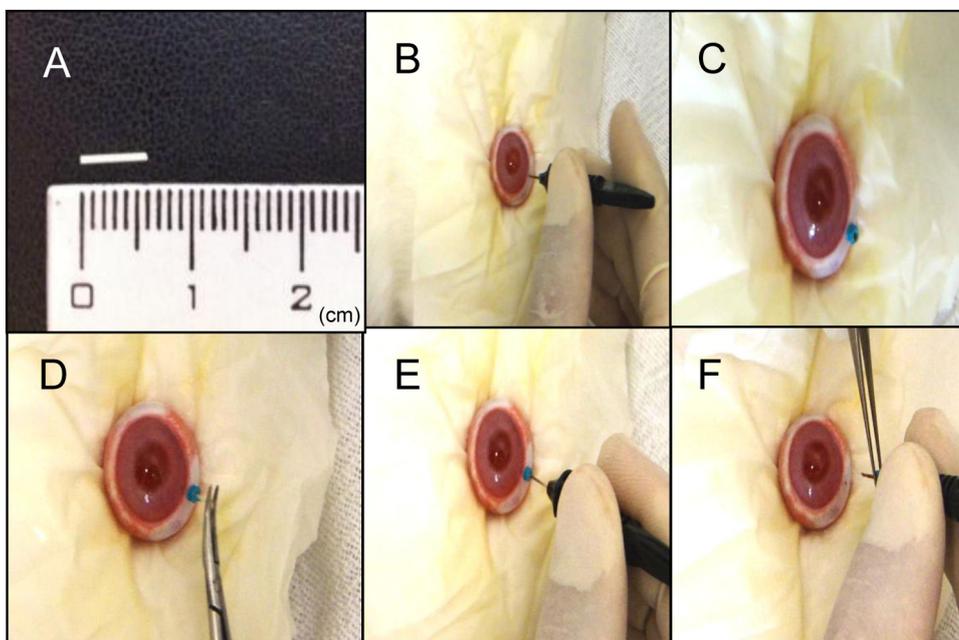
The validation process was carried out according to Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation, recommended by the US Food and Drug Administration [18].

Selectivity of the method was evaluated by assaying rabbits' blank vitreous samples from different animals, including one hemolyzed vitreous. These samples were compared to those containing MPA at the lower limit of quantitation (LLOQ) or ketoprofen at 4000 ng/mL.

Linearity was assessed by six-point calibration curves in the vitreous humor of rabbits in duplicate over three consecutive days. The curves were constructed by plotting the peak area ratio of MPA to the IS versus the concentration. The evaluated concentration range was from 3 to 10,000 ng/mL for MPA. The curves were evaluated by residuals and fitted by weighted linear regression. The LLOQ was established as the lowest concentration of the calibration curve, at which point both precision and accuracy were within 20%, performed by analyzing five replicates. In addition, the analyte response at this concentration should be at least 5 times the baseline noise.

To evaluate the precision and accuracy of the method, QC samples at three concentration levels (low, medium, and high) were analyzed in six replicates on three different days. Intra-day and inter-day precision were calculated and expressed as relative standard deviation (R.S.D.%).

The extraction recovery of the method was determined by comparing the peak areas obtained from the vitreous samples with those of direct injected standards at the same concentration. These



**Fig. 2.** Intraocular implantable device loaded with MPA (A). Implantable surgery procedure starting with a sclerectomy (B) and (C). Implantable device insertion (D) and (E). End of surgery and withdrawal of instruments from the eye (F).

finding were evaluated by analyzing five replicates containing the QC samples in the three MPA concentration levels (low, medium, and high). The recovery of IS was determined in a similar manner, but at the working concentration level of 4000 ng/mL of ketoprofen.

The matrix effect was evaluated to verify whether or not the potential ion suppression or enhancement due to the co-elution matrix components actually existed in the analysis. The peak areas of analytes and IS from the spike-after-extraction samples were compared to those of the standard solutions in the mobile phase at the same concentrations. This experiment was carried out using blank vitreous samples from different animals at low and high QC concentrations of MPA and at a working concentration of 4000 ng/mL of ketoprofen.

The stability of the analytes in the vitreous was evaluated under a variety of storage and handling conditions, using the low and high QC samples, in six replicates. Freeze-thaw stability was evaluated after three complete freeze/thaw cycles ( $-70$  to  $23$  °C) on consecutive days. Short-term temperature stability was assessed by analyzing samples that were kept at room temperature ( $23$  °C) for 9 h. Long term stability was performed in vitreous samples that were stored at  $-70$  °C for 120 days. To evaluate the post-preparative stability, QC samples were extracted and maintained in the autosampler ( $10$  °C) for 18 h before injection. The stabilities of the working solutions of MPA and IS at  $4$  °C for 9 days were also evaluated. The analytes were considered stable when 85–115% of the initial concentrations could be identified.

### 2.7. Method application

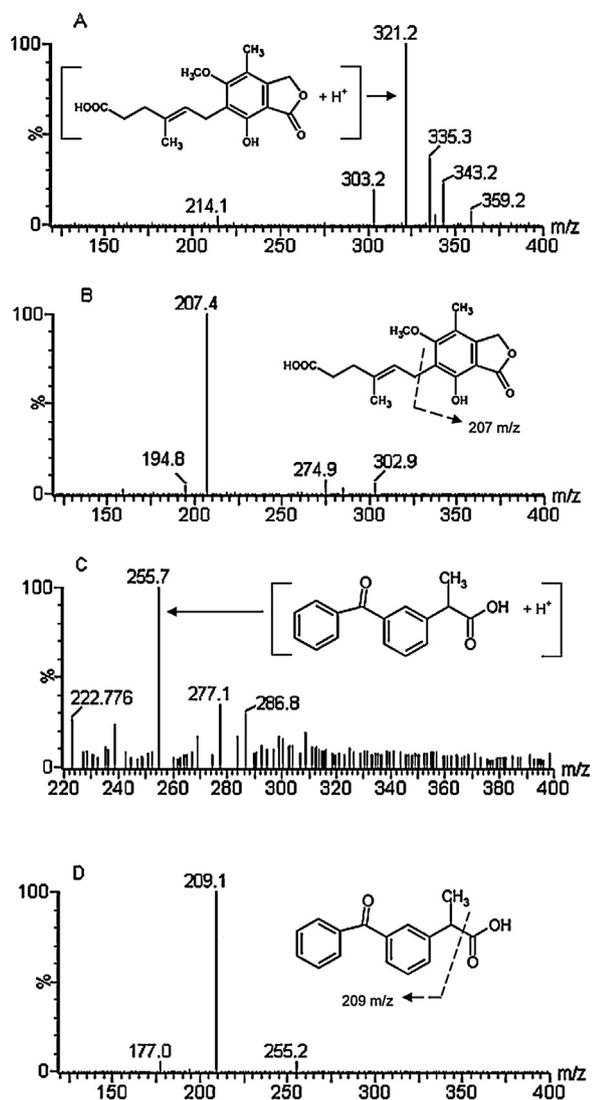
The validated method was used to determine the intraocular concentration of MPA in a pharmacokinetic study with the administration of a novel ophthalmic implantable device. Sixty New Zealand albino female rabbits weighing 1.7–2.0 kg were used for in vivo study. They were fed a normal diet and maintained in a 12 h light/12 h dark cycle. All experimental procedures involving animals were performed in agreement with the Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). The animals were placed in ten groups (six animals per group) and received the developed ophthalmic implantable device, a small, thin polymeric

bar ( $6.0$  mm  $\times$   $0.5$  mm) containing 10% of MPA ( $172$   $\mu$ g), inside their right eye, using a simple surgical procedure. For surgery, the animals were pre-anesthetized with an intravenous injection of a mixture of ketamine hydrochloride (30 mg/kg Ketamin<sup>®</sup>, 50.0 mg/100 mL, Cristália, Brazil) and xylazine hydrochloride (5.0 mg/kg, Copanize<sup>®</sup> 2.0 g/100 mL, Schering-Plough Coopers, Brazil). Vitreous samples were collected in tubes after the animals had been sacrificed, at 1, 7, 14, 21, 24, 28, 30, 32, 35, and 40 days after device administration. The samples were frozen at  $-70$  °C until analysis. During the collection of the vitreous, what was left of the device was separated from the samples. Parameters including maximum concentration ( $C_{max}$ ), area under the concentration–time curve from zero to the time of last sampling (AUClast), and peak to maximum concentration ( $T_{max}$ ) were calculated. Pictures of the implantable device and the surgery procedure are shown in Fig. 2.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Conditions for HPLC–ESI–MS/MS

The first step in mass spectrometric detection consisted of recording the MS spectra of the MPA and IS analytes. The choice of ketoprofen as an internal standard was due to the close proximity of physicochemical properties and similarities in chemical structures between this drug and MPA. The  $\log P$  for MPA is 3.69, while for Ketoprofen it is 3.45. The  $pK_a$  values reported were 4.5 and 4.39 for MPA and Ketoprofen, respectively. From a full scan of the mass spectra, the protonated molecular ions  $[M+H]^+$  with  $m/z$  321 and  $m/z$  255 were selected as precursor ions for MPA and ketoprofen, respectively. These ions were then fragmented into MS/MS mode. A collision energy optimization was performed to achieve intense product ions. At a collision energy of 22 eV, MPA presented the most intense and selective product ions at  $m/z$  207. For ketoprofen, the major product ion was  $m/z$  209 at a collision energy of 25 eV. Mass spectra pictures for MPA and Ketoprofen are shown in Fig. 3. The HPLC–ESI–MS/MS conditions provided high signal intensities for MPA. The additions of formic and acetic acid in the mobile phase were performed in an attempt to improve the



**Fig. 3.** Mass spectras obtained by ESI in positive ion mode for MPA (A) and ketoprofen (C) (internal standard). The product ions obtained after fragmentation are shown as well for MPA (B) and ketoprofen (D).

signal intensities in a positive ion mode. As acetic acid presented better results, its concentration was optimized to 0.1%.

Intraocular administration provides considerably reduced drug levels after a period of time inside the eye. The drug elimination process can occur in two different ways. The first is by anterior route, that is, in the direction of the aqueous humor and then eliminated by the outflow of the humor through in the anterior chamber angle. Some drugs are also eliminated posteriorly through the blood (e.g. retina barrier to the systemic circulation). In this case, the half-life of the drugs is reduced [12,13]. Drugs can also be administered

within the vitreous humor in controlled release formulations to prolong drug activity. In this case, low amounts of drug are released directly into the target to produce a desired action for a longer period of time.

Thus, intraocular pharmacokinetic evaluation requires ultrasensitive methods, which are able to quantify low amounts of drugs in the biological matrix. In addition, if the controlled release device delivers a large amount of drug in the biological matrix, the method will also require a large linear range. The method presented in this work provided a lower limit of quantitation of 3 ng/mL and an upper limit of quantitation of 10,000 ng/mL. This range allows for reliable analytical measurements and an appropriate characterization of the concentration–time profiles of MPA intra-vitreous after the novel ophthalmic implantable device has been administered.

Considering the large number of samples in pharmacokinetic studies, high-throughput methods are essential in performing the analysis. The short runtime and the simple sample preparation procedures and additional advantages, such as low limit of quantitation, allow for the application of the method within high-throughput assays.

### 3.2. Sample extraction

The use of methanol as a precipitant agent aimed to optimize the chromatography efficiency. Methanol constitutes 80% of the mobile phase; therefore, by using a precipitant solvent that is similar to the mobile phase, the chromatographic peaks will produce better shapes. In the present study, 275  $\mu$ L of methanol were sufficient to precipitate proteins from the vitreous to obtain cleaner extracts, and to avoid big dilutions of the samples, in turn providing positive detection signals. The addition of phosphoric acid or ammonium hydroxide were performed to improve the recovery rates, but neutral medium showed better results. The extraction turned out to be robust and the recovery rates were nearly 75%, allowing for, along with the other conditions of analysis, the quantification of a very small amount of the analyte in samples.

### 3.3. Method validation

The chromatograms obtained during the analysis were quite clean, with a retention time of 3.2 min for MPA ( $K=0.98$ ), and no significant interference could be detected at the retention time of the analyte in the analyzed blank samples (Fig. 4).

The MPA calibration curves proved to be linear within the range from 3 to 10,000 ng/mL, with a regression coefficient of higher than 0.99. A typical standard curve was  $y = 0.000168746x + 8.83985e-005$ , with a weighted factor of  $1/x^2$ . The residuals presented no tendency of variation with concentration. The obtained LLOQ was 3 ng/mL, with a precision of 5.70% and 97.18% in terms of R.S.D. and accuracy, respectively.

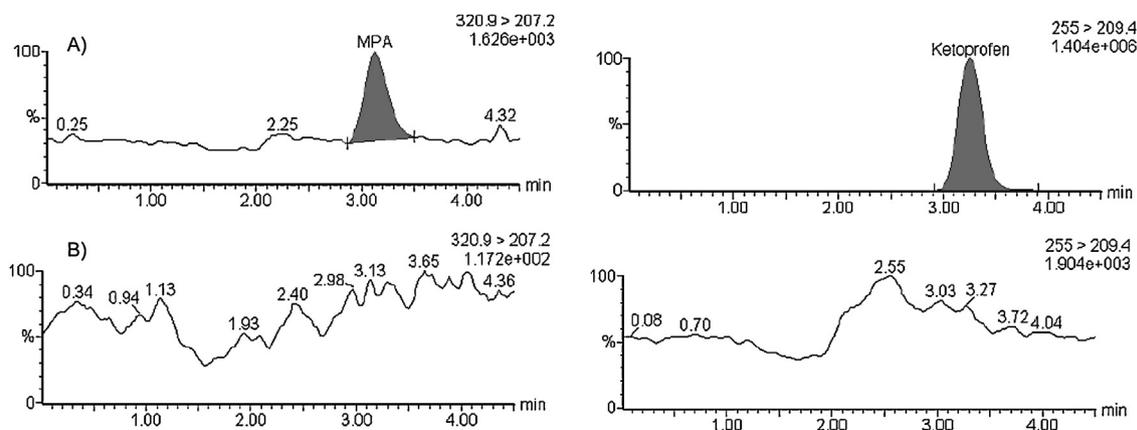
The intra-run and inter-run precision and accuracy were calculated by analyzing six replicates of QC samples at three concentration levels on three different days. The obtained data are

**Table 1**  
Precision and accuracy data for MPA by HPLC–ESI–MS/MS.

Assay	Nominal concentration (ng/mL)	Observed concentration (ng/mL, mean $\pm$ S.D.)	Precision (%R.S.D.)	Accuracy (%)
Intra-run ( $n = 5$ )	9	8.59 $\pm$ 0.4	5.1	95.49
	4000	4234 $\pm$ 64	1.6	105.86
	8000	7688 $\pm$ 292	3.6	96.10
Inter-run ( $n = 15$ )	9	8.3 $\pm$ 0.6	7.1	92.22
	4000	3835 $\pm$ 327	8.2	95.88
	8000	7382 $\pm$ 504	6.3	92.27

S.D.: standard deviation.

R.S.D.: relative standard deviation.



**Fig. 4.** SRM chromatograms: a rabbit vitreo sample collected 24 days after the implantable device administration and spiked with ketoprofen at 4000 ng/mL (A). A blank vitreo sample (B).

**Table 2**  
Recovery data for MPA and the internal standard (IS) by HPLC–ESI–MS/MS.

Analyte	Nominal concentration (ng/mL)	Recovery	%R.S.D.	Mean recuperation
MPA ( $n = 5$ )	9	79.32%	7.2	73.38%
	400	74.4%	4.6	
	800	66.40%	4.9	
Ketoprofen (IS) ( $n = 15$ )	4000	75.13%	4.8	75.13%

shown in Table 1. The mean R.S.D. values were 3.48% and 7.19% for the intra-run and inter-run precision, respectively. The mean accuracy values were 99.15% and 93.45% for the intra-run and inter-run accuracy, respectively. These data indicated reproducible results, as well as accurate and reliable assays.

The mean recovery rate of MPA and ketoprofen ( $n = 15$ ), determined at three different concentration levels, were 73.38% and 75.13%, respectively. The recovery data are shown in Table 2.

The matrix effect was evaluated by comparing the mean peak area of the analyte and IS from the spike-after-extraction samples with those of the standard solutions in the mobile phase. The matrix effect for the analyte proved not to be significant in the present HPLC–MS/MS method.

The results of stability experiments showed that MPA vitreous samples were stable for up to 9 h at 23 °C, for 120 days at –70 °C, for 18 h after extraction in the autosampler and after three complete freeze/thaw cycles on consecutive days, as the mean changes in analyte contents were within  $\pm 15\%$  of initial concentration, at low and high QC levels. The stability data for vitreous samples are shown in Table 3. Working solutions of MPA and IS were stable for at least 9 days at 4 °C with deviations of 7.6% and 7.0%, respectively.

**Table 3**  
Stability data for MPA and the internal standard (IS) from vitreous samples.

Analyte	Nominal concentration (ng/mL)	Stability test			
		Freeze–thaw <sup>a</sup> deviation (%)	Post-preparative <sup>b</sup> deviation (%)	Short-term <sup>c</sup> deviation (%)	Long term <sup>d</sup> deviation (%)
MPA ( $n = 6$ )	9	–13.1	11.6	–10.8	–5.8
	800	–2.7	6.6	–3.5	–1.7
(IS) ( $n = 6$ )	4000	–	7.2	–	–

<sup>a</sup> Three complete freeze/thaw cycles on consecutive days.

<sup>b</sup> 18 h after extraction in the autosampler.

<sup>c</sup> 9 h at 23 °C.

<sup>d</sup> 120 days at –70 °C.

**Table 4**  
MPA kinetic parameters.

Pharmacokinetic parameter	Result
AUClast	3676.48 ng h/mL
$C_{max}$	393.74 ng/mL
$T_{max}$	14 days
$K_{el}$	0.15 days
$T_{1/2}$	4.7 days

#### 3.4. Application within an in vivo comparison study of ophthalmic drug release

After the validation process had been completed, the analytical method was successfully used to quantify the MPA in the vitreous humor of rabbits and was applied within a pharmacokinetic study of ophthalmic drug release of a novel polymeric implantable device.

Maximum concentration ( $C_{max}$ ) and time to peak concentration ( $T_{max}$ ) of MPA were determined directly from the concentration–time data. The area under the curve (AUC) was calculated with the available data over a 40-day period using the linear trapezoidal rule. The elimination constant ( $K_{el}$ ) was calculated based on the linear regression of logarithm concentrations of the last seven days, whereas the half-life ( $T_{1/2}$ ) was calculated based on  $K_{el}$ .

The kinetic results for the implantable device are summarized in Table 4. The mean value concentrations are shown in Fig. 5.

The  $C_{max}$  occurred at 14 days, and MPA concentrations to be quite similar after the 24th day. The area under the curve during the first 24 days corresponds to 97.17% of AUClast. However, the method was sensitive enough to quantify MPA in the final sample on the 40th day.

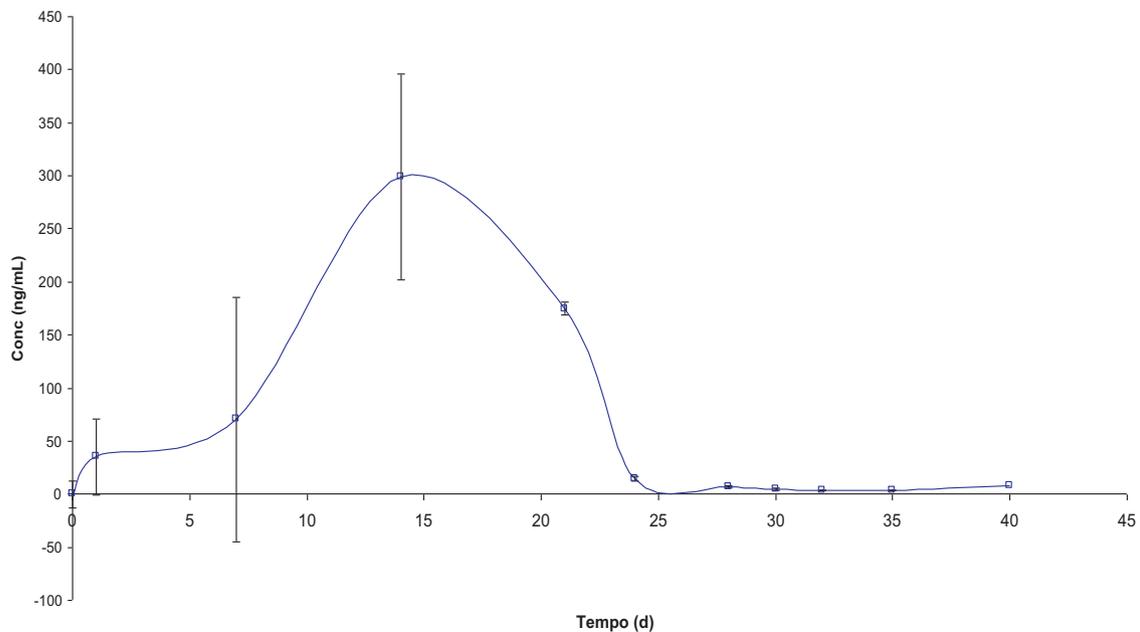


Fig. 5. Vitreo mean concentration–time curve of MPA for the implantable device loaded with MPA after the intraocular administration in rabbit eyes ( $n = 60$ ).

#### 4. Conclusion

To the best of our knowledge, this is the first method applied for the quantitation of MPA in the vitreous humor using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. This method was validated and proved to be sensitive, fast, robust, and reproducible, which allowed for a pharmacokinetic study to be performed with novel ophthalmic implantable device formulations for the controlled release of MPA. The analytical results suggest that this new device can modulate the release of MPA for up to one month and can increase its bioavailability inside the eye.

#### References

- [1] J.E. Kitchin, M.K. Pomeranz, G. Pak, K. Washenik, J.L. Shupack, Rediscovering mycophenolic acid: a review of its mechanism, side effects, and potential uses, *J. Am. Acad. Dermatol.* 37 (1997) 445–449.
- [2] W.A. Lee, L. Gu, A.R. Miksztal, N. Chu, K. Leung, P.H. Nelson, Bioavailability improvement of mycophenolic acid through amino ester derivatization, *Pharm. Res.* 7 (1990) 161–166.
- [3] N.P. Chanaud, B.P. Vistica, E. Eugui, R.B. Nussenblatt, A.C. Allison, I. Gery, Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis by mycophenolate mofetil, an inhibitor of purine metabolism, *Exp. Eye Res.* 61 (1995) 431–436.
- [4] D.J. Kilmartin, J.V. Forrester, A.D. Dick, Rescue therapy with mycophenolate mofetil in refractory uveites, *Lancet* 352 (1998) 35–36.
- [5] G. Larkin, S. Lightman, A useful immunosuppressive in inflammatory eye disease, *Ophthalmology* 106 (1999) 370–374.
- [6] S. Baltatzis, F. Tufail, E.N. Yu, C.M. Vredevelde, C.S. Foster, Mycophenolate Mofetil as an immunomodulatory agent in the treatment of chronic ocular inflammatory disorders, *Ophthalmology* 10 (2003) 1061–1065.
- [7] C.H. Lau, M. Comer, S. Lightman, Long-term efficacy of mycophenolate mofetil in the control of severe intraocular inflammation, *Clin. Exp. Ophthalmol.* 31 (2003) 487–491.
- [8] H.N. Sen, E.B. Suhler, S.Q. Al-Khatib, A.R. Djalilian, B.R.B. Nussenblatt, R.R. Bugge, Mycophenolate mofetil for the treatment of scleritis, *Ophthalmology* 110 (2003) 1750–1755.
- [9] M.P. Hatton, P.A.D. Rubin, C.S. Foster, Successful treatment of idiopathic orbital inflammation with Mycophenolate Mofetil, *Am. J. Ophthalmol.* 140 (2005) 216–218.
- [10] V.M. Rathore, R. Agrawal, S.P. Chaudhary, J. Biswas, Mycophenolate mofetil therapy in uveitis: analysis of eight cases in a tertiary ophthalmic care centre in India, *Int. Ophthalmol.* 29 (2009) 117–122.
- [11] D. Doycheva, M. Zierhut, G. Blumenstock, N. Stuebiger, C. Deuter, Long-term results of therapy with mycophenolate mofetil in chronic non-infectious uveites, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 249 (2001) 1235–1243.
- [12] E.M. Amo, A. Urtti, Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment, *Drug Dis. Today* 13 (2008) 135–143.
- [13] P. Tangri, S. Khurana, Basics of ocular drug delivery systems, *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.* 4 (2011) 1541–1552.
- [14] S. Djabarouti, P. Duffau, F. Xuereb, E. Lazaro, C. Greib, J. Gordien, O. Caubet, M. Saux, J. Viillard, J. Pellegrin, D. Breilh, Measurement of total and unbound mycophenolic acid and its glucuronide by LC coupled with MS. application to a pharmacokinetic study of Mycophenolate Mofetil in patients with autoimmune diseases, *Chromatographia* 70 (2009) 939–945.
- [15] J. Kuhn, C. Prante, K. Kleesiek, C. Götting, Measurement of mycophenolic acid and its glucuronide using a novel rapid liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry assay, *Clin. Biochem.* 42 (2009) 83–90.
- [16] J. Kuhn, C. Götting, K. Kleesiek, Sample cleanup-free determination of mycophenolic acid and its glucuronide in serum and plasma using the novel technology of ultra-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Talanta* 80 (2010) 1894–1898.
- [17] L. Zivanovic, A. Licanski, M. Zecevic, B. Jovic, M. Kostic, Application of experimental design in optimization of solid phase extraction of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide from human urine and plasma and SPE-RP-HPLC method validation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 575–585.
- [18] Food and Drug Administration FDA Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, 2001.

**ANEXO 2 - Artigo submetido para publicação.**

**Esse artigo encontra-se submetido para revisão em Journal of Chromatographic Science**

**A quick and high sensitive UHPLC-UV method for Mycophenolic acid  
determination**

**Ricardo Martins Duarte Byrro, Armando da Silva Cunha Júnior, Gerson Antônio  
Pianetti.**

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

\* Corresponding author

*Tel:* +55 31 34096967; *fax:* +55 31 34096976

*E-mail address:* ricardobyrrro@bol.com.br

## ABSTRACT

Mycophenolic acid (MPA) is a potent immunosuppressive drug that is indicated for treatment of high-risk immune rejection. Recently, studies have reported MPA as a useful agent for the treatment of intraocular inflammation. Bioavailability of drugs for intraocular diseases is low due to natural barriers of the eye, which makes the treatment very challenging. An implantable device containing MPA was developed to try to enhance the bioavailability of this drug inside the eye. The device is very small, it is loaded with low concentrations of drug and should be implanted inside the organ. To characterize this new device, a rapid, simple and sensitive chromatographic method using UV detection was developed to quantify the MPA loaded in the device. The chromatographic method was also applied to quantify the drug released from the device during an *in vitro* drug release study. The separation was carried out on a Hypersil Gold C<sub>18</sub> (50 x 2,1 mm; 1,9 µm particle size, ACT Thermo) analytical column. The mobile phase was 0.05% aqueous formic acid (v/v) and acetonitrile (35:65 v/v), at a flow rate of 0.2 mL/min. The run time was 2.0 min. UV detection was performed at 250 nm. The method showed to be linear ( $r^2 > 0.99$ ), precise (RSD < 2.0%) and selective, being adequate to determine low concentrations of MPA in simple matrixes.

**Keywords:** Mycophenolic acid; validation; *in-vitro* liberation; ophthalmic; controlled release; ocular implantable device.

## 1. Introduction

Mycophenolic acid (MPA) (Fig. 1) is a weak organic acid that shows a potent immunosuppressive activity. It was early investigated as an oral agent for the treatment of moderate to severe psoriasis. Nowadays, it is being successfully used for the treatment of high-risk immune rejection (1).

Figure 1

MPA prevents the replication of T- and B-lymphocytes by reversibly inhibiting inosine-5-monophosphate dehydrogenase in the purine synthesis pathway. As this drug shows a low absorption, the prodrug morpholinoethyl ester - micophenolate mofetil (MMF) - was developed and it has been widely used (2 - 3).

Recently, the success of MPA in treatment of inflammatory intraocular diseases has been described. People and animals with intraocular diseases, like uveitis and scleritis, have been in experimental oral treatment with MPA. They are showing good results and are also having better quality of life when compared to corticosteroids treatment and other immunosuppressive agents. (4 - 12).

The treatment of intraocular diseases, with oral or intravenous formulations, is complicated because of low concentrations of drugs achieved inside the eye. That happens because the drug delivery is impaired by the barriers which protect this organ (13). So, successful drug delivery may be the critical factor for a good therapeutic strategy. In this way, implantable devices are being developed to deliver drug directly inside the eye. Those devices are able to deliver the drug right in the place of desired

action for an extended period of time. They also avoid adverse effects that come with the high drug dosages, which are needed when oral or venous administrations are applied (14).

MMF is usually the drug quantified in pharmaceutical forms (15). Once the MMF metabolism does not take place inside the eye, those methods are not applied to ophthalmic devices which are loaded with MPA. Determinations of MPA with UV detection were already described, but they are typically used in complex matrixes, such as human plasma. Although the methods are high sensitive, they have complicated steps, like the sample preparation and long chromatographic runs to separate the drug from the matrix interferences (16-20). Because of high costs and time-consuming, those methods are not a good choice to determine MPA in low concentration in simpler matrixes.

Hence, the aim of this work was to develop and validate a simple, rapid and sensitive UHPLC–UV method for the quantitation of MPA in low concentrations in simpler matrix. The method was applied to determine low concentrations of MPA in the characterization of a new polymeric implantable device and on its *in vitro* drug liberation study.

## **2. Experimental**

### *2.1. Chemicals and reagents*

MPA reference standard was purchased from the Sigma - Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA). Ultra-pure water was obtained from a Millipore system (Bedford, MA, USA).

Acetonitrile (HPLC grade) was purchased from Tedia (Fairfield, OH, USA) and formic acid (analytical grade) was obtained from J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

## *2.2. Instrumentation and analytical conditions*

The UHPLC–UV analyses were carried out on an Acquity Waters system (New Castle, DE, USA). Empower software was used for data acquisition and analysis. LC separation was performed on an Hypersil Gold C<sub>18</sub> (50 x 2,1 mm; 1,9 µm particle size) from ACT (Thermo, United States), at 30 °C. The mobile phase consisted of 0.05% aqueous formic acid (v/v) and acetonitrile (35:65 v/v), at a flow rate of 0.2 mL/min. The run time was 2.0 min and the injection volume was 5 µL. UV detection was performed at 250 nm and spectra from 200 to 400 nm were online recorded for peak identification.

## *2.3. Preparation of standard solutions*

Stock solution of MPA was prepared by dissolving the accurately weighed reference substance in acetonitrile. Working solution of MPA was prepared immediately before the use by diluting the stock solution with mobile phase to a final concentration of 250 µg/mL.

## *2.4. Preparation of calibration samples*

A Standard solution containing 250 µg/mL of MPA was prepared in triplicate. Aliquots of these solutions were diluted with the mobile phase to five different concentrations: 0.50, 1.50, 5.00, 20.00 and 50.00 mg/mL. Calibration curves of

concentration versus area were plotted, and the obtained data were subjected to regression analysis using the least-squares method.

### *2.5. Sample preparation*

*Implantable device samples:* Implantable devices were about 6.0 mm x 0.5 mm, length and diameter, respectively, weighting about 1.7 mg and containing approximately 10% of MPA. The devices were individually placed in 2 mL plastic tubes containing 1 mL of acetonitrile. The tubes were vortex mixed for 2 minutes until the implant was completely dissolved. Then, a 100  $\mu$ L aliquot of this solution was transferred to a 5 mL volumetric flask and filled up to the mark with acetonitrile. After that, the solution was transferred to vials and a 5  $\mu$ L aliquot was injected into the chromatographic system.

*In vitro study samples:* A 500  $\mu$ L aliquot of the buffer solution used in the study was transferred to a plastic tube containing 500  $\mu$ L of acetonitrile. The tube was vortex mixed for 30 seconds and the solution was transferred to a vial. A 5  $\mu$ L aliquot was injected into the chromatographic system.

### *2.6. Method validation*

The validation process was carried out by analyzing linearity, precision, limit of quantification and selectivity of the developed method.

Linearity was assessed by five-point calibration curves in three consecutive days. Calibration curves of concentration versus area were plotted, and the obtained data were subjected to regression analysis using the least-squares method.

To evaluate the precision of the method, a sample of MPA at concentration of 10 µg/mL was analyzed in six replicates on two different days. Intra-run and inter-run precision were calculated and expressed as relative standard deviation (RSD%).

The limits of detection and quantitation were estimated based on the slope and intercept of the standard deviation obtained from the analytical curve in accordance with equations (1) and (2), respectively. Then, serial dilutions were carried out from the estimated values to obtain a ratio between signal and noise close to 3 for the detection limit of approximately 10 and for the quantitation limit.

$$LD = 3 DPa / a \quad (1)$$

$$LQ = 10 DPa / a \quad (2)$$

Where (LD) is Limit of Detection, (LQ) is limit of quantitation, (Dpa) is standard deviation of the intercept and (a) is the slope of the analytical curve.

The selectivity was assayed by evaluating spectral purities of MPA chromatographic peaks using the UV spectra recorded by a diode array detector. Aiming to evaluate possible interfering peaks with the same retention time of MPA peak in the chromatogram, blank implants samples were extracted and their solutions were injected. The same was done with a solution of pH 7.4 phosphate buffer that was used in the *in vitro* release study.

## 2.7. Method application

The validated method was used to determine the concentration of MPA in two different experiments. The first one was the characterization of the implant. After the

implants were manufactured, they were evaluated to identify the dosage of MPA loaded in it.

The second experiment was the determination of MPA released from the implantable device during a period of 15 weeks. The implantable devices were incubated in 2 mL of phosphate- buffered solution (0.1 M, pH 7.4) in a shaking water bath (TE-424, TECNAL, Piracicaba, Brazil) at 37°C. At predetermined intervals, the entire buffer volume was sampled and 2 mL of fresh medium was added to the sample vial to approximately perfect sink conditions. At the end of this experiment, a curve based on the MPA released vs. time was constructed to evaluate the liberation profile of the implants.

### **3. Results and discussion**

#### *3.1. Optimization of the chromatographic conditions*

Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) is one of the latest advancements of separation techniques. It is based on the same principles as high performance liquid chromatography, but stationary phases with particles smaller than 2 microns are used. The use of these smaller particles, with high linear velocities of the mobile phase, increases the system pressure. Therefore, the resolution is enhanced and scan time and the spent solvent is lowered (21). Equipments that can operate above 5000 psi should be used to make the implementation of this type of chromatographic technique. This study used a Waters chromatograph model ACQUITY capable of withstanding pressures up to 15000 psi.

During the development, methanol and acetonitrile were tested as organic phase. Possibly because of the low running time achieved, they showed no major difference in the selectivity of MPA. With similar organic proportions, the retention time and peak shape obtained with both solvents tested were very close. However, the intensity of the peaks was considerably higher when using acetonitrile, probably because of the fact that methanol absorbs more energy than acetonitrile in the UV region. Formic acid was used to promote the acidity in the medium so that the MPA remained in its non ionized form, increasing its interaction with the stationary phase. The use of acid also promoted higher repeatability of the results on different days, once it minimizes the pH variation in the mobile phase. The proportion between aqueous and organic was adjusted to obtain a quick run time, but able to separate the drug from interferents that could be eluted in the beginning of the chromatogram.

After the evaluation of MPA UV spectrum (200 to 400 nm),  $\lambda = 250$  nm was selected for detection and analysis. Although this wavelength was not the one with higher intensity, it was chosen because of the higher selectivity achieved in relation to possible interferences from solvents and array of samples.

The ophthalmic forms that are introduced inside the eye should be small so they will not interfere in patient sight. Thus, the device is little and the quantity of drug loaded is low. Because of that, it was necessary to use a sensitive method for MPA determination. There are some very sensitive methods to quantify MPA using UV detection reported in the literature (16-20), but their applications are to *in vivo* studies and involve some complex sample preparation steps and a long chromatographic run time to separate the drug from the matrix interferents. That makes the method long and

expensive, which indicate they are not a good choice to determine MPA in low concentration in simpler matrixes.

Hence, the MPA quantitation was possible using a wavelength of 250 nm, mobile phase consisted of 0.05% aqueous formic acid (v/v) and acetonitrile (35:65 v/v), at a flow rate of 0.2 mL/min. The run time was 1.5 min and the injection volume was 5  $\mu$ L. MPA retention time was 0.87 min. A typical chromatogram and the MPA UV spectrum is presented in Figure 2.

Figure 2.

### 3.2. Method validation

To determine a linear response range, it was taken into consideration that the method should be very sensitive as it would be applied to the *in vitro* release study, where we expected to find small concentrations of MPA released by time. The method should also be able to determine higher concentrations of MPA because it will be used in the determination of MPA loaded in the implants. Considering that the implants have an average weight of 1.7 mg and 10% of its weight is the drug, the concentration expected is up to 170  $\mu$ g of MPA. As the preparation step of the samples will dilute the implants, it was deemed that a maximum detection on 50  $\mu$ g / mL would be enough.

The MPA calibration curves were shown to be linear over the range 0.5 - 50  $\mu$ g/mL, with a regression coefficient higher than 0.99. A typical standard curve was  $y = 90834x + 5759.7$ . The residuals had no tendency of variation with concentration. The obtained LOQ and LD was 0,3 and 0,1  $\mu$ g/mL, respectively.

The intra-run and inter-run precision was calculated by analyzing six replicates of a 10 µg/mL MPA sample in three different days. The mean R.S.D values were 1.15% and 1.12% for the intra-run and inter-run precision, respectively. These data indicated reproducible results and a reliable assay.

Peak purity higher than 99.0% was obtained for MPA chromatograms, demonstrating that other compounds did not co-elute with the main peaks. The chromatograms obtained during the analysis were very clean and no significant interference could be detected at the retention time of the analyte in the analyzed blank samples.

*3.3. Application to analyses of MPA loaded in the implants and on in vitro drug release study.*

After validation process, the analytical method was successfully used for the quantitation of MPA loaded in the implantable devices and liberated in the phosphate buffer used in the *in vitro* drug release study.

Considering the individual weight of each device analyzed (n = 15), the MPA concentration found after the analysis varied from 10.02% to 10,15%. The mean concentration was 10.12%. It means that, considering an average weight of 1.7 mg, each implant has approximately 172 mg of MPA. So, the samples presented MPA contents were very close to the labeled amount. This application is important to know the right dosage that is administered with the implant and is essential for the quality control of produced implants.

After analyses of the drug liberated from the implants in the phosphate buffer during the *in vitro* test, a study of the implant compartment as a prolonged drug delivery device was performed. The mean cumulative release of MPA from the implants (n=6) at a constant drug loading of 10% has been plotted in Figure 3.

#### Figure 3

As illustrated in Figure 3, approximately 90% of MPA was released during the experiment. In the first five weeks, the device showed a kind of latency in which it demonstrated slow-release compartment. After that, the drug delivery increased and about 80% were released from the sixth week onwards. The minimum and maximum amount of MPA quantified in this study was 0.68 and 30.88  $\mu\text{g/mL}$ , respectively.

#### **4. Conclusion**

The developed method, to our knowledge, is the quickest method to quantify MPA described. It was validated and showed to be very simple, rapid and reproducible, which allowed us to perform the determination of de MPA dosage in the implantable devices and to quantify very low concentrations of the drug released during the *in vitro* liberation study. The analytical results suggest that the new device may modulate the MPA release and might be able to increase its bioavailability in the eye.

#### **References**

[1] J. E. Kitchin, M. K. Pomeranz, G. Pak, K. Washenik, J. L. Shupack, Rediscovering mycophenolic acid: A review of its mechanism, side effects, and potential uses, *J. Am. Acad. Dermatol.* 37 (1997) 445-449.

- [2] C. E. Staatz, S. E. Tett, Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Mycophenolate in Solid Organ Transplant Recipients, *Clin. Pharmacokinet.* 46 (2007) 13-58.
- [3] W. A. Lee, L. Gu, A. R. Miksztal, N. Chu, K. Leung, P. H. Nelson, Bioavailability Improvement of Mycophenolic Acid Through Amino Ester Derivatization, *Pharm. Res.* 7 (1990) 161-166.
- [4] N. P. Chanaud, B. P. Vistica, E. Eugui, R. B. Nussenblatt, A. C. Allison, I. Gery, Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis by Mycophenolate Mofetil, an inhibitor of purine metabolism, *Exp Eye Res* 61 (1995) 431-436.
- [5] D. J. Kilmartin, J. V. Forrester, A. D. Dick, Rescue therapy with mycophenolate mofetil in refractory uveites, *Lancet.* 352 (1998) 35-36.
- [6] G. Larkin, S. Lightman, A useful immunosuppressive in inflammatory eye disease, *Ophthalmology.* 106 (1999) 370-374.
- [7] S. Baltatzis, F. Tufail, E. N. Yu, C. M. Vredeveld, C. S. Foster, Mycophenolate Mofetil as an Immunomodulatory Agent in the Treatment of Chronic Ocular Inflammatory Disorders, *Ophthalmology.* 10 (2003) 1061-1065.
- [8] C. H. Lau, M. Comer, S. Lightman, Long-term efficacy of mycophenolate mofetil in the control of severe intraocular inflammation. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 31(2003) 487-491.
- [9] H. N. Sen, E. B. Suhler, S. Q. Al-Khatib, A. R. Djalilian, B. R. B. Nussenblatt, R. R. Buggage, Mycophenolate mofetil for the treatment of scleritis, *Ophthalmology.* 110 (2003) 1750-1755.

- [10] M. P. Hatton, P. A. D. Rubin, C. S. Foster, Successful Treatment of Idiopathic Orbital Inflammation With Mycophenolate Mofetil. *Am. J. Ophthalmol.* 140 (2005) 216-218.
- [11] V. M. Rathore, R. Agrawal, S. P. Chaudhary, J. Biswas, Mycophenolate mofetil therapy in uveitis: analysis of eight cases in a tertiary ophthalmic care centre in India. *Int. Ophthalmol.* 29 (2009) 117-122.
- [12] D. Doycheva, M. Zierhut, G. Blumenstock, N. Stuebiger, C. Deuter, Long-term results of therapy with mycophenolate mofetil in chronic non-infectious uveites. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 249 (2001) 1235–1243.
- [13] A. Urtili, Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery, 58 (2006) 1131-1135.
- [14] J. L. Bourges, C. Bloquel, A. Thomas, F. Froussart, A. Bochot, F. Azan, R. Gurny, D. Benezet, F. Behar-Cohen, Intraocular implants for extended drug delivery: Therapeutic applications. *Adv Drug Del Rev* 58 (2006) 1182-1202.
- [15] The European Pharmacopoeia. 6. ed. Strasbourg: Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM), p. 2458-2460, 2007.
- [16] V. Srivatsan, A.K. Dasgupta, P. Kale, R. Verma, P. Joshi, D. Soni, M. Patel, G. Soni, J. Patel, H. Modi, Determination of mycophenolic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography, *J.Chromatogr. A*, 1031 (2004) 259–264.
- [17] D.G. Watson, F.G. Araya, P.J. Galloway, T.J. Beattie, Development of a high pressure liquid chromatography method for the determination of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in small volumes of plasma from paediatric patients, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 87–92.

- [18] I. S. Westley, B. C. Sallustio, R. G. Morris, Validation of a high-performance liquid chromatography method for the measurement of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in plasma. *Clin. Biochem.* 38 (2005) 824 – 829.
- [19] C.G. Zambonin, L. Monaci, A. Aresta, Solid-phase microextraction-high performance liquid chromatography and diode array detection for the determination of mycophenolic acid in cheese, *Food Chem.* 78 (2002) 249–254
- [20] G. Bahrami, B. Mohammadi, An isocratic high performance liquid chromatographic method for quantification of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in human serum using liquid-liquid extraction: Application to human pharmacokinetic studies. *Clin. Chim. Acta*, 317 (2006) 185-190.
- [21] L. Maldaner, I. C. S. F. Jardim, O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Quim. Nova.* 32 (2009) 214-222.

## **ANEXO 3 - Resumos publicados em congressos**

**1-) Apresentado durante o SIMCRO 2010, realizado de 14 a 16 de setembro de 2010 em Campos do Jordão – SP.**

### **DEVELOPMENT OF AN UPLC METHOD FOR MYCOPHENOLIC ACID QUANTIFICATION IN A NEW IMPLANTABLE DEVICE**

**R. M. D. Byrro, I. C. César, F. H. A. Nogueira, G. A. Pianetti, A. Silva Cunha**

*Dep. Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia - UFMG, Belo Horizonte - MG*

Mycophenolic acid (MPA) is an immunosuppressive agent widely used in the treatment of solid organ transplant rejection. It is administered as a morpholinoethyl ester of MPA, the mycophenolate mofetil (MPM) who is readily hydrolyzed to the active metabolite MPA. MPM has also been successfully used to treat a multitude of autoimmune and other systemic disorders. MPA has been shown to inhibit experimental autoimmune posterior uveitis in rats, and its use in human posterior inflammatory eye disease has been described in preliminary studies. The treatment of posterior uveitis is a challenge due to the anatomy of the eye, which has some barriers to the drug access from classic administration systems. Thus, the bioavailability of drugs in this target is very low and the eye remains an organ for which successful drug delivery may be the limiting factor for a successful therapeutic strategy. To solve the problem of low bioavailability of MPA in the eye, a new delivery system based on a biodegradable polymeric device which can be implanted in the eye and deliver the drug directly is being developed. Since MPA is the active drug and the hydrolysis of MPM can not take place in the eye, the implantable device was produced with MPA. To quantify MPA in the new implantable device, a new ultra performance liquid chromatography (UPLC) method with ultraviolet (UV) detection was developed and validated. The method must be very sensitive due to the low concentrations of MPA in the devices (100 µg). The chromatographic separation was achieved on a Thermo C18 column (50 x 2.1 mm; 1.9 µm), isocratic mobile phase consisting of acetonitrile and water with 0.05% formic acid (65:35). The flow rate was 0.2 mL/min and injection volume was 10 µL. The retention time was 1.0 minute and runtime was 1.5 minute. UV detection was performed using a PDA detector at 250 nm. The method was linear in the concentration range of 0.3 - 50 µg/mL ( $r > 0.99$ ). The limit of quantitation was 0.3 µg/mL and the limit of detection was 0.1 µg/mL demonstrating the sensitivity of the method. The intra-day and inter-day relative standard deviations (RSD) in three validation runs over the entire concentration range were less than 2.0%. The precision was determined at 10 µg/mL (middle of the concentration range) for six replicates prepared in two consecutive days and the RSD was below 1.15%. The robustness was performed with small variations in the column oven temperature ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ), acetonitrile proportion ( $\pm 3\%$ ) and formic acid concentration in the aqueous phase (0.1%). The RSD for all these tests were less than 2.0%. Peak purity was performed to evaluate the method specificity, and the purity factor was above 99.0%. The method is being successfully applied to the evaluation of the concentration of MPA in the new implantable devices.

**2-) Apresentado durante o COLACRO 2012, realizado de 01 a 05 de outubro de 2012 em Florianópolis – SC**

**QUANTITATION OF MYCOPHENOLIC ACID IN VITREO BY HPLC-ESI-MS/MS  
AFTER IMPLANTATION OF AN OPHTHALMIC DRUG DELIVERY DEVICE IN  
RABBIT EYES**

**Ricardo Martins Duarte Byrro; Paula Rocha Chellini; Gabriela Lourenço Ioshimoto; Francisco Max Damico; Dora Fix Ventura; Armando da Silva Cunha Jr.; Gerson Antônio Pianetti**

Mycophenolic acid (MPA) is an immunosuppressive agent widely used in the treatment of solid organ transplant rejection. In preliminary studies, MPA has been shown to inhibit experimental autoimmune posterior uveitis in rats and its use in human posterior inflammatory eye disease has been described. The treatment of posterior uveitis is a challenge due to the anatomy of the eye, which has some barriers to the drug access. Thus, the bioavailability of drugs in this target is very low and a successful drug delivery may be the limiting factor for a successful therapeutic strategy. To solve this problem, a new delivery system based on a biodegradable polymeric device which can be implanted in the eye and deliver MPA directly in the target is being developed. To characterize the MPA bioavailability and pharmacokinetic profile when administered within the new device, a liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry method (HPLC-ESI-MS/MS) was developed to quantify MPA in the eye. The analyte was extracted from rabbit vitreo samples with a protein precipitation method using ketoprofen as internal standard. The separation was performed on a reversed-phase C18 column with a mobile phase composed of methanol and aqueous 0.1% acetic acid (8:2). Mass spectrometry detection was carried out using positive electrospray ionization and Multiple Reaction Monitoring. Blank rabbit vitreo samples were employed as matrix to prepare the calibration standards. Calibration curve was constructed over the range of 3-10000 ng/mL for MPA. The lower limit of quantitation was 3 demonstrating the sensitivity of the method. The mean R.S.D value in the intra-run precision was 4.0% and in the inter-run precision was 9.0%. The mean accuracy value was within the range of 90% to 110%. No matrix effect was detected in the method. The analyte was stable in vitreo under different conditions of temperature and time. The validated method was successfully applied to determine the intra ocular concentrations of MPA in rabbits (n=28) previously treated with the developed implantable device.

## ANEXO 4 – Certificado de aprovação do protocolo para experimentos com animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo CEUA nº 45/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Desenvolvimento e Avaliação de Sistemas Intra-oculares Biodegradáveis de Liberação Controlada de Ácido Micofenólico**", que tem como responsável(is) **Armando da Silva Cunha Junior**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **28/03/2012**.

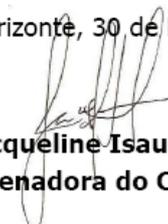
Este certificado expira-se em **28/03/ 2017**.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol CEUA nº 45/2011**, related to the project entitled "**Development and evaluation of intraocular biodegradable systems for controlled release of mycophenolic acid**", under the supervisors of **Armando da Silva Cunha Junior**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 28, 2012**.

This certificate expires in **March 28, 2017**.

Belo Horizonte, 30 de Março de 2012.

  
**Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516

[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

