

ANA GABRIELA REIS SOLANO

**DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES POLIMÉRICOS
INTRAOCULARES CONTENDO ETOPOSÍDEO DESTINADOS AO
TRATAMENTO DO RETINOBLASTOMA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador Prof. Dr. Gérson Antônio Pianetti -
UFMG

Co-orientador Profa. Dra. Gisele Rodrigues Silva -
UFSJ

Belo Horizonte - MG

2014

S684d Solano, Ana Gabriela Reis.
Desenvolvimento de implantes poliméricos intraoculares
contendo etoposídeo destinados ao tratamento do
retinoblastoma. / Ana Gabriela Reis Solano. – 2014.
171 f. : il.

Orientador: Gérson Antônio Pianetti.
Coorientadora: Gisele Rodrigues Silva.

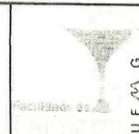
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas.

1. Retinoblastoma - Teses. 2. Implantes poliméricos intraoculares –
Teses. 3. Etoposídeo - Teses. 4. Quimioterapia - Teses. 5. Tecnologia
de liberação controlada -- Teses. I. Pianetti, Gérson Antônio. II. Silva,
Gisele Rodrigues. III. Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:615.4



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



FOLHA DE APROVAÇÃO

**“DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES POLIMÉRICOS INTRAOCULARES CONTENDO
ETOPÓSÍDEO DESTINADOS AO TRATAMENTO DO RETINOBLASTOMA”.**

ANA GABRIELA REIS SOLANO

Tese submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 12 de setembro de 2014, pela comissão constituída pelos membros:


Prof. Gerson Antonio Pianetti - Orientador
UFMG


Prof. Cícero Flávio Soares Aragão
UFRN


Profa. Ana Júlia Pereira Santinho Gomes
UFSJ


Profa. Elzira de Aguiar Nunan
Centro Universitário UNA


Prof. Christian Fernandes
UFMG

Belo Horizonte, 12 de setembro de 2014.

Dedico este trabalho a minha mãe lêda (*in memorian*), por ter se dedicado de forma incondicional em minha formação pessoal e profissional.

Ao meu avô Abílio (*in memorian*), pelo carinho e cuidado.

Ao Ricardo, pela paciência, apoio e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem ELE nada seria possível.

Este trabalho não seria possível se não fosse a colaboração e apoio de muitas pessoas, as quais dedico meus sinceros agradecimentos.

À minha mãe, Iêda (*in memoriam*), pelo carinho, cuidado, apoio e amor incondicionais, por acreditar sempre em mim e por me ensinar a não desistir, mas sim, persistir em meus objetivos, enfim, pelo exemplo de vida. Te amo sempre.

Ao Prof. Dr. Pianetti pela orientação, confiança depositada, amizade, ensinamentos e pela contribuição em minha formação profissional.

À Profa. Dra. Gisele pela co-orientação, idealização do projeto, sugestões, discussão de idéias, incentivo, amizade e ensinamentos.

Aos professores e técnicos da UFSJ pelo apoio e amizade. Ao Mairon, pelo auxílio na formatação das imagens.

À Profa. Ana Hortência e Profa. Flávia pela amizade, apoio e auxílio na realização de algumas análises.

Aos amigos do CEDAFAR, Mirian, Luciano, Tânia e Léo pelo apoio e auxílio.

À Lúcia, Márcia e Edna pelo auxílio ao longo desses quatro anos.

Aos demais pós-graduandos e farmacêuticos do Laboratório de Controle de Qualidade, apesar do pouco contato, sempre estiveram disponíveis para ajudar. Ao Geovani pela disponibilidade e auxílio.

A todos os professores da pós-graduação pelos ensinamentos que contribuíram para minha formação.

Aos professores do Controle de Qualidade pela atenção e conhecimentos compartilhados.

À Dra. Sílvia Ligório Fialho pela contribuição e auxílio na realização dos experimentos.

Ao Dr. Doutor Gustavo Oliveira Fulgêncio pela colaboração na realização dos experimentos in vivo.

Ao Prof. Dr. Armando pela dedicação ao programa de pós-graduação por vários anos e contribuição na realização das análises.

Aos membros do colegiado da Pós-graduação pelo auxílio quando se fez necessário.

Aos meus alunos, Adriana, Camila e Luiz, pela enorme contribuição no desenvolvimento das atividades práticas.

À Quiral Química pela doação da matéria-prima.

À minha avó Percília e ao meu tio Gil por estarem sempre ao meu lado e se preocuparem tanto comigo.

Ao meu avô Abílio (*in memorian*) pelo carinho e cuidado.

Ao meu pai (Humberto) e à Patrícia pelo apoio, carinho e torcida.

À minha irmã Michelle e ao Stênio pela estadia, apoio e carinho.

Aos meus amigos, Cris, Ceci, Silvio, Mary, Thais (Maninha), Kelly (Mãe) e tantas outras pessoas pela paciência e compreensão pela minha ausência durante este período.

Ao Toninho, Elisa, Iêda, Túlio, Heitor e toda família que me acolheram de forma tão carinhosa.

Ao Zeca pelo companheirismo, carinho e momentos de relaxamento.

Ao Ricardo pelo apoio, paciência, companheirismo e apoio durante essa caminhada.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

RESUMO

O retinoblastoma é um tumor maligno intraocular mais comum na infância e seu tratamento por quimioterapia sistêmica apresenta algumas desvantagens: penetração limitada do fármaco no segmento posterior do globo ocular e toxicidade sistêmica. Os implantes intraoculares representam uma alternativa promissora para o tratamento de retinoblastoma, visto que podem disponibilizar o fármaco diretamente na cavidade vítrea em doses terapêuticas e por um período prolongado, promovendo, assim, o aumento da eficácia terapêutica e a redução dos efeitos adversos sistêmicos. Além disso, esses sistemas são capazes de proteger os fármacos instáveis nas condições fisiológicas, como é o caso do etoposídeo, antitumoral comumente empregado na quimioterapia sistêmica do retinoblastoma, pouco solúvel em água e instável em meios ácido e alcalino. A poli-(ε-caprolactona) (PCL) e o ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA) são polímeros biodegradáveis e biocompatíveis extensamente utilizados em sistemas de liberação de fármacos. Neste trabalho, dois sistemas poliméricos cilíndricos foram desenvolvidos: implantes constituídos de PCL e etoposídeo; e implantes de PLGA incorporados de etoposídeo. Ambos os sistemas foram analisados pelas técnicas de espectrofotometria na região do infravermelho por transformada de Fourier, difração de raios-X, termogravimetria, calorimetria exploratória diferencial e microscopia eletrônica de varredura. Além disso, os implantes foram submetidos ao teste de esterilidade, ao ensaio de uniformidade de conteúdo e à avaliação da estabilidade frente à radiação ultravioleta por trinta minutos. Também foi determinado o perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos implantes e avaliada a tolerância ocular por meio do teste em membrana córion-alantóide de ovo embrionado de galinha (Teste HET-CAM). Adicionalmente, os implantes constituídos por PLGA e etoposídeo foram submetidos ao estudo de liberação *in vivo* do fármaco. Para quantificação de etoposídeo nas diferentes amostras (implantes de PCL, implantes de PLGA e humor vítreo), métodos por cromatografia líquida de alta eficiência foram desenvolvidos e validados. Os resultados obtidos demonstraram que foi possível preparar implantes biodegradáveis cilíndricos. As diferentes técnicas de caracterização revelaram que o fármaco manteve sua integridade química após incorporação às matrizes poliméricas e após a esterilização. Os sistemas poliméricos propiciaram a liberação

in vitro do etoposídeo por um período prolongado (150 dias para os implantes de PCL e 50 dias para os dispositivos de PLGA). No estudo *in vivo*, os implantes de PLGA propiciaram a liberação de aproximadamente 63% do antitumoral por 42 dias e mantiveram concentração intravítrea na faixa de 1,1 a 2,5 µg/mL. Os implantes foram classificados como não irritantes de acordo com o Teste HET-CAM, sugerindo que esses sistemas serão bem tolerados após inserção na cavidade vítrea do olho. Os métodos analíticos desenvolvidos apresentaram seletividade, linearidade, exatidão, precisão e robustez adequadas para quantificação de etoposídeo no humor vítreo e nos implantes poliméricos. Os resultados obtidos sugerem que os implantes poliméricos contendo etoposídeo representam um potencial sistema de liberação de fármacos para o tratamento do retinoblastoma.

Palavras chave: etoposídeo, retinoblastoma, implante intraocular, poli(ε-caprolactona); ácido poli-lático-co-glicólico.

ABSTRACT

Retinoblastoma represents the most common primary intraocular malignancy of childhood and its treatment by systemic chemotherapy presents disadvantages: limited drug penetration into the eye posterior segment, and systemic toxicity. The intraocular implants represent an advantageous alternative for retinoblastoma treatment, since they are able to release drugs directly to the vitreous cavity and to maintain long-term vitreous concentration of drugs in therapeutic range, thus promoting the increase therapeutic efficacy and the reduction of side effects associated with systemic chemotherapy. Etoposide is a cytotoxic drug widely used in retinoblastoma chemotherapy. The poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) are biodegradable and biocompatible polymers used in drug delivery systems. In this study, two polymeric systems were developed: implants constituted by PCL and etoposide; and etoposide-loaded-PLGA implants. The implants were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy, wide-angle X-ray scattering, thermogravimetry, differential scanning calorimetry, and scanning electron microscopy. The content uniformity, sterility, and stability of the implant after sterilization were also evaluated. The *in vitro* release of etoposide from the devices and the ocular tolerance by the Hen Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) method were studied. Additionally, the etoposide-loaded PLGA implants were submitted to *in vivo* drug release study. Analytical methods using high performance liquid chromatography were developed and validated for the determination of etoposide in the different samples (PCL implants, PLGA implants, and vitreous humour). The results showed that it was possible to prepare biodegradable cylindrical implants. The analysis results revealed that the drug preserved its chemical integrity after incorporation into the polymeric matrices. The polymeric systems provided *in vitro* release of etoposide for a long period (150 days for the PCL implants, and 50 days for the PLGA implants). *In vivo*, devices released approximately 63% of the loaded drug in 42 days. The intravitreal concentrations remained in the range from 1.1 to 2.5 $\mu\text{g/mL}$ over 42 days. The polymer systems implants were classified as non-irritant according to the HET-CAM test, suggesting that these devices will be well tolerated after insertion into the vitreous cavity of the eye. The analytical methods developed were selective, linear, accurate, precise and

robust for quantification of etoposide in the vitreous humor and polymer implants. The results obtained suggest that polymer implants containing etoposide represent a potential drug delivery system for the treatment of retinoblastoma.

Keywords: etoposide, retinoblastoma, intraocular implant, poly(ϵ -caprolactone), poly(D,L-lactide-co-glycolide) acid

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo da estrutura do olho	29
Figura 2 - Síntese de PCL a partir de ϵ -caprolactona	38
Figura 3 - Síntese do PLGA.....	39
Figura 4 - Estrutura química do etoposídeo	41
Figura 5 - Esquema de degradação do etoposídeo em meio ácido.....	42
Figura 6 - Esquema de degradação do etoposídeo em meio alcalino.....	42
Figura 7 - Procedimento cirúrgico para a inserção do implante intraocular: (a) determinação do local de inserção do trocater; (b) introdução do trocater no globo ocular; (c) cânula do trocater inserido no globo ocular; (d) introdução do implante na cavidade vítrea.....	79
Figura 8 - Implante de PCL contendo etoposídeo (50% p/p)	82
Figura 9 - Cromatograma obtido para solução de resolução, empregando fase móvel composta por acetonitrila e ácido acético 4% (v/v) (30:70), fluxo de 2 mL/min, coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m) a 25 °C e detecção a 285 nm	83
Figura 10 - Cromatogramas obtidos para solução de PCL a 35 μ g/mL (a); solução padrão de etoposídeo a 35 μ g/mL (b) e solução contendo PCL (35 μ g/mL) e etoposídeo (35 μ g/mL) (c).....	85
Figura 11 - Concentração de etoposídeo esperada <i>versus</i> concentração determinada experimentalmente para avaliação de tendência. Reta ideal (em preto): $y = x$; reta experimental (em vermelho): $y = (0,042 \pm 0,187) + (0,992 \pm 0,004)x$	89
Figura 12 - Erro relativo <i>versus</i> concentração de etoposídeo, com intervalo de tolerância a 95% (linhas tracejadas) e limites de aceitação de $\pm 5\%$ (em vermelho)	89
Figura 13 - Espectros na região do infravermelho de etoposídeo (a), implantes constituídos de etoposídeo e PCL (1:1) (b), mistura física de etoposídeo e PCL na proporção 1:1 (c) e PCL (d)	93
Figura 14 - Curvas de DSC da PCL (a), etoposídeo (b), mistura física de etoposídeo e PCL (c) e implantes constituídos de etoposídeo e PCL (1:1) (d)	94
Figura 15 - Perfil termogravimétrico do etoposídeo (a) e implantes constituídos de etoposídeo e PCL (1:1) (b).....	95
Figura 16 - Padrões de WAXS para etoposídeo (a), PCL (b) e implantes constituídos de PCL e etoposídeo (1:1) (c)	97
Figura 17 - Fotomicrografias dos implantes constituídos de PCL e etoposídeo (1:1): superfície externa em aumento de 100X (a) e 5000X (b); seção transversal em aumento de 120X (c) e 1500X (d)	98
Figura 18 - Espectro na região do infravermelho do etoposídeo antes (a) e após (b) ser submetido à radiação ultravioleta por trinta minutos	100
Figura 19 - Curvas de DSC do etoposídeo antes (a) e após (b) ser submetido à radiação ultravioleta por trinta minutos.....	101

Figura 20 – Espectros de absorção na região do infravermelho dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL antes (a) e após (b) serem submetidos à radiação ultravioleta	102
Figura 21 - Perfil de liberação acumulada <i>in vitro</i> de etoposídeo a partir dos implantes de PCL...	104
Figura 22 - Alteração de massa representada pela porcentagem de perda de massa dos implantes de PCL contendo etoposídeo (a), e absorção de água dos implantes, a 37°C, em PBS (b)	105
Figura 23 - MCA intacta (a) e visualizada em diferentes intervalos de tempo após o tratamento com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L: 30 segundos (b); 2 minutos (c); 5 minutos (d); 5 minutos em aumento de 24x (e); e 24 horas (f).....	108
Figura 24 - MCA intacta (a) e visualizada em 5 minutos após o tratamento com diferentes amostras (b), cujos detalhes dos vasos sanguíneos estão apresentados na micrografia (c)	109
Figura 25 - Implante de PLGA contendo etoposídeo (33,3%p/p).	110
Figura 26 - Cromatograma obtido para solução de resolução, empregando fase móvel composta por acetonitrila e tampão acetato pH 4,56 (0,05 mol/L) (38:62), fluxo de 1,9 mL/min, coluna fenil (250 x 4,6 mm; 5 µm) a 25 °C e detecção a 247 nm	112
Figura 27 - Cromatogramas obtidos para: solução de PLGA a 50 µg/mL (a); solução padrão de etoposídeo a 25 µg/mL (b) e solução contendo PLGA (50 µg/mL) e etoposídeo (25 µg/mL) (c).....	113
Figura 28 - Erro relativo <i>versus</i> concentração de etoposídeo, com intervalo de tolerância a 95% (linhas tracejadas) e limites de aceitação de ±5% (em vermelho)	117
Figura 29 - Espectros na região do infravermelho de etoposídeo (a), PLGA (b), mistura física de etoposídeo e PLGA (1:2), implante de etoposídeo e PLGA (2:1) (d)	120
Figura 30 - Curvas de TG do PLGA (a), etoposídeo (b), mistura física de etoposídeo e PLGA (1:2) (c) e implantes constituídos de etoposídeo e PLGA (1:2) (d).....	121
Figura 31 - Curvas de DSC do etoposídeo (a), PLGA (b), mistura física de etoposídeo e PLGA (1:2) (c) e implantes constituídos de etoposídeo e PLGA (1:2) (d).....	122
Figura 32 - Fotomicrografias da superfície externa de implantes constituídos de etoposídeo e PLGA (1:2) em aumento de 50X (a) e 1000X (b).....	123
Figura 33 – Espectros na região do infravermelho de implantes constituídos de etoposídeo e PLGA (1:2) antes (a) e após (b) serem submetidos à radiação ultravioleta por trinta minutos.....	125
Figura 34 - Perfil de liberação acumulada <i>in vitro</i> de etoposídeo a partir dos implantes de PLGA	127
Figura 35 - Alteração de massa representada pela porcentagem de perda de massa dos implantes de PLGA contendo etoposídeo (a), e absorção de água dos implantes, a 37°C, em PBS.....	127
Figura 36 - MCA intacta (a) e visualizada em 5 minutos após o tratamento com diferentes amostras (b), cujos detalhes dos vasos sanguíneos estão apresentados na micrografia (c)	130
Figura 37 - Cromatograma obtido para solução de resolução preparada em humor vítreo, empregando fase móvel composta por acetonitrila e tampão acetato pH 4,56 (0,05 mol/L) (38:62), fluxo de 1,9 mL/min, coluna fenil (250 x 4,6 mm; 5 µm) a 25 °C e detecção a 247 nm.....	131

Figura 38 - Cromatogramas obtidos para: amostra de humor vítreo (a), amostra de humor vítreo contendo etoposídeo a 50 µg/mL (b) e solução de humor vítreo simulado (c)	132
Figura 39 - Erro relativo <i>versus</i> concentração de etoposídeo, com intervalo de tolerância a 95% (linhas tracejadas) e limites de aceitação de ± 15% (em vermelho)	137
Figura 40 - Implante constituído por PLGA e etoposídeo inserido na cavidade vítrea do olho direito do coelho (a), por meio de um Trocater transescleral (25G Edgeplus [®] , Alcon, EUA) (b).....	142
Figura 41 - Olhos submetidos ao processo cirúrgico para inserção dos implantes constituídos de PLGA e etoposídeo: hiperemia moderada da conjuntiva (a) e da mucosa palpebral (b); implante na cavidade vítrea após 42 dias e sua aparência após a remoção (em destaque) (c).....	143
Figura 42 - Perfil de liberação acumulada <i>in vivo</i> de etoposídeo a partir dos implantes de PLGA.	144
Figura 43 – Concentrações intravítreas de etoposídeo liberado a partir dos implantes ao longo de 42 dias de estudo	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Soluções diluídas de etoposídeo para obtenção de curva analítica e avaliação da linearidade do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL	53
Tabela 2 - Diluições e concentrações das soluções para avaliação da precisão do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL	54
Tabela 3 - Parâmetros analíticos e variações utilizadas em estudo de robustez do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL	55
Tabela 4 - Matriz de planejamento fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez de acordo com teste de Youden e Steiner (1975)	56
Tabela 5 - Escores para as alterações observadas na MCA do ovo embrionado de galinha	62
Tabela 6 - Relação entre o escore da resposta vascular e o potencial de irritação das amostras....	63
Tabela 7 - Soluções diluídas de etoposídeo para obtenção de curva analítica e avaliação da linearidade do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA.....	66
Tabela 8 - Diluições e concentrações das soluções para avaliação da precisão do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA	67
Tabela 9 - Parâmetros analíticos e variações utilizadas para avaliação da robustez do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA.....	68
Tabela 10 – Soluções padrão de etoposídeo utilizadas na validação do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em humor vítreo	72
Tabela 11 – Soluções de etoposídeo em humor vítreo utilizadas na validação do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em humor vítreo.....	73
Tabela 12 - Parâmetros da análise de regressão linear dos resultados obtidos para etoposídeo na faixa entre 5 e 65 µg/mL.....	86
Tabela 13 - Valores de concentração média e DPR obtidos para avaliação da precisão intradia e interdias do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL.....	87
Tabela 14 - Porcentagem de recuperação de etoposídeo para avaliação de exatidão do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL	88
Tabela 15 - Valores de concentração média, DPR e porcentagem de recuperação média para determinação do limite de quantificação do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL	90
Tabela 16 – Resultado do efeito dos parâmetros analíticos sobre a área, tempo de retenção (t_r), assimetria, número de pratos teóricos (N), teor de etoposídeo e resolução do método por CLAE para determinação de etoposídeo em implantes de PCL	91
Tabela 17 - Escore médio e classificação quanto ao potencial de irritação ocular das amostras submetidas ao teste HET-CAM	107

Tabela 18 - Parâmetros da análise de regressão linear dos resultados obtidos para etoposídeo na faixa entre 5 e 45 µg/mL.....	115
Tabela 19 - Valores de concentração média e DPR obtidos para avaliação da precisão intradia e interdias do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA	116
Tabela 20 - Porcentagem de recuperação de etoposídeo para avaliação de exatidão do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA.....	117
Tabela 21 - Valores de concentração média, DPR e porcentagem de recuperação média para determinação do limite de quantificação do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA.....	118
Tabela 22 - Resultados das análises obtidas em condições nominais e modificadas para avaliação da robustez do método para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA	118
Tabela 23 - Resultados das análises para avaliação do efeito de matriz para o método por CLAE para quantificação de etoposídeo em humor vítreo.....	133
Tabela 24 - Equações das retas e respectivos coeficientes de correlação e de determinação obtidos na avaliação da linearidade do método CLAE para quantificação de etoposídeo em humor vítreo .	134
Tabela 25 - Resultados obtidos para avaliação da precisão e exatidão intradia e interdias do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em humor vítreo	136
Tabela 26 - Valores de concentração média, DPR e erro padrão relativo para determinação do limite inferior de quantificação (n=5) em humor vítreo.....	137
Tabela 27 - Resultados obtidos para avaliação da estabilidade de curta duração e estabilidade pós-processamento de amostras de humor vítreo contendo etoposídeo.....	139
Tabela 28 - Resultados obtidos para avaliação da estabilidade de longa duração de amostras de humor vítreo contendo etoposídeo nas concentrações de 2 e 80 µg/mL.....	140
Tabela 29 - Resultados obtidos para avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento de amostras de humor vítreo contendo etoposídeo	140
Tabela 30 - Resultados obtidos para avaliação da estabilidade do etoposídeo em solução nas concentrações de 1 e 1000 µg/mL.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANCOVA	→	análise de covariância
ANOVA	→	análise de variância
CLAE	→	cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	→	detector de arranjo de diodos
DNA		<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPR	→	desvio padrão relativo
DMSO	→	dimetilsulfóxido
DSC	→	<i>differential scanning calorimetry</i>
EUA	→	Estados Unidos da América
FM	→	fator de matriz
FTIR	→	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
Funed	→	Fundação Ezequiel Dias
HET-CAM	→	<i>Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane</i>
IC50	→	concentração inibitória a 50%
MCA	→	membrana córion-alantóide
N	→	número de pratos teóricos
PBS	→	<i>phosphate buffered saline</i>
PCL	→	poli(ϵ -caprolactona)
PLGA	→	ácido poli(D,L-lático-co-glicólico)

q.s.p.	→	quantidade suficiente para
RB	→	gene retinoblastoma
RPE	→	<i>retinal pigment epithelium</i>
rpm	→	rotações por minuto
SEM	→	<i>scanning electron microscopy</i>
SQR	→	substância química de referência
TG	→	termogravimetria
t_r	→	tempo de retenção
WAXS	→	<i>wide-angle X-ray scattering</i>

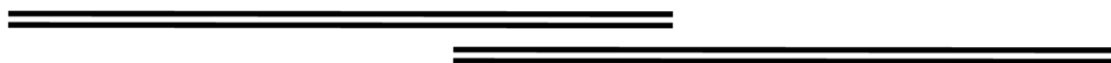
SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
3.1 Anatomia do olho.....	29
3.2 Retinoblastoma	31
3.3 Sistemas de liberação modificada.....	35
3.4 Etoposídeo	41
4 MATERIAL	46
4.1 Substâncias químicas de referência (SQR), amostras e polímeros	47
4.2 Reagentes e vidraria	47
4.3 Equipamentos	47
4.4 Colunas cromatográficas	48
4.5 Animais.....	48
5 MÉTODOS.....	49
5.1 Preparo dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL.....	50
5.2 Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL.....	50
5.3 Quantificação de etoposídeo em implantes de PCL.....	57
5.4 Caracterização dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL.....	57
5.5 Uniformidade de conteúdo.....	59
5.6 Processo de esterilização dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL.....	59
5.7 Avaliação <i>in vitro</i> da perda de massa dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL	60
5.8 Avaliação da absorção de água pelos implantes constituídos de etoposídeo e PCL	61
5.9 Estudo de liberação <i>in vitro</i> do etoposídeo a partir dos implantes de PCL	61
5.10 Avaliação do potencial tóxico dos implantes de PCL contendo etoposídeo empregando o teste em membrana córion-alantóide de ovo embrionado de galinha (teste HET-CAM)	61
5.11 Preparo dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA.....	63
5.12 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA	63

5.13	Quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA	68
5.14	Caracterização dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA	68
5.15	Uniformidade de conteúdo	69
5.16	Processo de esterilização dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA	70
5.17	Avaliação <i>in vitro</i> da perda de massa dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA.....	70
5.18	Avaliação da absorção de água pelos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA.....	70
5.19	Estudo de liberação <i>in vitro</i> do etoposídeo a partir dos implantes de PLGA.....	71
5.20	Avaliação do potencial tóxico dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA empregando o teste HET-CAM.....	71
5.21	Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de etoposídeo em humor vítreo.....	71
5.22	Estudo de liberação <i>in vivo</i> do etoposídeo a partir dos implantes de PLGA	78
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
6.1	Preparo dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL.....	82
6.2	Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL.....	83
6.3	Quantificação de etoposídeo em implantes de PCL.....	92
6.4	Caracterização dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL.....	92
6.5	Uniformidade de conteúdo.....	98
6.6	Resultados do processo de esterilização dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL.....	99
6.7	Avaliação <i>in vitro</i> da perda de massa, da absorção de água e perfil de liberação dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL.....	103
6.8	Avaliação do potencial tóxico dos implantes de PCL contendo etoposídeo empregando o teste HET-CAM.....	106
6.9	Preparo dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA.....	110
6.10	Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA	111
6.11	Quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA	119
6.12	Caracterização dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA	119
6.13	Uniformidade de conteúdo.....	123
6.14	Resultados do processo de esterilização dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA.....	124
6.15	Avaliação <i>in vitro</i> da perda de massa, da absorção de água e do perfil de liberação dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA.....	126

6.16 Avaliação do potencial tóxico dos implantes de PLGA contendo etoposídeo empregando o teste HET-CAM.....	129
6.17 Validação de método analítico por CLAE para quantificação de etoposídeo em humor vítreo.....	130
6.18 Estudo de liberação <i>in vivo</i> do etoposídeo a partir dos implantes de PLGA	141
7 CONCLUSÕES	147
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	150
ANEXO.....	163
Anexo A - Ofício de aprovação do projeto pela Comissão de ética no uso de animais da Funed.....	164
APÊNDICE	165
APÊNDICE A - Artigos científicos publicados e trabalhos apresentados em congresso	166

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

O retinoblastoma é um tumor maligno originário das células da retina e representa aproximadamente 11% dos tumores malignos desenvolvidos no primeiro ano de vida (KISS *et al.*, 2008). Atualmente, seu tratamento consiste em uma combinação de quimioterapia sistêmica (para redução do tumor) e terapia focal consolidativa. Nos casos mais avançados da doença, a enucleação é necessária e a quimioterapia secundária é empregada para evitar a doença metastática (DIMARAS *et al.*, 2012).

Esses tratamentos objetivam, primeiramente, salvar a vida da criança e, quando possível preservar o globo ocular e a visão. Apesar da elevada taxa de sobrevivência, sequelas decorrentes desses tratamentos têm sido documentadas, incluindo anomalias faciais (olho artificial, deformidade orbital) devido à enucleação ou à radioterapia por feixe externo, problemas de visão, risco de tumor maligno secundário (como leucemia mieloblástica aguda), perda da visão, possibilidade de tumores recorrentes e vários efeitos adversos associados à quimioterapia sistêmica (DIJK *et al.*, 2010; KISS *et al.*, 2008). Esses últimos são decorrentes do fato de que os fármacos administrados por via sistêmica apresentam dificuldade em penetrar no segmento posterior do globo ocular devido às barreiras naturais do olho, constituídas pelo epitélio e endotélio da córnea, epitélio da retina e endotélio vascular da retina. Assim, apenas uma pequena fração da dose do fármaco administrada por via intravenosa atinge o tumor e o restante da dose é distribuído aos órgãos e tecidos saudáveis, gerando efeitos indesejáveis. Considerando que o retinoblastoma atinge crianças nos primeiros anos de vida, essas sequelas e efeitos adversos apresentam impacto no estado de saúde do paciente, resultando em redução da qualidade de vida e restrições em atividades corriqueiras. Além disso, esses fatores podem afetar posteriormente o desenvolvimento da personalidade e maturidade psicossocial (ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2010; WEINBERG *et al.*, 2008).

Em vista disso, há a necessidade do desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e seguros. Os implantes intraoculares representam uma alternativa viável e vantajosa para o tratamento do retinoblastoma, uma vez que promovem a liberação do antitumoral, de forma controlada e por período prolongado, na região onde se localiza o tumor (após a barreira hematorretiniana), o que aumenta a exposição do

tumor ao fármaco e reduz a ocorrência de efeitos indesejáveis associados à administração sistêmica. Além disso, a manutenção local de níveis terapêuticos, por um tempo prolongado, otimiza o regime quimioterápico, reduzindo o número de doses a serem administradas (WEINBERG *et al.*, 2008).

Os implantes intraoculares podem ser preparados a partir de polímeros reconhecidamente biocompatíveis e biodegradáveis, como a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e o ácido poli(*D,L*-lático-co-glicólico) (PLGA). Esses implantes são vantajosos por não ser necessária a remoção cirúrgica após a liberação total do fármaco, pois o polímero será completamente absorvido pelo organismo (THRIMAWITHANA *et al.*, 2011). Além disso, esses sistemas são capazes de proteger os princípios ativos instáveis nas condições fisiológicas, tal como o etoposídeo, fármaco preconizado para a quimioterapia sistêmica do retinoblastoma. Este antitumoral é um derivado semi-sintético da podofilotoxina, inibidor da enzima topoisomerase II e instável em meios ácido (hidrolisado em sua aglicona) e alcalino (isomerizado a *cis*-etoposídeo) (HANDE, 2008).

Por ser pouco solúvel em água, o etoposídeo é comercializado sob a forma de solução não aquosa (etanol, álcool benzílico, polissorbato 80 e polietilenoglicol) parenteral para administração intravenosa e cápsulas moles de gelatina. Ambas as formas farmacêuticas apresentam desvantagens, sendo que em relação à preparação parenteral, existem relatos da precipitação do antitumoral no momento da diluição em fluidos para infusão (REIF *et al.*, 2001). Além disso, a estabilidade da solução diluída do medicamento é restrita, variando entre 5 a 72 horas dependendo da concentração do fármaco (HANDE, 1998). A administração oral de cápsulas, contendo uma solução de etoposídeo em um sistema misto de solventes, apresenta biodisponibilidade baixa (em torno de 50%) e variável. Fato justificado, em parte, pela inativação do fármaco nos fluidos gastrintestinais (REIF, 2002).

Considerando os problemas descritos anteriormente, os implantes poliméricos representam um sistema adequado para a incorporação do etoposídeo, pois esta forma farmacêutica protegeria o fármaco de fluidos ácido ou alcalino do organismo, evitando sua degradação. Além disso, esses implantes poderiam ser inseridos na cavidade vítrea, o que aumentaria a disponibilidade do antitumoral nas proximidades do tumor da retina. E por fim, esses sistemas poderiam promover a liberação prolongada do etoposídeo, dispensando repetidas sessões de altas doses de quimioterápicos.

Atualmente, no mercado farmacêutico, os implantes poliméricos são utilizados no tratamento de glioma maligno (Gliadel[®] Wafer), câncer de próstata (Vantas[®]) e de doenças inflamatórias do segmento posterior do globo ocular (Retisert[®], Ocusert[®], Ozurdex[™]) (KUNO; FUJII, 2010). Porém, não existem implantes intraoculares poliméricos contendo fármacos antitumorais aprovados e disponíveis para os pacientes.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver implantes de PCL contendo etoposídeo e de PLGA incorporado de etoposídeo destinados à liberação prolongada de fármaco no segmento posterior do olho, visando a futura aplicação no tratamento de retinoblastoma.

2.2 Objetivos específicos

- desenvolver e caracterizar os implantes poliméricos contendo etoposídeo;
- avaliar o perfil de liberação *in vitro* e *in vivo* do fármaco a partir dos implantes;
- avaliar o potencial tóxico dos sistemas desenvolvidos;
- desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação de etoposídeo nas formulações desenvolvidas e no humor vítreo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



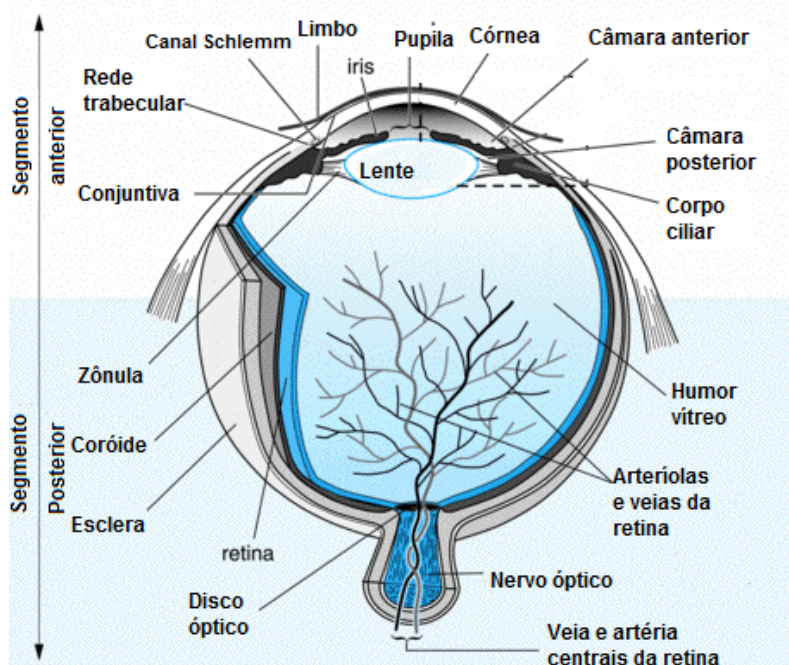
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Anatomia do olho

O olho é um dos órgãos mais complexos do corpo humano. Anatomicamente, o bulbo ocular é dividido em segmentos anterior e posterior. O segmento anterior é constituído pela córnea, câmara anterior, íris, câmara posterior, corpo ciliar e cristalino, sendo preenchido pelo humor aquoso. O segmento posterior compreende o corpo vítreo, a retina, a coróide, o nervo óptico e a esclera (MOROI; LICHTER, 2010; YASUKAWA *et al.*, 2005).

Neste órgão, três túnicas concêntricas podem ser distinguidas: a túnica mais externa (fibrosa) constituída pela córnea e esclera; a camada média (úvea) composta pela íris, corpo ciliar e coróide; e a camada interna, também conhecida como sensorial, constituída pela retina (Figura 1) (WILLOUGHBY *et al.*, 2010).

Figura 1 - Esquema ilustrativo da estrutura do olho



Fonte: Adaptado de Moroi e Lichter (2010).

A esclera constitui a parte posterior opaca da túnica fibrosa e envolve externamente o bulbo do olho. Ela é constituída de tecido fibroso e elástico, e

confere a coloração branca ao olho. A córnea é uma estrutura transparente que refrata a luz antes que esta atinja a pupila. Ela é constituída por um tipo especial de tecido conjuntivo denso, cujas células epiteliais formam junções intercelulares localizadas na sua superfície apical. Estas junções funcionam como barreiras à difusão dos fármacos administrados no segmento anterior do olho. A junção da córnea e esclera é denominada limbo (WILLOUGHBY et al., 2010).

A coróide, tecido que reveste a esclera desde o nervo óptico até o limbo, é responsável pela nutrição da retina e pela coloração vermelha do fundo do olho, por ser uma estrutura extremamente vascularizada. O espessamento da coróide forma o corpo ciliar, cujas porções anterior e posterior são denominadas, respectivamente, *pars plicata* e *pars plana*. O corpo ciliar é responsável pela secreção de humor aquoso (pelos processos ciliares) e pela acomodação da íris através do músculo ciliar. O humor aquoso é um líquido aquoso e transparente, responsável pela nutrição da córnea. Além disso, este líquido apresenta propriedades de refração e desempenha importante papel na manutenção da pressão intraocular (MOROI; LICHTER, 2010).

A íris encontra-se suspensa entre a córnea e o cristalino, e apresenta um orifício central, a pupila, por onde a luz penetra até a parte posterior do olho. O cristalino é uma lente biconvexa que orienta a passagem da luz até a retina (WILLOUGHBY et al., 2010).

O humor vítreo consiste em uma substância gelatinosa e viscoelástica que preenche a cavidade vítrea, ocupando 80% do volume do olho. É altamente hidratado, contendo cerca de 98% de água. Seus componentes estruturais são as fibras de colágeno do tipo II e o ácido hialurônico, que correspondem a menos de 1% do seu volume total. Além desses constituintes, glicose, ácido ascórbico, aminoácidos, sais inorgânicos, ácido láctico e proteoglicanas fazem parte da composição do humor vítreo. O corpo vítreo está em contato direto com a retina, corpo ciliar e porção posterior da lente. É essencialmente acelular, mas células isoladas podem ser encontradas no córtex (região mais periférica do vítreo), próximo ao nervo óptico e vasos retinianos (MOROI; LICHTER, 2010; STAY et al., 2003). O volume de humor vítreo em olhos humanos é aproximadamente 4 mL, enquanto que em coelhos é em torno de 1,5 mL (FRIEDRICH et al., 2003).

A retina é a estrutura ocular responsável pela captação dos estímulos luminosos. Funcionalmente, ela é constituída de duas partes: a neuroretina ou retina

sensorial e a camada de células do epitélio pigmentar da retina (RPE). O RPE juntamente com os vasos da retina formam a barreira hematorretiniana, que dificulta a entrada de substâncias da circulação sanguínea para a retina. As células do RPE são unidas por meio das zônulas de oclusão, zônulas de aderência e desmossomas. Já os vasos retinianos são caracterizados por células endoteliais contínuas, não fenestradas, apresentando também as junções intercelulares. Essas junções, tanto do RPE quanto das células endoteliais, dificultam a difusão passiva de substâncias da circulação coroidiana à retina neurosensorial (WILLOUGHBY et al., 2010).

3.2 Retinoblastoma

3.2.1 Aspectos gerais

O retinoblastoma é o tumor maligno originário da retina em desenvolvimento. É o tumor primário intraocular mais comum em crianças e representa, aproximadamente, 4% de todos os casos de tumores malignos pediátricos (KISS *et al.*, 2008; MELL *et al.*, 2012). A maioria dos casos, mais de 80%, atinge crianças com menos de três anos de idade (SOSNIK; CARCABOSO, 2014).

A incidência de retinoblastoma em todo o mundo é de um caso em 15000 a 20000 nascidos vivos, o que corresponde a cerca de 9000 novos casos todo ano. As maiores taxas de incidência da doença foram relatadas em países em desenvolvimento (DIMARAS *et al.*, 2012), sendo que no Brasil a incidência em crianças de 0 a 4 anos foi superior a 11 casos por um milhão (CAMARGO *et al.*, 2010).

As regiões com maior prevalência da doença apresentam elevada mortalidade. Na África e Ásia, cerca de 40 a 70% das crianças com retinoblastoma morrem, em comparação com 3 a 5% na Europa, Canadá e Estados Unidos da América (EUA). No Brasil, a mortalidade é de 5 a 22% (DIMARAS *et al.*, 2012).

A base genética para o desenvolvimento do retinoblastoma foi reconhecida há mais de setenta anos atrás. O gene retinoblastoma (RB) foi o primeiro gene de câncer humano clonado, sendo o primeiro de uma nova classe de genes humanos

supressores de tumor (PARULEKAR, 2010). O RB é um gene supressor recessivo, portanto, o retinoblastoma somente é desenvolvido quando ambos os alelos são inativados. O RB está localizado no braço mais longo do cromossomo 13 (13q) e codifica uma fosfoproteína nuclear fundamental para a diferenciação terminal de linhagens celulares, incluindo a diferenciação de células progenitoras da retina (KISS *et al.*, 2008).

As manifestações clínicas do retinoblastoma variam com o estágio da doença ao diagnóstico. A leucocoria (reflexo pupilar anormal à luz incidente, podendo apresentar-se como branco, róseo ou amarelo esbranquiçado) é o sinal mais comum presente em pacientes com retinoblastoma, ocorrendo em 60% dos casos. A leucocoria é um sinal tardio, apresentando pior prognóstico para a preservação do globo ocular, mas ainda assim, tem-se uma boa taxa de sobrevivência (cerca de 88%). Estrabismo é o segundo sinal mais comum, estando associado à alta taxa de sobrevivência e elevada possibilidade de preservação do globo ocular. Os demais sinais e sintomas são atípicos, como vermelhidão, dor ocular causada por glaucoma secundário, córnea turva, visão deficiente, hemorragia vítrea ou sinais inflamatórios na órbita que mimetizam celulite orbital. Geralmente, esses sinais são tardios e estão associados ao estágio avançado da doença, à baixa taxa de sobrevivência e preservação do globo ocular (BALMER *et al.*, 2009; DIMARAS *et al.*, 2012).

O diagnóstico em uma criança com suspeita de retinoblastoma é realizado por meio de um histórico detalhado, avaliação física, exame ocular externo, biomicroscopia e oftalmoscopia indireta com indentação escleral. Esses exames são realizados a fim de determinar com precisão o número e a localização de todos os tumores. A confirmação por biópsia é raramente necessária. Exames auxiliares podem ser úteis na confirmação do diagnóstico, como o emprego da ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética (BALMER *et al.*, 2009; PARULEKAR, 2010). Em países desenvolvidos, o diagnóstico do retinoblastoma é realizado precocemente, portanto, a patologia raramente é uma condição de risco de morte. No entanto, em países em desenvolvimento, o diagnóstico clínico é feito em estágio avançado e a taxa de mortalidade permanece alta (AREÁN *et al.*, 2010).

3.2.2 Tratamento

O tratamento do retinoblastoma é complexo e requer uma equipe multidisciplinar capacitada para o atendimento ao paciente em todas as etapas do processo. Os objetivos do tratamento são salvar a vida da criança e, secundariamente, preservar o globo ocular e a visão. Existem diferentes modalidades terapêuticas que devem ser propostas individualmente de acordo com o caso. Devem-se sempre considerar fatores locais e sistêmicos na escolha do tratamento, como tamanho e localização do tumor intraocular, comprometimento extraocular, lateralidade, prognóstico visual, condições clínicas do paciente, presença de doença disseminada, entre outros (DIMARAS *et al.*, 2012; KISS *et al.*, 2008).

Os tratamentos atuais para retinoblastoma intraocular incluem enucleação, radioterapia externa, crioterapia, fotocoagulação com laser, termoterapia, braquiterapia com placas de iodo 125 ou rutênio 106, e quimioterapia (KISS *et al.*, 2008).

A enucleação ou remoção do olho deve ser realizada como tratamento primário em olhos com tumores intraoculares avançados que apresentam alterações anatômicas e funcionais. A utilização da enucleação como tratamento secundário ocorre quando não existe resposta ao tratamento primário proposto. Ao longo das últimas décadas, o tratamento por enucleação tem reduzido progressivamente. No entanto, em países em desenvolvimento, aproximadamente 75% dos casos de retinoblastoma unilateral ainda são tratados por enucleação. Após a enucleação, um implante orbital é colocado para preservar a aparência natural da órbita ocular (RAY *et al.*, 2012).

A radioterapia por feixe externo tem sido cada vez menos utilizada, principalmente devido aos efeitos indesejados decorrentes de sua aplicação, como a recorrência do tumor, deformidades e alta incidência do desenvolvimento de um segundo tumor. É indicada em casos específicos, especialmente em olhos com disseminação celular para a cavidade vítrea e/ou espaço sub-retiniano, que não foram controlados com quimioterapia prévia (PARULEKAR, 2010; RAY *et al.*, 2012).

A braquiterapia envolve a inserção de um implante radioativo (placa) adjacente a base do tumor, geralmente, na esclera. Esse sistema apresenta como

vantagens em relação à radioterapia por feixe externo, o fato de ser um tratamento focal de curta duração, o que reduz os danos causados ao tecido circundante (RAY *et al.*, 2012).

A termoterapia consiste na aplicação de calor diretamente ao tumor, geralmente, sob a forma de radiação infravermelha. Enquanto na crioterapia, há o congelamento rápido do tecido tumoral, resultando em danos ao endotélio vascular com trombose secundária e infarto do tecido. A fotocoagulação a laser implica no emprego de um laser de argônio ou um arco de xenônio com o objetivo de promover a coagulação de todo o fornecimento de sangue para o tumor. Essas três formas de tratamento são utilizadas no caso de tumores menores que 3,5 mm (MEEL *et al.*, 2012; RAY *et al.*, 2012).

A quimioterapia tem sido utilizada no tratamento do retinoblastoma intraocular desde o início da década de 90, com o objetivo de reduzir o tamanho do tumor para permitir o emprego de terapias focais adjuvantes. Nos casos em que há a enucleação do globo ocular, a quimioterapia secundária deve ser considerada para evitar a doença metastática. Os fármacos, o número e a frequência dos ciclos de quimioterapia variam entre as instituições. Os quimioterápicos mais comumente utilizados são carboplatina, etoposídeo ou teniposídeo e vincristina, mais raramente ciclofosfamida, ifosfamida, doxorrubicina ou melfalano (BALMER *et al.*, 2009).

Embora a quimioterapia sistêmica promova a redução do tamanho dos tumores, em média de 50% em volume após três sessões, segundo ABRASON *et al.* (2010), existem algumas desvantagens neste tratamento. Os fármacos administrados por via sistêmica apresentam dificuldade em penetrar no segmento posterior do globo ocular devido à barreira hematorretiniana. Assim, apenas uma pequena fração da dose do fármaco administrada por via intravenosa atinge o tumor e o restante da dose é distribuído aos órgãos e tecidos saudáveis, gerando efeitos indesejáveis como alopecia, mielossupressão, episódios febris, infecções posteriores, toxicidade gastrointestinal, nefrotoxicidade e cardiomiopatia. Além disso, a rápida eliminação de alguns antitumorais leva a curtos períodos de exposição ao tumor, e desta forma, altas doses de fármaco são requeridas para obtenção do efeito terapêutico (DIMARAS *et al.*, 2012; MELL *et al.*, 2012; WEINBERG *et al.*, 2008).

Em vista disso, novas estratégias para a terapia do retinoblastoma têm sido estudadas com o objetivo de reduzir os efeitos indesejáveis sistêmicos. A

quimioterapia intra-arterial é um dos tratamentos alternativos que tem sido avaliado. Essa estratégia consiste na administração de fármacos citotóxicos por meio de um cateter introduzido na artéria carótida ou diretamente na artéria oftálmica (PARAREDA *et al.*, 2014). Estudos clínicos de fase I e II demonstraram resultados promissores após a administração de melfalano diretamente na artéria oftálmica (MEEL *et al.*, 2012). Jabbour e colaboradores (2012) verificaram completa redução do tumor em 88% dos pacientes tratados com melfalano intra-arterial.

A administração subconjuntival de carboplatina é outro tratamento que parece ser promissor. No entanto, essa alternativa está associada com efeitos adversos graves, incluindo mudanças de mobilidade ocular, necrose de gordura orbital e necrose isquêmica com atrofia do nervo óptico resultando em cegueira (MEEL *et al.*, 2012; RAY *et al.*, 2012). Devido à relação desses efeitos indesejáveis com a dispersão rápida da solução aquosa de carboplatina, estudos estão sendo realizados para avaliar a administração subconjuntival deste antitumoral em selante de fibrina (adesivo cirúrgico biodegradável), que promoveria a liberação sustentada do fármaco. Nesta mesma linha, Mallipatna e colaboradores (2011) avaliaram a administração de cloridrato de topotecan em selante de fibrina para o controle de retinoblastoma intraocular e observaram a redução de tumores pequenos e a ausência de efeitos tóxicos hematológicos.

A administração intravítrea de agentes quimioterápicos para o retinoblastoma também tem sido investigada. Contudo, o risco de toxicidade na retina, a necessidade de injeções repetidas para manter os níveis de fármaco dentro da faixa terapêutica e a possibilidade de disseminação extraocular de células tumorais limitam o uso dessa modalidade de tratamento (BUIRAGO *et al.*, 2013; DIMARAS *et al.*, 2012).

3.3 Sistemas de liberação modificada

Os sistemas de liberação modificada são aqueles que disponibilizam o fármaco de forma diferente do perfil de liberação convencional. Dentre as diferentes definições de sistemas de liberação modificada, a liberação do fármaco pode ocorrer de forma prolongada, sustentada ou controlada. No caso da liberação controlada, o fármaco é liberado em velocidade constante e as concentrações plasmáticas

permanecem invariáveis com o tempo. Na liberação sustentada, a liberação inicial do fármaco é suficiente para proporcionar uma dose terapêutica logo após a administração, e então, a liberação se torna gradual por longo período. Em sistemas de liberação prolongada, o princípio ativo é liberado por um período de tempo maior quando comparado aos sistemas convencionais (AULTON, 2005).

Esses sistemas têm sido extensivamente estudados para a aplicação no tratamento de doenças oculares do segmento posterior. Dentre eles estão inclusos as micro/nanopartículas, micro/nanoemulsões, lipossomas, ciclodextrinas, dendrímeros, implantes e outros (ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2010).

3.3.1 Os implantes intraoculares

Os implantes intraoculares são sistemas de liberação modificada de fármacos que podem ser preparados a partir de diferentes polímeros reconhecidamente biocompatíveis. Esses sistemas poliméricos podem ser implantados em diferentes regiões do olho: no interior do bulbo ocular (câmara anterior e corpo vítreo); na esclera; na região subconjuntival e na região subtenoniana (KIMURA; OGURA, 2001; THRIMAWITHANA *et al.*, 2011).

Os implantes intraoculares representam sistemas inovadores e eficazes no tratamento de diversas doenças oculares, uma vez que: podem propiciar a liberação controlada de doses do fármaco, permitindo a manutenção de níveis terapêuticos eficazes, por um período de tempo prolongado; promovem a liberação do fármaco diretamente no local de ação, evitando os efeitos indesejáveis sistêmicos provocados pelos mesmos fármacos que são administrados por via enteral ou parenteral; são capazes de proteger os princípios ativos instáveis nas condições fisiológicas e que são rapidamente eliminados pelo organismo; e propiciam maior conforto para o paciente e redução do número de doses a serem administradas (ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2010; THRIMAWITHANA *et al.*, 2011)

Esses sistemas podem ser preparados a partir de diferentes polímeros: biodegradáveis ou não. Os implantes não biodegradáveis apresentam uma taxa de liberação relativamente constante, porém precisam ser removidos posteriormente por processos cirúrgicos. Os polímeros não biodegradáveis mais comumente usados

são os derivados de celulose, silicones, polímeros acrílicos, polivinilpirrolidona e copolímeros dos óxidos de etileno e propileno (FIALHO *et al.*, 2003).

Os polímeros biodegradáveis são totalmente absorvidos pelo organismo, não necessitando remoção subsequente, o que proporciona melhor aceitação e adesão do paciente ao tratamento. No entanto, um maior número de variáveis deve ser avaliado e controlado durante o processo de desenvolvimento de sistemas biodegradáveis, uma vez que a cinética de degradação do polímero *in vivo* deve-se manter constante para que seja obtida uma liberação controlada do fármaco (FIALHO *et al.*, 2003). Existe uma variedade de polímeros biodegradáveis que pode ser empregada no preparo dos implantes, dentre eles, os poliésteres, como PCL, poli(lático) e copolímeros PLGA (ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2010).

Os implantes podem ser de dois tipos: matriciais (ou monolíticos) e reservatórios. No sistema matricial, o fármaco se encontra homogeneamente disperso na matriz polimérica ou adsorvido na superfície, e a sua liberação ocorre por difusão pelos poros da matriz, por degradação do polímero ou por uma combinação dos dois mecanismos. Caso a velocidade de degradação do polímero seja inferior à difusão do fármaco pela matriz, a liberação inicial desse é dependente de sua difusão pelo sistema, podendo diferir se ele estiver dissolvido molecularmente ou disperso no polímero. Quando se utilizam polímeros não-biodegradáveis, a liberação ocorre apenas por um processo de difusão lenta pela matriz. No sistema do tipo reservatório, o fármaco se encontra em uma cavidade central envolta por uma membrana polimérica, a qual controla sua taxa de liberação. Mudanças na natureza e espessura dessa membrana promovem alterações na velocidade de liberação dos fármacos. Da mesma maneira que no tipo matricial, no sistema reservatório composto por polímeros não biodegradáveis a liberação ocorre apenas por difusão através da membrana (ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2010).

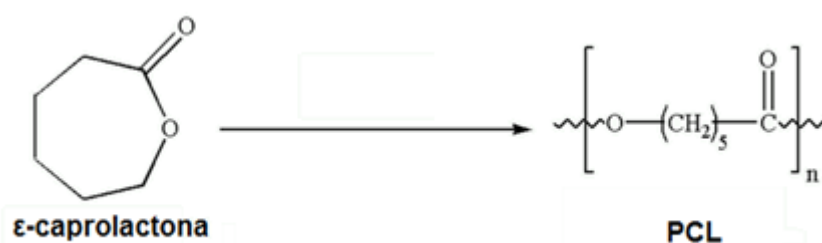
3.3.2 Os polímeros biodegradáveis

Polímeros sintéticos e naturais podem ser utilizados na formulação de implantes. Os polímeros sintéticos apresentam a vantagem de manter a liberação do fármaco por um período mais longo em comparação com polímeros naturais, que em geral, tem uma liberação relativamente curta (FIALHO *et al.*, 2007).

3.3.2.1 Poli(ϵ -caprolactona)

A PCL é um polímero sintético, biodegradável, biocompatível e aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA). É um poliéster alifático, sintetizado a elevada temperatura pela abertura do anel de monômeros de ϵ -caprolactona (Figura 2) (DASH; KONKIMALLA, 2012).

Figura 2 - Síntese de PCL a partir de ϵ -caprolactona



Fonte: Adaptado de Middleton e Tipton (2000).

A PCL é um polímero hidrofóbico e semicristalino, que possui baixo ponto de fusão (59 - 64 °C) e temperatura de transição vítrea de -60 °C (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). É compatível com muitos fármacos, sendo que aqueles de natureza lipofílica, geralmente, se encontram distribuídos uniformemente na matriz. Já os fármacos hidrofílicos tendem a permanecer associados à superfície do polímero (DASH; KONKIMALLA, 2012).

A degradação da matriz de um poliéster, como a PCL, envolve os fenômenos de clivagem das ligações éster, a redução de peso molecular decorrente da produção de oligômeros e a perda de massa (erosão) devido à produção de fragmentos de baixo peso molecular capazes de difundir através matriz do polímero para o meio. Uma etapa limitante da velocidade de degradação polimérica é a permeabilidade da formulação à água (DASH; KONKIMALLA, 2012).

O tempo de degradação total da PCL varia entre dois a quatro anos, dependendo do peso molecular do polímero. No organismo, esse processo, possivelmente, ocorre em duas fases, sendo que, inicialmente, tem-se a hidrólise não enzimática da ligação éster, produzindo pequenos fragmentos poliméricos

neutros. Esses fragmentos, então, sofrem degradação intracelular após serem fagocitados por macrófagos (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

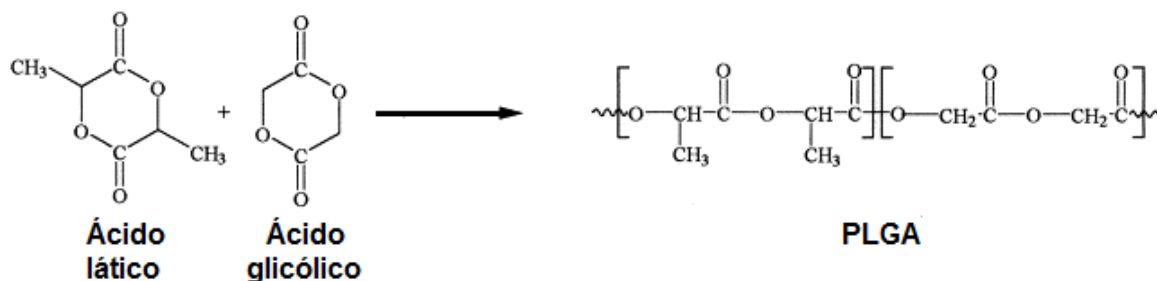
Alguns estudos relatam o emprego da PCL no desenvolvimento de implantes intraoculares. Silva-Cunha e colaboradores (2009) utilizaram a PCL no desenvolvimento de implantes, contendo acetato de dexametasona, destinados ao tratamento de doenças retinianas. Em estudo *in vivo*, esses sistemas foram capazes de promover a liberação prolongada e controlada do fármaco em olhos de coelho, sendo que a concentração intravítrea do antiinflamatório permaneceu dentro da faixa terapêutica por 55 semanas.

Carcaboso *et al.* (2010) desenvolveram implantes constituídos por PCL e topotecan destinados ao tratamento do retinoblastoma. Esses sistemas foram inseridos na episclera (camada mais externa da esclera) de olhos de coelhos, sendo, então, verificados o acúmulo do fármaco em tecidos locais (como esclera, retina e coróide) e concentrações mínimas no plasma e nos olhos contralaterais durante o período de avaliação (48 horas).

3.3.2.2 Ácido poli(D,L-lático-co-glicólico)

O PLGA, polímero biodegradável aprovado pelo FDA, é sintetizado por uma reação de condensação (Figura 3), por meio da abertura do anel dos dímeros cíclicos do ácido lático e do ácido glicólico (FIALHO *et al.*, 2003).

Figura 3 - Síntese do PLGA



Fonte: Adaptado de Middleton e Tipton (2000).

A degradação desse copolímero ocorre por meio da clivagem aleatória da cadeia polimérica devido à hidrólise das ligações éster, que produz oligômeros e

monômeros, cujos grupos carboxílicos terminais são capazes de catalisar a reação hidrolítica do polímero (JAIN, 2000; MAKADIA; SIEGEL, 2011).

Um mecanismo trifásico tem sido proposto para a degradação do PLGA: inicialmente, ocorre a quebra aleatória da cadeia polimérica que promove uma redução inicial do peso molecular, porém sem perda de massa apreciável. Na etapa intermediária, a diminuição do peso molecular é acompanhada pela rápida perda de massa e formação de produtos monoméricos e oligoméricos solúveis. Por fim, os oligômeros são degradados a monômeros solúveis, levando à completa solubilização do polímero. No organismo, os produtos de degradação, ácido lático e ácido glicólico, são eliminados pelo ciclo de Krebs na forma de gás carbônico e água (FIALHO et al., 2003; JAIN, 2000).

A hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade desse copolímero são determinadas pela proporção de ácidos lático e glicólico na sua constituição. A presença do grupo metila no polímero derivado do ácido lático confere a este uma maior hidrofobicidade quando comparado ao polímero derivado do ácido glicólico. Desta forma, quanto maior a proporção de ácido lático no copolímero PLGA, maior será a sua hidrofobicidade, e conseqüentemente, menor será a sua velocidade de degradação devido à menor absorção de água pela cadeia polimérica (FIALHO *et al.*, 2003; MAKADIA; SIEGEL, 2011).

O copolímero PLGA na proporção 75:25, constituído por 75% de polímero de ácido glicólico e 25% de ácido lático, apresenta transição vítrea na temperatura de 60°C, estado amorfo e degradação em um período de dois a cinco meses. No entanto, os valores de transição vítrea e degradabilidade podem variar, uma vez que estes dependem do processamento a que o material foi submetido (MAKADIA; SIEGEL, 2011).

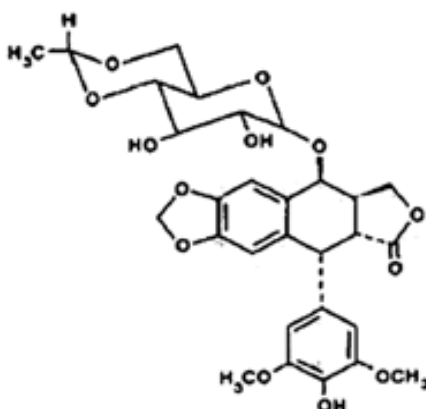
O PLGA é utilizado na obtenção de implantes, como o OzurdexTM (Allergan), um sistema constituído por PLGA e dexametasona. Este dispositivo foi aprovado pelo FDA e já está disponível para comercialização. O OzurdexTM é um implante intravítreo destinado ao tratamento de edema macular e de uveíte não infecciosa (KUNO; FUJII, 2010). Apesar de vários estudos descreverem a utilização do PLGA no desenvolvimento de implantes (FIALHO *et al.*, 2006; SALIBA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2014), não foram encontrados na literatura relatos sobre o desenvolvimento de implantes de PLGA destinados ao tratamento do retinoblastoma.

3.4 Etoposídeo

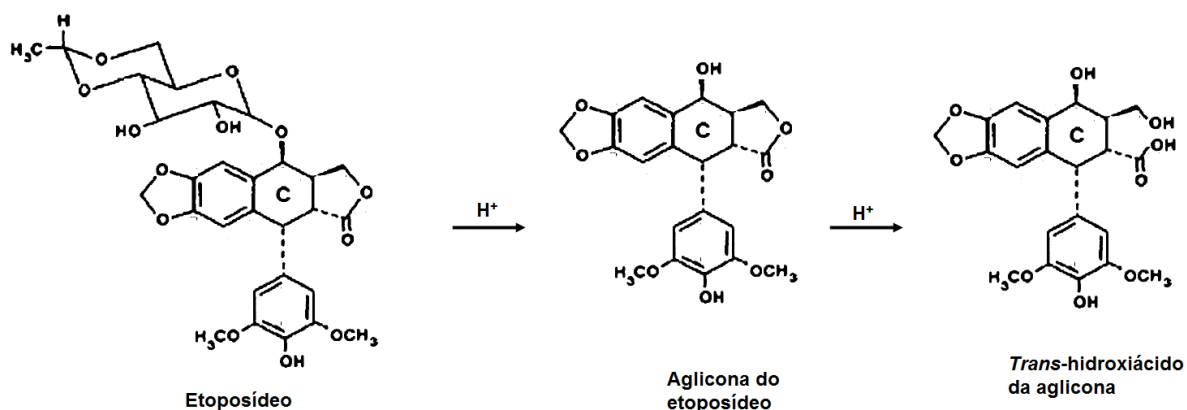
3.4.1 Propriedades físico-químicas

O etoposídeo ($C_{29}H_{32}O_{13}$) (Figura 4) é um derivado semi-sintético da podofilotoxina (extraída da espécie *Podophyllum peltatum*). Possui massa molecular de 588,6 g/mol. É um pó branco a quase branco, praticamente insolúvel em água, ligeiramente solúvel em metanol e pouco solúvel em etanol (BRITISH..., 2012; INTERNATIONAL..., 2006).

Figura 4 - Estrutura química do etoposídeo

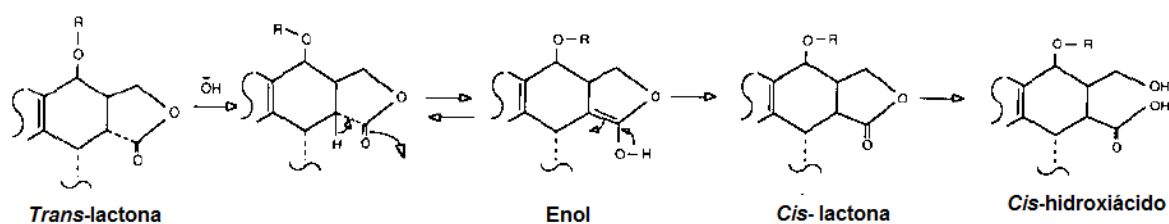


De acordo com Chow e Shah (1987), o etoposídeo é extensivamente degradado em meios cujo pH é menor que 2 e maior que 8. Em meio ácido, o etoposídeo sofre degradação hidrolítica com formação de sua aglicona devido à perda do grupo glicopiranosil. A reação de degradação consecutiva envolve a hidrólise da ligação éster do anel lactona, formando o trans-hidróxiácido de 4'-dimetilepipodofilotoxina (Figura 5) (BEIJNEN *et al.*, 1988).

Figura 5 - Esquema de degradação do etoposídeo em meio ácido

Fonte: Adaptado de Beijnen *et al.* (1988).

Em meio alcalino, o *trans*-etoposídeo epimeriza em *cis*-etoposídeo, também conhecido como picroetoposídeo. Segundo Beijnen *et al.* (1988), inicialmente, ocorre a formação do enolato do *trans*-etoposídeo, para então, obter o picroetoposídeo. Em seguida, tem-se a abertura do anel lactona para a formação do *cis*-picro-hidroxiácido, que é convertido novamente a picroetoposídeo em meio ácido (Figura 6).

Figura 6 - Esquema de degradação do etoposídeo em meio alcalino

Fonte: Adaptado de Beijnen *et al.* (1988).

O picroetoposídeo pode ser seletivamente produzido em pH 9 e o hidróxiácido em pH 12 (MAANEN *et al.*, 1988). Evans e colaboradores (1982) verificaram que o picroetoposídeo é menos potente (cem vezes) que o etoposídeo contra uma linhagem de células de leucemia humana (CCRF-CEM). Já o hidróxiácido não apresentou atividade citotóxica, na faixa de concentração de 0,1 a 10 $\mu\text{g/mL}$.

O etoposídeo sofre degradação quando em contato com peróxido de hidrogênio (20%) a 80 °C por trinta minutos. Nestas condições, dois produtos foram detectados e a extensão da degradação foi de 84,97% (AKHTAR *et al.*, 2013).

3.4.2 Mecanismo de ação e efeitos adversos

O etoposídeo é um fármaco citotóxico amplamente utilizado no tratamento quimioterápico de várias neoplasias, incluindo leucemia, câncer de pulmão, tumores de testículos, doença de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, tumor gástrico, câncer de ovário e retinoblastoma (HANDE, 2008).

Esse antitumoral age, principalmente, como um inibidor da enzima topoisomerase II, sendo que essa atividade é dependente do ciclo celular (as células são mais sensíveis nas fases S e G2 do ciclo celular) e do tempo de inibição da enzima. Este fármaco interage, de forma reversível, com a topoisomerase II, formando um complexo ternário (etoposídeo/topoisomerase II/DNA) que induz quebras no DNA de fita dupla e impede o reparo que seria realizado pela topoisomerase II. As quebras acumuladas no DNA impedem a entrada da célula na fase mitótica e leva à morte celular via a ativação do sistema apoptótico (HANDE, 2008; MONTECUCCO; BIAMONTI, 2007; TOFFOLI *et al.*, 2004).

Como a inibição enzimática é reversível, pode ocorrer a dissociação do complexo ternário, o que permitiria a reparação do DNA e, conseqüentemente, reduziria a atividade citotóxica do etoposídeo. Desta forma, a exposição prolongada ao antitumoral parece resultar em aumento da citotoxicidade do etoposídeo, visto que promoveria a inibição enzimática por um período mais longo (CICCOLINI *et al.*, 2002).

A leucopenia e trombocitopenia são alguns efeitos adversos menos freqüentes associados ao uso desse fármaco. Vômitos, náuseas, estomatite e diarreia ocorrem em aproximadamente 15% dos pacientes tratados por via intravenosa e em cerca de 55% dos pacientes que recebem o medicamento por via oral. Alopecia é comum, mas reversível. Febre, flebite, dermatite e reações alérgicas, incluindo anafilaxia têm sido observadas. A toxicidade hepática é particularmente evidente após o tratamento com doses elevadas (CHABNER *et al.*, 2007).

3.4.3 Especialidades farmacêuticas

Por ser pouco solúvel em água, o etoposídeo é comercializado sob a forma de solução não aquosa parenteral para administração intravenosa e de cápsulas moles de gelatina. Ambas as formas farmacêuticas apresentam desvantagens, sendo que em relação à preparação parenteral, existem relatos da precipitação do antitumoral no momento da diluição em fluidos para infusão. Além disso, casos de hipotensão decorrentes da infusão rápida do medicamento e de reações de hipersensibilidade relacionadas aos excipientes da formulação (etanol, álcool benzílico, polissorbato 80 e polietilenoglicol) (REIF *et al.*, 2001) também foram relatados. Outro parâmetro importante é a estabilidade da solução diluída a ser administrada, que varia entre 5 a 72 horas dependendo da concentração do fármaco (HANDE, 1998).

A administração oral de cápsulas, contendo uma solução de etoposídeo em um sistema misto de solventes apolares, apresenta biodisponibilidade baixa e variável (em torno de 50%). Fato justificado, em parte, pela inativação do fármaco no fluido gastrointestinal (REIF *et al.*, 2002).

3.4.4 Sistemas de liberação modificada contendo etoposídeo

Na literatura são encontrados vários estudos descrevendo o desenvolvimento de diferentes sistemas de liberação modificada contendo etoposídeo, como: nanopartículas poliméricas (MITRA *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2010; YADAV; SAWANT, 2010), lipossomas (PARMAR *et al.*, 2011), implantes (UPPAL *et al.*, 1994) e outros. A maioria desses sistemas tinha como objetivo o tratamento de tumores como: glioma (CALLEWAERT *et al.*, 2013), leucemia (YADAV; SAWANT, 2010) e câncer de pulmão (PARMAR *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2010). No entanto, poucas formulações foram destinadas ao tratamento de doenças oculares, como retinoblastoma.

Mitra e colaboradores (2011) desenvolveram nanopartículas constituídas por PLGA e etoposídeo destinadas à aplicação no tratamento do retinoblastoma. Neste estudo, as nanopartículas promoveram a liberação do etoposídeo por período prolongado (seis semanas). Além disso, essas nanopartículas apresentaram elevada

atividade citotóxica contra linhagem de células humanas de retinoblastoma (Y79), sendo em torno de cem vezes mais ativas que o etoposídeo puro.

O copolímero de 1,3-bis(p-carboxifenoxi)propano e ácido sebácico foi utilizado na elaboração de implantes de etoposídeo, os quais foram inseridos no espaço subconjuntival de olhos de coelhos para avaliação farmacocinética. Neste estudo, os implantes poliméricos foram destinados à inibição da fase proliferativa do processo de cicatrização da cirurgia filtrante antiglaucomatosa. Desta forma, antes da implantação dos dispositivos poliméricos no olho, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Foi verificado que a concentração de etoposídeo nos tecidos oculares adjacentes ao local da cirurgia permaneceu dentro do intervalo terapêutico para inibição da proliferação dos fibroblastos (UPPAL *et al.*, 1994).

Em vista do exposto, este trabalho propõe o desenvolvimento de implantes biodegradáveis contendo etoposídeo destinados à futura aplicação no tratamento de retinoblastoma.

MATERIAL

4 MATERIAL

4.1 Substâncias químicas de referência (SQR), amostras e polímeros

- etoposídeo SQR (USP, EUA), lote: H1K394, teor: 99,7%.
- etoposídeo matéria-prima (Quiral Química, Brasil), teor: 97,98%;
- PCL MM 14000 daltons (Sigma-Aldrich, EUA);
- PLGA na proporção de 75:25 (Boehring Ingelheim, Alemanha).

4.2 Reagentes e vidraria

- acetonitrila grau cromatográfico;
- água destilada e água deionizada em sistema Milli-Q®;
- pipetas, buretas e balões volumétricos calibrados;
- béqueres, tubos com rosca, e kit de filtração;
- reagentes grau analítico: ácido acético, cloreto de sódio, fosfato de potássio monobásico anidro, fosfato de sódio bibásico anidro, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, acetato de sódio, citrato de sódio, hidróxido de sódio.

4.3 Equipamentos

- agitador magnético com aquecimento Thelga TMA20CF;
- analisador termogravimétrico Mettler Toledo TGA/SDTA851e;
- aparelho de ultra-som Branson 220;
- balança analítica Sartorius BP210D com precisão de 0,01 mg;
- calorímetro Mettler Toledo DSC822e;
- cromatógrafo a líquido de alta eficiência Thermo Surveyor System, com forno, bomba quartenária, injeção automática, detector de arranjo de diodos (DAD) e software ChromQuest 4.2;
- difratômetro de raios-X Philips modelo PW 3710;
- espectrofotômetro de absorção no infravermelho Perkin Elmer Spectrum 1000;

- evaporador rotativo Ika RV 10 Digital V;
- incubadora automática digital Golden;
- incubadora com agitação orbital Tecnal TE420;
- microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6360LV;
- microscópio trinocular Zeiss - Primo Star. Câmera Canon PowerShot A650;
- paquímetro digital 150 mm Mitutoyo 500-144;
- capela de fluxo laminar vertical Veco - Biosafe 12.

4.4 Colunas cromatográficas

- coluna cromatográfica Ace C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m) – ACT;
- coluna cromatográfica Zorbax SB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 μ m) – Agilent.

4.5 Animais

Coelhos albinos machos Nova Zelândia, pesando entre 2,0 e 2,5 kg, foram adquiridos da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Durante o período do estudo, os animais foram mantidos no biotério da Fundação Ezequiel Dias (Funed) em Belo Horizonte.

MÉTODOS



5 MÉTODOS

5.1 Preparo dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL

Os implantes foram preparados por moldagem a quente da mistura constituída por PCL e etoposídeo (1:1). O fármaco foi disperso no polímero fundido e a mistura obtida foi moldada, em uma placa de Teflon[®] aquecida a 60 °C, na forma de cilindros com aproximadamente 0,6 mm de diâmetro, 6,3 mm de comprimento e massa de 2,2 mg. Implantes sem fármaco também foram preparados utilizando o procedimento descrito anteriormente.

5.2 Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL

5.2.1 Preparo das soluções padrão, amostra, PCL e de resolução

Solução padrão estoque de etoposídeo (250 µg/mL): aproximadamente 25 mg de etoposídeo SQR foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Adicionaram-se 50 mL de acetonitrila para completa solubilização e o volume foi ajustado com ácido acético 4% (v/v).

Solução estoque de etoposídeo (250 µg/mL): aproximadamente 25 mg de etoposídeo matéria-prima foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Adicionaram-se 50 mL de acetonitrila para completa solubilização e o volume foi ajustado com ácido acético 4% (v/v).

Solução amostra: cinco implantes contendo etoposídeo e PCL foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se 25 mL de acetonitrila para completa solubilização e o volume foi ajustado com ácido acético 4% (v/v). Transferiram-se 15 mL da solução obtida para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi ajustado com tampão fosfato salina, pH 7,4 (PBS), obtendo-se uma solução cuja concentração de etoposídeo foi de aproximadamente 35 µg/mL. A

solução de PBS foi preparada conforme procedimento descrito na Farmacopeia Britânica (BRITISH..., 2012).

Solução estoque de PCL (700 µg/mL): aproximadamente 35 mg de PCL foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se 30 mL de acetonitrila para completa solubilização e o volume foi ajustado com mesmo solvente.

Solução diluída de PCL (35 µg/mL): Transferiram-se 5 mL da *solução estoque de PCL* para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi ajustado com mistura de acetonitrila, ácido acético 4% (v/v) e PBS (15:15:70).

Solução de resolução: em uma alíquota de 10 mL da *solução padrão estoque de etoposídeo*, foram adicionados 0,1 mL de solução alcoólica de fenolftaleína 1% (p/v) e solução de hidróxido de sódio 1 mol/L até coloração levemente rosa. A solução foi mantida em repouso por quinze minutos e, em seguida, 0,1 mL de solução de ácido acético 4% (v/v) foram adicionados.

5.2.2 Determinação das condições analíticas

As condições analíticas para quantificação de etoposídeo em implantes foram definidas considerando o método descrito na Farmacopeia Internacional 4ª edição (INTERNATIONAL..., 2006) para o doseamento de etoposídeo em matéria-prima farmacêutica. O método farmacopeico preconiza o emprego de coluna C18 (250 x 4,6 mm; 10 µm), fluxo de 2 mL/min, volume de injeção de 10 µL, detecção a 285 nm e fase móvel composta por acetonitrila e ácido acético 4% (v/v) (24:76).

Com o objetivo de reduzir o tempo de análise, foram avaliadas três diferentes proporções de acetonitrila na fase móvel (24%; 27% e 30%). Para cada condição analítica testada, foram realizadas três injeções da *solução de resolução* no equipamento e avaliados o tempo de retenção do etoposídeo e a resolução entre os picos do antitumoral e de seu produto de degradação (picroetoposídeo).

5.2.3 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Thermo Surveyor System provido de detector ultravioleta (DAD) a 285 nm e coluna Ace C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), mantida a 25 °C. A eluição foi realizada de forma isocrática, com fase móvel constituída por acetonitrila e ácido acético 4% (v/v) (30:70), e fluxo de 2 mL/min. O volume de injeção foi de 25 µL.

5.2.4 Avaliação da adequação do sistema

A adequabilidade do sistema foi determinada pela injeção de 25 µL da *solução de resolução* e subsequente avaliação da resolução entre os dois picos principais do cromatograma (etoposídeo e picroetoposídeo), desconsiderando o pico referente à fenolftaleína.

5.2.5 Validação

A validação foi realizada segundo os procedimentos descritos na Resolução RE nº 899/2003 e em outros guias nacionais e internacionais (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2011).

5.2.5.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade do método cromatográfico, foram preparados, por diluição em PBS, a partir da *solução padrão estoque de etoposídeo*, dois grupos de soluções: um grupo constituído por seis soluções de etoposídeo na concentração de 35 µg/mL; e outro contendo seis soluções de etoposídeo (35 µg/mL) adicionadas de PCL (35 µg/mL). A seletividade foi avaliada pela comparação da concentração média de etoposídeo dos dois grupos de soluções por meio do teste *t* de Student ($\alpha = 0,05$). O teste F (Snedecor) ($\alpha = 0,05$) foi aplicado para avaliar a homocedasticidade (INMETRO, 2007). Além disso, foi avaliada a pureza espectral

dos picos de etoposídeo obtidos em cromatogramas das soluções de etoposídeo e das soluções de etoposídeo e PCL, com auxílio do detector DAD. O cromatograma obtido para a *solução diluída de PCL* também foi avaliado.

5.2.5.2 Linearidade

Foram feitas diluições, em triplicata, a partir da *solução padrão estoque de etoposídeo* para obter as concentrações de 5; 20; 35; 50 e 65 µg/mL (Tabela 1). Para o preparo destas soluções, PBS foi utilizado como diluente.

Tabela 1 - Soluções diluídas de etoposídeo para obtenção de curva analítica e avaliação da linearidade do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL

Volume da <i>solução padrão estoque de etoposídeo</i> (mL)	PBS q.s.p. (mL)	Concentração de etoposídeo (µg/mL)
1	50	5
4	50	20
7	50	35
10	50	50
13	50	65

Legenda: q.s.p. - quantidade suficiente para.

A curva analítica foi plotada para a concentração de etoposídeo *versus* a área do pico. Foram obtidas duas curvas analíticas em dois dias diferentes.

Para cada curva analítica, foi calculada a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados ordinários e realizada a análise da adequação do modelo proposto, que consistiu em avaliar: o desvio de linearidade por meio da análise de variância (ANOVA); e a análise de resíduos que compreendeu a verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner, da homocedasticidade pelo teste de Levene modificado por Brown e Forsythe e da independência dos resíduos por meio do teste de Durbin-Watson (INMETRO, 2011; SOUSA; JUNQUEIRA, 2005). A análise de covariância (ANCOVA) foi utilizada para a comparação das curvas analíticas obtidas em dias diferentes (SNEDECOR; COCHRAN, 1996).

5.2.5.3 Precisão

A precisão intradia foi avaliada por meio de três determinações em três concentrações diferentes: baixa (5 µg/mL); média (35 µg/mL) e alta (65 µg/mL). As soluções analisadas foram preparadas pela incorporação de etoposídeo na *solução estoque de PCL* (Tabela 2). Para avaliação da precisão interdias, o mesmo procedimento foi adotado, realizando-se análises em dois dias consecutivos. Em cada análise, o teor de etoposídeo e o desvio padrão relativo (DPR) foram determinados.

Tabela 2 - Diluições e concentrações das soluções para avaliação da precisão do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL

Volume da <i>solução estoque de etoposídeo</i> (mL)	Volume da <i>solução estoque de PCL</i> (mL)	PBS q.s.p. (mL)	Concentração de etoposídeo (µg/mL)	Concentração de PCL (µg/mL)
1	2,5	50	5	35
7	2,5	50	35	35
13	2,5	50	65	35

Legenda: q.s.p. - quantidade suficiente para.

5.2.5.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidades conhecidas de etoposídeo SQR foram adicionadas à *solução estoque de PCL*.

As soluções foram preparadas, em triplicata, conforme as diluições apresentadas na Tabela 2, sendo que a *solução estoque de etoposídeo* foi substituída pela *solução padrão estoque de etoposídeo*. As análises foram realizadas em dois dias consecutivos, de forma a avaliar a exatidão intradia e interdias. A porcentagem de recuperação e o DPR foram calculados.

5.2.5.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi estimado a partir dos parâmetros da curva analítica, conforme *Equação 1*:

$$LQ = 10 \frac{\sigma}{b} \quad (1)$$

em que, σ é o desvio padrão das respostas e b é a inclinação da curva analítica (ICH, 2005). Então, foram analisadas, em triplicata, soluções placebo contendo etoposídeo em quatro diferentes concentrações: 1; 1,5; 1,75 e 2 $\mu\text{g/mL}$. A concentração média, o DPR e a porcentagem de recuperação média foram calculados.

5.2.5.6 Robustez

O método proposto por Youden e Steiner (1975) foi empregado para avaliar a robustez do método cromatográfico. Nesse teste, sete parâmetros analíticos foram selecionados e investigados em dois níveis conforme indicados por letras maiúsculas (correspondentes às condições analíticas em seus valores nominais) e letras minúsculas (condições com uma pequena variação) na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros analíticos e variações utilizadas em estudo de robustez do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL

Parâmetros analíticos	Condições nominais	Condições modificadas
Proporção de acetonitrila na fase móvel (%)	30 - A	32 - a
Concentração de ácido acético na fase móvel (% v/v)	4 - B	4,2 - b
Temperatura do compartimento das amostras* (°C)	25 - C	30 - c
Temperatura da coluna (°C)	25 - D	30 - d
Fluxo da fase móvel (mL/min)	2 - E	1,8 - e
Proporção de acetonitrila nas soluções padrão e da amostra de etoposídeo (%)	13 - F	20 - f
Comprimento de onda de detecção (nm)	285 - G	287 - g

Nota: * Temperatura do compartimento do cromatógrafo destinado ao armazenamento das amostras.

Oito ensaios foram realizados, em ordem aleatória, de acordo com o planejamento experimental apresentado na Tabela 4. Em cada experimento, foram empregadas três soluções (*solução de resolução*, *solução amostra* e *solução padrão* de etoposídeo na concentração de 35 µg/mL), para as quais foram realizadas três injeções no equipamento. Após a alteração das condições analíticas, foram aguardados 20 minutos para estabilização do sistema.

Os resultados de cada experimento estão representados pelas letras de S a Z (Tabela 4). A partir desses resultados, o efeito de cada parâmetro analítico foi estimado pela diferença entre a média dos resultados das quatro análises com letra maiúscula (condições nominais) e a média dos resultados das quatro análises com letra minúscula (condições alternativas) (YOUNDEN; STEINER, 1975). Assim, para avaliar a influência, por exemplo, do comprimento de onda no resultado final das análises, a Equação 2 apresentada a seguir foi utilizada:

$$\text{Efeito G/g} = \frac{(S+V+X+Y)}{4} - \frac{(T+U+W+Z)}{4} \quad (2)$$

Tabela 4 - Matriz de planejamento fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez de acordo com teste de Youden e Steiner (1975)

Parâmetros analíticos	Combinação fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Proporção de acetonitrila na fase móvel	A	A	A	A	a	a	a	a
Concentração de ácido acético na fase móvel	B	B	b	b	B	B	b	b
Temperatura do compartimento das amostras	C	c	C	c	C	c	C	c
Temperatura da coluna	D	D	d	d	d	d	D	D
Fluxo da fase móvel	E	e	E	e	e	E	e	E
Proporção de acetonitrila nas soluções padrão e amostra de etoposídeo	F	f	f	F	F	f	f	F
Comprimento de onda de detecção	G	g	g	G	g	G	G	g
<i>Resultados</i>	<i>S</i>	<i>T</i>	<i>U</i>	<i>V</i>	<i>W</i>	<i>X</i>	<i>Y</i>	<i>Z</i>

O efeito da resposta devido à alteração do parâmetro analítico foi considerado significativo quando o valor da diferença foi superior a $(s\sqrt{2})$, em que s é o desvio padrão entre os oito resultados (BEDREGAL *et al.*, 2008).

Foi avaliada a influência dos sete parâmetros analíticos sobre a área do pico, tempo de retenção, assimetria, número de pratos teóricos, resolução e conteúdo de etoposídeo nos implantes.

5.3 Quantificação de etoposídeo em implantes de PCL

Foram preparadas, em sextuplicata, a solução padrão de etoposídeo a 35 µg/mL (por diluição da *solução padrão estoque de etoposídeo*) e a *solução amostra* (conforme descrito no *item 5.2.1*). As soluções foram analisadas pelo método cromatográfico desenvolvido e validado. O teor de etoposídeo nos implantes de PCL foi expresso em porcentagem do valor rotulado (50% p/p).

5.4 Caracterização dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL

Os implantes desenvolvidos foram caracterizados pelos métodos de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy* - FTIR), análise térmica, difração de raios-X em baixo ângulo (*scanning electron microscopy* - WAXS) e microscopia eletrônica de varredura (*scanning electron microscopy* - SEM).

5.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos para o etoposídeo, PCL, mistura física (mistura dos componentes da formulação, isto é, fármaco e polímero) e implante. Foi empregada a técnica de Reflexão Total Atenuada, na faixa de 650 a 4000 cm^{-1} , a partir de 32 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} .

5.4.2 Análise térmica

5.4.2.1 Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas foram obtidas utilizando cerca de 5 mg das amostras (etoposídeo e implantes) colocados em cadinhos de alumina (70 μ L). As amostras foram analisadas a partir de 30 °C até 500 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min.

5.4.2.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas utilizando cerca de 3 mg das amostras (etoposídeo, PCL, mistura física, implante) colocados em cadinhos de alumínio (40 μ L) fechados e perfurados. As amostras foram submetidas ao aquecimento de 30 a 300 °C, sob atmosfera de nitrogênio (fluxo 50 mL/min), com razão de aquecimento de 10 °C/min.

5.4.3 Difração de raios-X em baixo ângulo

A WAXS foi realizada em difratômetro de raios-X com alvo de cobre ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) e equipado com filtro de níquel. Foram feitas varreduras a partir de 2θ na faixa de 1 a 90° a uma taxa de 1°/min. O padrão de difração de raios-X foi obtido para o etoposídeo, PCL e implante.

5.4.4 Microscopia eletrônica de varredura

A SEM foi realizada utilizando um microscópio Jeol operando a 15 kV. Os implantes recentemente preparados foram criofraturados e montados em suportes (*stubs*) de alumínio com o auxílio de fita dupla-face. As amostras foram submetidas a um processo de metalização com ouro, sob atmosfera de argônio, durante 60 segundos.

A superfície dos implantes foi visualizada nos aumentos de 100X, 120X, 1500X e 5000X. As imagens obtidas foram ajustadas utilizando os programas Adobe Photoshop e Adobe Illustrator (Adobe Systems Incorporated).

5.5 Uniformidade de conteúdo

O teste foi realizado de acordo com o método de uniformidade de conteúdo descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). De forma resumida, dez unidades de implantes foram pesadas individualmente. Cada implante foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL e dissolvido em mistura de acetonitrila e ácido acético 4% (v/v) (1:1). Foram transferidos 3 mL da solução obtida para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi ajustado com PBS. O conteúdo de etoposídeo para cada unidade foi determinado pelo método cromatográfico desenvolvido e expresso em porcentagem do valor rotulado (50% p/p).

5.6 Processo de esterilização dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL

Os implantes foram esterilizados por meio de exposição à luz ultravioleta ($\lambda=254$ nm), em capela de fluxo laminar, por 30 minutos (PATEL *et al.*, 2009).

5.6.1 Avaliação da estabilidade dos implantes frente ao processo de esterilização

Para avaliar a estabilidade do etoposídeo quando submetido ao processo de esterilização, foi obtida, conforme descrito no *item 5.4.2.2*, a curva de DSC do etoposídeo exposto à radiação ultravioleta ($\lambda=254$ nm) por 30 minutos. Também foram avaliados os espectros na região do infravermelho (*item 5.4.1*) do implante e do fármaco submetidos ao mesmo tratamento. Além disso, foi determinado, pelo método por CLAE, o teor de etoposídeo em amostras de implantes submetidos e não submetidos à radiação ultravioleta pertencentes ao mesmo lote. Os teores médios (n=7) obtidos para ambas as amostras foram comparados por meio do teste

t de Student ($\alpha = 0,05$). O teste F (Snedecor) foi aplicado para avaliar a homocedasticidade ($\alpha = 0,05$).

5.6.2 Teste de esterilidade

Para avaliação da eficácia do processo de esterilização, uma amostra dos implantes estéreis foi submetida ao teste de esterilidade conforme método direto descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Sob condições assépticas, os implantes ($n = 10\%$ do número de implantes do lote produzido para cada meio de cultura) foram adicionados aos tubos contendo caldo caseína soja ou meio fluido tioglicolato. Após a inoculação, os tubos contendo meio fluido tioglicolato e caldo caseína-soja foram incubados, respectivamente, a 35 °C e 25 °C, por quatorze dias. Durante esse período, foi avaliada a presença de crescimento microbiano. Antes da execução do experimento, foram avaliadas a compatibilidade físico-química dos implantes com os meios de cultura e a atividade bacteriostática e fungistática dos implantes frente a alguns microrganismos (BRASIL, 2010).

5.7 Avaliação *in vitro* da perda de massa dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL

Os implantes de etoposídeo e PCL ($n=5$), previamente pesados, foram colocados em frascos de vidro individuais e imersos em 30 mL de PBS. Esses frascos foram incubados a 37 °C, sob agitação (30 rpm), e em intervalos de tempo pré-estabelecidos, os implantes foram removidos do PBS e secados por 72 horas em dessecador à vácuo a temperatura ambiente. Em seguida, o peso seco final foi registrado e a porcentagem de perda de massa foi calculada pela Equação 3 (LI *et al.*, 2013):

$$\% \text{ perda de massa} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (3)$$

em que, m_i é a massa inicial do implante e m_f é a massa final do implante no intervalo de tempo pré-estabelecido.

5.8 Avaliação da absorção de água pelos implantes constituídos de etoposídeo e PCL

Os implantes foram mantidos sob as mesmas condições descritas no *item* 5.7. Em períodos de tempo pré-definidos, os implantes foram retirados do meio de incubação e o excesso de líquido presente na superfície do implante foi removido com papel de filtro. Em seguida, os implantes foram pesados e a porcentagem de absorção de água foi calculada pela Equação 4:

$$\text{Absorção de água (\%)} = \frac{(m_u - m_s)}{m_s} \times 100 \quad (4)$$

em que, m_u e m_s são, respectivamente, as massas do implante úmido e seco no intervalo de tempo pré-estabelecido.

5.9 Estudo de liberação *in vitro* do etoposídeo a partir dos implantes de PCL

A liberação *in vitro* do etoposídeo a partir dos implantes foi realizada em incubadora a 37 °C sob agitação (30 rpm), respeitando as condições *sink*. Segundo a Farmacopeia Americana (UNITED..., 2012), as condições *sink* são definidas como um volume de meio de dissolução correspondente a, no mínimo, três vezes aquele necessário para obter uma solução saturada do fármaco. Assim, os implantes (n=5) foram colocados em frascos de vidro contendo 30 mL de PBS, volume necessário para assegurar as condições *sink*, visto que a solubilidade do etoposídeo em PBS a 37 °C é de 125,93 µg/mL (SHAH *et al.*, 1989). Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, 15 mL do meio de incubação foram coletados e 15 mL de PBS recém preparado foram adicionados a cada frasco. A quantidade de fármaco liberado foi determinada por CLAE. O perfil de liberação foi avaliado como percentual acumulado de etoposídeo liberado no meio durante 150 dias.

5.10 Avaliação do potencial tóxico dos implantes de PCL contendo etoposídeo empregando o teste em membrana córion-alantóide de ovo embrionado de galinha (teste HET-CAM)

Foram utilizados ovos embrionados de galinha da espécie *Gallus domesticus* e da linhagem Ross, que foram adquiridos junto ao Incubatório da Rivelli Indústria de

Alimentos, localizado no município de Mateus Leme – MG. Os ovos foram incubados na posição horizontal com rotação constante por dez dias, a temperatura de 37 ± 1 °C e umidade relativa de aproximadamente 60%. No 10º dia de incubação, foi feita uma abertura circular na região da câmara de ar da casca dos ovos, evidenciando a membrana da casca. Nesta etapa, os ovos não viáveis (ovos não embrionados ou cujo embrião estava morto) foram descartados. Após a membrana córion-alantóide (MCA) ser exposta, foram aplicados sobre ela 300 µL das amostras: solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L (controle positivo); solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v) (controle negativo); etoposídeo lixiviado de implantes poliméricos após sete dias de incubação em PBS; solução de etoposídeo 24,9 µg/mL preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) 1% (v/v); DMSO 1% (v/v) e PBS em que implantes de PCL sem fármaco foram incubados por sete dias. Implantes de PCL com e sem etoposídeo também foram introduzidos diretamente sobre a MCA. Após vinte segundos de contato entre a amostra e a MCA, a membrana foi lavada com solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v), examinada visualmente por cinco minutos e graduada para os efeitos irritantes, de acordo com a Tabela 5 (ALANY *et al.*, 2006; LUEPKE; KEMPER, 1986). As MCA também foram examinadas em microscópio óptico.

Tabela 5 - Escores para as alterações observadas na MCA do ovo embrionado de galinha

Efeitos	Tempo (t)		
	t ≤ 30 s	30s < t ≤ 2 min	2 min < t ≤ 5 min
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Fonte: ALANY *et al.*, 2006, p. 148.

Os aspectos observados para cada efeito foram:

- hiperemia: o aparecimento de capilares que antes não eram visíveis e/ou a dilatação dos vasos visíveis;
- hemorragia: a difusão de sangue no meio;
- coagulação: o aparecimento de manchas avermelhadas ou de grumos esbranquiçados.

Foram utilizados seis ovos para cada amostra, sendo que para cada ovo, foram somadas as pontuações de cada efeito observado. A média do somatório dos escores dos seis ovos foi utilizada para determinar a classificação final das amostras, conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6 - Relação entre o escore da resposta vascular e o potencial de irritação das amostras

Escore cumulativo	Potencial de irritação
0 a 0,9	Não irritante
1,0 a 4,9	Ligeiramente irritante
5,0 a 8,9	Moderadamente irritante
9,0 a 21	Irritante

Fonte: ALANY *et al.*, 2006, p. 148.

5.11 Preparo dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA

Para a confecção dos implantes, foi preparada uma solução, em acetonitrila, contendo etoposídeo e PLGA na proporção 1:2. O solvente foi eliminado em evaporador rotativo sob pressão reduzida e o filme resultante foi modelado a quente em uma placa de Teflon[®], para a produção de implantes cilíndricos com aproximadamente 0,4 mm de diâmetro, 8 mm de comprimento e massa de 1,8 mg. Também foram preparados implantes sem fármaco usando o procedimento descrito anteriormente.

5.12 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA

5.12.1 Preparo das soluções padrão, amostra, PLGA e de resolução

Solução padrão estoque de etoposídeo (250 µg/mL): aproximadamente 25 mg de etoposídeo SQR foram exatamente pesados e transferidos para balão

volumétrico de 100 mL. Adicionaram-se 40 mL de acetonitrila para completa solubilização e o volume foi ajustado com tampão acetato pH 4,56 (0,05 mol/L).

Solução estoque de etoposídeo (250 µg/mL): aproximadamente 25 mg de etoposídeo matéria-prima foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Adicionaram-se 40 mL de acetonitrila para completa solubilização e o volume foi ajustado com tampão acetato pH 4,56 (0,05 mol/L).

Solução amostra: quatro implantes constituídos de etoposídeo e PLGA foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Adicionaram-se 40 mL de acetonitrila para completa solubilização e o volume foi ajustado com mistura de tampão acetato pH 4,56 (0,05 mol/L) e PBS (5:95), obtendo-se uma solução cuja concentração de etoposídeo foi de aproximadamente 24 µg/mL.

Solução estoque de PLGA (500 µg/mL): aproximadamente 25 mg de PLGA foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se 40 mL de acetonitrila para completa solubilização e o volume foi ajustado com o mesmo solvente.

Solução diluída de PLGA (50 µg/mL): 5 mL da *solução estoque de PLGA* foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi ajustado com a mistura de acetonitrila, tampão acetato pH 4,56 (0,05 mol/L) e PBS (37:3:60).

Solução de resolução: em uma alíquota de 10 mL da *solução padrão estoque de etoposídeo*, foram adicionados 0,1 mL de solução alcoólica de fenolftaleína 1% (p/v) e solução de hidróxido de sódio 1 mol/L até coloração levemente rosa. A solução foi mantida em repouso por quinze minutos e, em seguida, 0,1 mL de solução de ácido acético 4% (v/v) foram adicionados.

5.12.2 Determinação das condições analíticas

Durante o desenvolvimento do método cromatográfico, inicialmente, foram consideradas as condições analíticas descritas por Tian *et al.* (2006), que preconizavam o emprego de coluna fenil, de 250 mm de comprimento, fase móvel composta por acetonitrila e tampão acetato pH 4,5 (30:70) e fluxo de 1 mL/min. Visando a redução do tempo de análise, foram avaliados diferentes fluxos (1,7; 1,9 e 2 mL/min) e proporções de acetonitrila na fase móvel (30; 35; 38 e 40%). Para cada

condição analítica testada, foram realizadas três injeções da solução de resolução no equipamento.

5.12.3 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Thermo Surveyor System provido de DAD a 247 nm e coluna Zorbax SB-Phenyl (250 x 4,6 mm; 5 µm), mantida a 25 °C. A eluição foi realizada de forma isocrática, com fase móvel constituída por mistura de acetonitrila e tampão acetato pH 4,56 (0,05 mol/L) (38:62), e fluxo de 1,9 mL/min. O volume de injeção foi de 25 µL.

5.12.4 Avaliação da adequação do sistema

A adequação das condições cromatográficas foi avaliada conforme descrito no *item 5.2.4*.

5.12.5 Validação

A validação foi realizada segundo os procedimentos descritos na Resolução RE nº 899/2003 e em outros guias nacionais e internacionais (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2011).

5.12.5.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade, foram preparados, em mistura de acetonitrila e PBS (40:60), dois grupos de soluções a partir da diluição da *solução padrão estoque de etoposídeo*: um grupo constituído de seis soluções de etoposídeo na concentração de 25 µg/mL; e outro contendo seis soluções de etoposídeo (25 µg/mL) adicionadas de PLGA (50 µg/mL). A seletividade foi avaliada conforme procedimento descrito no *item 5.2.5.1*.

5.12.5.2 Linearidade

Foram feitas diluições, em triplicata, da *solução padrão estoque de etoposídeo* para obter as concentrações de 5; 15; 25; 35 e 45 µg/mL (Tabela 7). Para o preparo dessas soluções, a mistura de acetonitrila e PBS (40:60) foi utilizada como diluente.

Tabela 7 - Soluções diluídas de etoposídeo para obtenção de curva analítica e avaliação da linearidade do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA

Volume da <i>solução padrão estoque de etoposídeo</i> (mL)	Acetonitrila:PBS (40:60) q.s.p. (mL)	Concentração de etoposídeo (µg/mL)
1	50	5
3	50	15
5	50	25
7	50	35
9	50	45

Foram obtidas duas curvas analíticas em dois dias diferentes. Para cada curva, foi realizada a análise de regressão como descrito no *item 5.2.5.2*.

5.12.5.3 Precisão

A precisão intradia foi avaliada por meio de três determinações em quatro concentrações diferentes: 2; 5; 25 e 45 µg/mL. As soluções analisadas foram preparadas pela incorporação de etoposídeo na solução estoque de PLGA (Tabela 8). Para avaliação da precisão interdias, o mesmo procedimento foi adotado, realizando-se as análises em dois dias consecutivos. Em cada análise, o teor de etoposídeo e o DPR foram determinados.

Tabela 8 - Diluições e concentrações das soluções para avaliação da precisão do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA

Volume da solução estoque de etoposídeo (mL)	Volume da solução estoque de PLGA (mL)	Acetonitrila e PBS (40:60) q.s.p. (mL)	Concentração de etoposídeo (µg/mL)	Concentração de PLGA (µg/mL)
1,6	20	200	2	50
1	5	50	5	50
5	5	50	25	50
9	5	50	45	50

5.12.5.4 Exatidão

Foram preparadas, em triplicata, soluções contendo etoposídeo e PLGA conforme as diluições descritas na Tabela 8, sendo que a *solução estoque de etoposídeo* foi substituída pela *solução padrão estoque de etoposídeo*. As análises foram realizadas em dois dias consecutivos, de forma a avaliar a exatidão intradia e interdias. A porcentagem de recuperação e o DPR foram calculados.

5.12.5.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi estimado conforme procedimento descrito em *item 5.2.5.5*, sendo que foram analisadas soluções contendo PLGA (50 µg/mL) e etoposídeo em diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1 µg/mL).

5.12.5.6 Robustez

A robustez foi avaliada pela alteração de duas condições analíticas: proporção de acetonitrila na fase móvel e fluxo da fase móvel (Tabela 9). As soluções padrão de etoposídeo (25 µg/mL), *amostra* (aproximadamente 25 µg/mL) e *de resolução* foram analisadas, em sextuplicata, sob as condições nominais e

modificadas. A significância da influência dessas condições analíticas sobre o tempo de retenção, a resolução entre o pico de etoposídeo e de seu produto de degradação, e o teor de fármaco nos implantes foi avaliada pelo teste de *t* de Student ($\alpha = 0,05$).

Tabela 9 - Parâmetros analíticos e variações utilizadas para avaliação da robustez do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA

Parâmetros analíticos	Condições nominais	Condições modificadas
Proporção de acetonitrila na fase móvel (%)	38	39
Fluxo da fase móvel (mL/min)	1,9	1,8

5.13 Quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA

Foram preparadas, solução padrão de etoposídeo e solução amostra (n=6) na concentração de trabalho (25 $\mu\text{g/mL}$), conforme descrito no item 5.12.1. As soluções foram analisadas pelo método cromatográfico desenvolvido e validado. O teor de etoposídeo nos implantes de PLGA foi expresso em porcentagem do valor rotulado (33,3% p/p).

5.14 Caracterização dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA

Os implantes desenvolvidos foram caracterizados por FTIR, análise térmica e SEM.

5.14.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos para as amostras (etoposídeo, PLGA, mistura física e implante) conforme procedimento descrito em *item 5.4.1*.

5.14.2 Análise térmica

5.14.2.1 Termogravimetria

As curvas termogravimétricas foram obtidas utilizando cerca de 5 mg das amostras (etoposídeo, PLGA, mistura física e implantes) colocados em cadinhos de alumina (70 μ L). As amostras foram analisadas a partir de 30 °C até 700 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min.

5.14.2.2 Calorimetria exploratória diferencial

As análises de DSC foram realizadas utilizando cerca de 3 mg das amostras (etoposídeo, PLGA, mistura física e implantes) colocados em cadinhos de alumínio (40 μ L) fechados e perfurados. As amostras foram submetidas ao aquecimento de 30 a 250 °C, sob atmosfera de nitrogênio (fluxo 50 mL/min), com razão de aquecimento de 10 °C/min.

5.14.3 Microscopia eletrônica de varredura

A SEM foi realizada de acordo com o procedimento apresentado no *item* 5.4.4.

5.15 Uniformidade de conteúdo

O teste foi realizado de acordo com o método de uniformidade de conteúdo descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). De forma resumida, dez unidades foram pesadas individualmente e o conteúdo de fármaco determinado para cada unidade, por CLAE. Para o doseamento, cada implante foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e dissolvido em 10 mL de acetonitrila. O volume foi ajustado com mistura de tampão acetato pH 4,56 (0,05 mol/L) e PBS (5:95). O conteúdo de etoposídeo foi expresso em porcentagem do valor rotulado (33,3% p/p).

5.16 Processo de esterilização dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA

Os implantes foram esterilizados por meio de exposição à luz ultravioleta ($\lambda=254$ nm) por 30 minutos (PATEL *et al.*, 2009).

5.16.1 Avaliação da estabilidade dos implantes frente ao processo de esterilização

Para avaliar a estabilidade do etoposídeo quando submetido ao processo de esterilização, fármaco e implantes foram avaliados conforme procedimento descrito no *item 5.6.1*.

5.16.2 Teste de esterilidade

Para avaliação da eficácia do processo de esterilização, uma amostra dos implantes estéreis foi submetida ao teste de esterilidade conforme método descrito no *item 5.6.2*.

5.17 Avaliação *in vitro* da perda de massa dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA

Os implantes de etoposídeo e PLGA ($n=5$), previamente pesados, foram colocados em frascos de vidro individuais e imersos em 15 mL de PBS. Esses frascos foram incubados a 37 °C e submetidos ao mesmo procedimento descrito no *item 5.7*.

5.18 Avaliação da absorção de água pelos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA

A absorção de água pelos implantes contendo etoposídeo e PLGA foi avaliada conforme procedimento descrito no *item 5.8*, exceto que foram utilizados 15 mL de PBS para incubar os dispositivos.

5.19 Estudo de liberação *in vitro* do etoposídeo a partir dos implantes de PLGA

O perfil de liberação *in vitro* do fármaco foi realizado sob condições *sink* (UNITED..., 2012), durante cinquenta dias, em incubadora a 37 °C sob agitação (30 rpm). Os implantes (n = 5) foram colocados em frascos de vidro contendo 15 mL de PBS. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, o meio de incubação dos implantes foi totalmente retirado para posterior quantificação por CLAE, e o volume foi repostado com PBS recém preparado. A média da porcentagem de fármaco liberado a cada tempo foi calculada e utilizada para construir a curva do perfil de liberação *in vitro*.

5.20 Avaliação do potencial tóxico dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA empregando o teste HET-CAM

A avaliação do potencial tóxico dos implantes contendo etoposídeo e PLGA foi realizada conforme procedimento descrito no *item 5.10*.

As amostras avaliadas pelo teste HET-CAM foram: solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L (controle positivo); solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v) (controle negativo); etoposídeo lixiviado de implantes poliméricos após 7, 14 e 21 dias de incubação em PBS; solução de etoposídeo 20 µg/mL preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) 1% (v/v); DMSO 1% (v/v) e PBS em que implantes de PLGA sem fármaco foram incubados por sete dias. Implantes de PLGA com e sem etoposídeo também foram introduzidos diretamente sobre a MCA.

5.21 Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de etoposídeo em humor vítreo

5.21.1 Preparo das soluções e amostras

Humor vítreo simulado (SILVA *et al.*, 2013): aproximadamente 6,4 g de cloreto de sódio, 750 mg de cloreto de potássio, 480 mg de cloreto de cálcio, 300 mg de cloreto de magnésio, 3,9 g de acetato de sódio e 1,7 g de citrato de sódio foram

exatamente pesados, transferidos para balão volumétrico de 1000 mL e solubilizados em água. O volume foi completado com o mesmo solvente.

Solução padrão estoque de etoposídeo (1000 µg/mL): aproximadamente 25 mg de etoposídeo SQR foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 25 mL. Adicionaram-se 10 mL de acetonitrila para completa solubilização e o volume foi ajustado com humor vítreo simulado.

Solução padrão diluída de etoposídeo (250 µg/mL): transferiram-se 12,5 mL da *solução padrão estoque de etoposídeo* para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi ajustado com mistura de acetonitrila e humor vítreo simulado (40:60).

Soluções padrão de etoposídeo: foram feitas diluições da *solução padrão estoque de etoposídeo* e da *solução padrão diluída de etoposídeo*, em humor vítreo simulado, de modo a obter diferentes concentrações do fármaco (Tabela 10).

Tabela 10 – Soluções padrão de etoposídeo utilizadas na validação do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em humor vítreo

Volume de <i>solução padrão estoque de etoposídeo</i> (mL)	Volume de <i>solução padrão diluída de etoposídeo</i> (mL)	Acetonitrila e humor vítreo simulado (40:60) q.s.p. (mL)	Concentração final de etoposídeo (µg/mL)
-	0,4	100	1
-	0,8	100	2
-	1,2	100	3
-	1,6	100	4
-	2	100	5
-	3,2	100	8
-	2	25	20
-	3,5	25	35
-	5	25	50
-	6,5	25	65
0,8	-	10	80
1	-	10	100
2	-	10	200
3,2	-	10	320

Amostra de humor vítreo adicionada de etoposídeo: uma alíquota de 50 μL de *solução padrão de etoposídeo* foi adicionada em 50 μL de humor vítreo. O volume final da amostra foi ajustado para 200 μL pela adição de humor vítreo simulado de forma a obter diferentes concentrações de etoposídeo (Tabela 11).

Tabela 11 – Soluções de etoposídeo em humor vítreo utilizadas na validação do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em humor vítreo

Solução padrão de etoposídeo		Volume de humor vítreo (μL)	Humor vítreo simulado q.s.p. (μL)	Concentração final de etoposídeo ($\mu\text{g/mL}$)
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Volume (μL)			
1	50	50	200	0,25
2	50	50	200	0,5
3	50	50	200	0,75
4	50	50	200	1
8	50	50	200	2
200	50	50	200	50
320	50	50	200	80

Solução de resolução: em 5 mL da *solução estoque de etoposídeo padrão*, foram adicionados 0,1 mL de solução alcoólica de fenoltaleína 1% (p/v) e solução de hidróxido de sódio 1 mol/L até coloração levemente rosa. A solução foi mantida em repouso por quinze minutos e, em seguida, 0,1 mL de solução de ácido acético 4% (v/v) foi adicionado. Uma alíquota de 50 μL da solução obtida foi adicionada em 50 μL de humor vítreo, e o volume foi ajustado para 200 μL pela adição de humor vítreo simulado.

5.21.2 Condições cromatográficas

Para determinação de etoposídeo em amostras de humor vítreo, foram empregadas as condições cromatográficas descritas para quantificação deste fármaco em implantes constituídos de PLGA e etoposídeo (*item 5.12.3*).

5.21.3 Avaliação da adequação do sistema

A adequação das condições analíticas foram avaliadas conforme descrito no item 5.2.4.

5.21.4 Validação

A validação foi realizada segundo os procedimentos descritos na Resolução RDC nº 27/2012 e em outros guias internacionais (BRASIL, 2012; FDA, 2001; EMEA, 2011).

Devido à ausência de quantidade suficiente de matriz biológica para realização de todo processo de validação, a linearidade do método bioanalítico foi avaliado utilizando uma solução de humor vítreo simulado (SILVA *et al.*, 2013).

5.21.4.1 Seletividade

Para verificar a existência de interferentes oriundos da matriz biológica, foram analisadas seis amostras de humor vítreo obtidas de seis animais distintos. Os cromatogramas destas amostras foram comparados ao cromatograma da amostra de humor vítreo adicionada de etoposídeo na concentração de 1 µg/mL, que corresponde ao limite inferior de quantificação (Tabela 11). Além disso, o humor vítreo simulado também foi analisado pelo método cromatográfico para avaliar a presença de interferentes.

5.21.4.2 Efeito da matriz

Foram preparadas seis amostras de humor vítreo adicionadas de etoposídeo (2 e 80 µg/mL - Tabela 11) e seis soluções de etoposídeo, em fase móvel, nas concentrações de 2 e 80 µg/mL, que foram analisadas por CLAE. As amostras de humor vítreo foram obtidas de seis animais distintos. Foram calculados o fator de

matriz (FM) para cada amostra analisada (*Equação 5*) e o DPR para o conjunto de FM obtidos.

$$FM = \frac{\text{Resposta do analito em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução}} \quad (5)$$

Também foram analisadas seis soluções de etoposídeo nas concentrações de 2 e 80 µg/mL, que foram preparadas em humor vítreo simulado. Com o objetivo de verificar o possível efeito de matriz decorrente do emprego da solução de humor vítreo simulado, as áreas dos picos de etoposídeo obtidas para essas soluções foram comparadas, conforme procedimento descrito anteriormente, às áreas obtidas para soluções do fármaco, preparadas em fase móvel, nas mesmas concentrações.

5.21.4.3 Efeito residual

Foram realizadas três injeções de uma amostra de humor vítreo, sendo que após a injeção da primeira réplica, uma amostra de humor vítreo adicionada de etoposídeo na concentração de 100 µg/mL (Tabela 11) foi injetada no cromatógrafo. Em seguida, as outras duas réplicas de humor vítreo foram analisadas. Os cromatogramas das amostras de humor vítreo foram comparados ao cromatograma da amostra de humor vítreo adicionada de etoposídeo na concentração de 1 µg/mL.

5.21.4.4 Linearidade

Foram obtidas três curvas analíticas, em três dias diferentes, por meio da análise de soluções padrão de etoposídeo em humor vítreo simulado, preparadas em triplicata, nas concentrações de 1; 2; 5; 20; 35; 50; 65; 80 e 100 µg/mL (Tabela 10).

Para cada curva analítica, foi calculada a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados ordinários e os coeficientes de correlação e determinação. Além disso, a partir da equação da reta, foi calculada a concentração e o desvio percentual em relação à concentração nominal para cada amostra de solução

padrão de etoposídeo utilizada na obtenção da curva analítica. Esses dados foram utilizados para verificar a validade dos pontos da curva analítica.

5.21.4.5 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão intradia foram avaliadas por meio da análise, em quintuplicata, das amostras de humor vítreo adicionadas de etoposídeo nas concentrações (Tabela 11): 1 µg/mL (limite inferior de quantificação); 2 µg/mL (concentração baixa); 50 µg/mL (concentração média) e 80 µg/mL (concentração alta). Para avaliação da precisão e exatidão interdias, o mesmo procedimento foi adotado, realizando-se análises em três dias consecutivos. Em cada análise, o DPR e o erro padrão relativo foram determinados para avaliar, respectivamente, a precisão e a exatidão do método.

5.21.4.6 Limite inferior de quantificação

Para determinação do limite inferior de quantificação, foram analisadas, em quintuplicata, amostras de humor vítreo fortificadas com etoposídeo nas concentrações de 0,25; 0,5; 0,75 e 1 µg/mL (Tabela 11). O DPR e o erro padrão relativo foram calculados para cada nível de concentração do fármaco.

5.21.4.7 Estabilidade

A estabilidade do analito na matriz biológica foi avaliada por meio da análise, em triplicata, de amostras de humor vítreo adicionadas de etoposídeo (2 e 80 µg/mL - Tabela 11) submetidas a diferentes condições de armazenamento.

Estabilidade de curta duração

Foram analisadas amostras de humor vítreo adicionadas de fármaco mantidas a temperatura ambiente por 10 horas. A concentração de etoposídeo determinada para estas amostras foi comparada à concentração obtida para amostras recém-preparadas.

Estabilidade de longa duração

Foram analisadas amostras de humor vítreo adicionadas de fármaco mantidas a -20 °C por 45 dias. A concentração de etoposídeo determinada para estas amostras foi comparada à concentração obtida para amostras recém-preparadas.

Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

As amostras de humor vítreo adicionadas de etoposídeo foram mantidas a - 20 °C por 24 horas, e então, descongeladas até atingir a temperatura ambiente. As amostras descongeladas foram novamente mantidas a - 20 °C por 24 horas. Este procedimento foi repetido até completar três ciclos de congelamento e descongelamento. Assim, a concentração do etoposídeo foi determinada para estas amostras e comparada à concentração obtida para amostras recém-preparadas.

Estabilidade do etoposídeo em solução

Foram preparadas, em triplicata, soluções de etoposídeo nas concentrações de 1000 µg/mL (*solução padrão estoque de etoposídeo*) e 1 µg/mL (menor concentração de trabalho). Essas soluções foram analisadas após serem mantidas à temperatura ambiente durante 6 horas. As áreas médias do pico do etoposídeo foram comparadas às áreas obtidas para soluções recém-preparadas. Para realização das análises cromatográficas, a *solução padrão estoque de etoposídeo* foi diluída para obter a concentração de 50 µg/mL.

5.22 Estudo de liberação *in vivo* do etoposídeo a partir dos implantes de PLGA

Os experimentos foram realizados de acordo com as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* para o uso de animais em pesquisa em oftalmologia. Este estudo foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da Funed (protocolo nº 030/2011). O procedimento cirúrgico foi realizado pelo médico veterinário Doutor Gustavo Oliveira Fulgêncio.

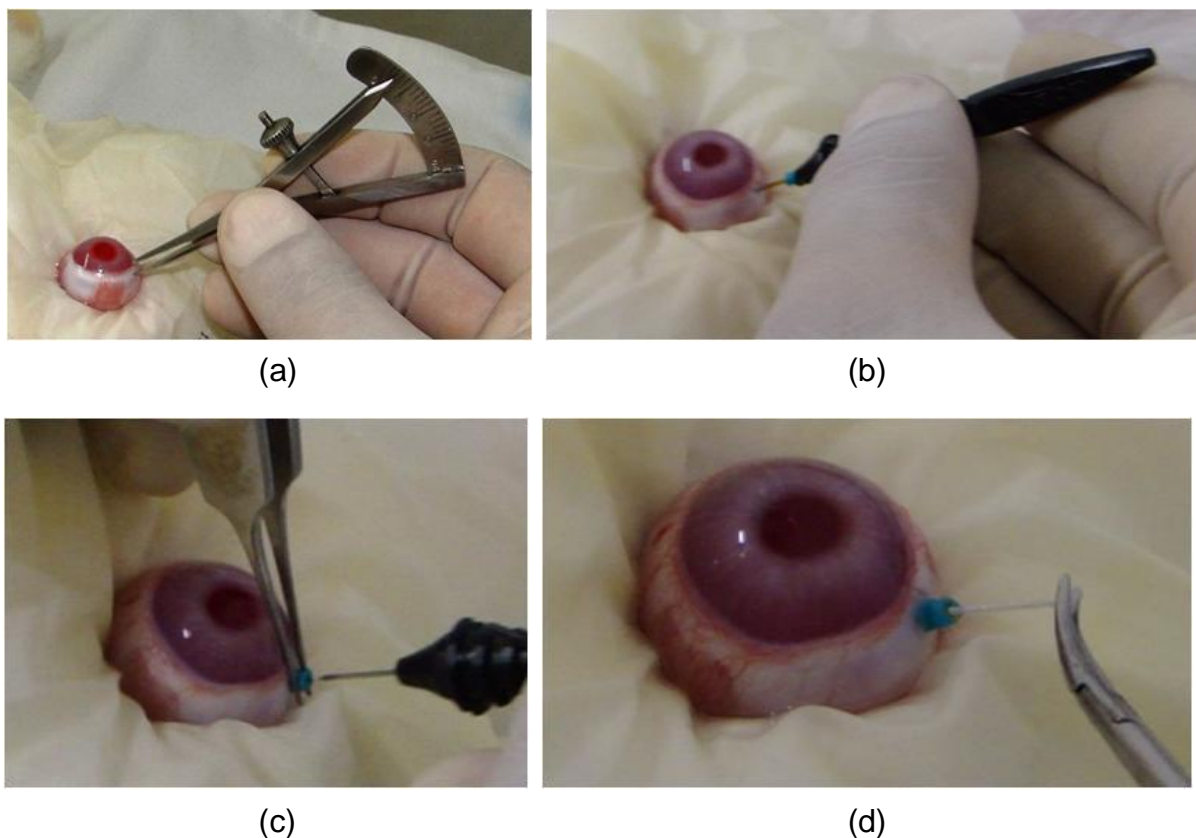
O estudo *in vivo* foi realizado empregando-se 36 coelhos albinos Nova Zelândia, que foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura média de 25 °C e com exaustor de ar. Durante o período do experimento, não houve restrição de água e a alimentação utilizada foi ração animal própria para a espécie. Os animais foram divididos em dois grupos: o grupo 1, contendo 24 coelhos, nos quais os implantes de PLGA e etoposídeo foram implantados cirurgicamente no corpo vítreo do olho direito; e o grupo 2 (grupo controle) constituído por 12 coelhos que receberam implantes sem o fármaco.

5.22.1 Inserção dos implantes na cavidade vítrea dos olhos dos coelhos

Os coelhos foram anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de cetamina 30 mg/kg (Ketamin[®], Cristália – 50 mg/mL) e cloridrato de xilasina 4 mg/kg (Coopazine[®], Schering-Plough Coopers – 20 mg/mL) e instilação tópica de cloridrato de tetracaína 100 mg/mL e cloridrato de fenilefrina 1 mg/mL (Anestésico colírio[®], Allergan).

Para introdução dos implantes na cavidade vítrea, foi realizada uma esclerotomia no quadrante temporal superior a cerca de 2 mm do limbo. Os sistemas poliméricos foram inseridos na cavidade vítrea por meio de um trocater transescleral de 25G - Alcon (Figura 7). Não houve necessidade de sutura. A avaliação clínica dos animais foi realizada semanalmente durante 42 dias.

Figura 7 - Procedimento cirúrgico para a inserção do implante intraocular: (a) determinação do local de inserção do trocater; (b) introdução do trocater no globo ocular; (c) cânula do trocater inserido no globo ocular; (d) introdução do implante na cavidade vítrea



O estudo de liberação *in vivo* do antitumoral não foi realizado para os implantes de PCL, uma vez que esses sistemas foram friáveis, não permitindo a realização do procedimento cirúrgico.

5.22.2 Obtenção das amostras de humor vítreo

Quatro animais do grupo 1 e dois do grupo 2 foram sacrificados com dose letal de pentobarbital 100 mg/kg após 7, 14, 21, 29, 35 e 42 dias de implantação dos sistemas desenvolvidos. O olho direito dos animais foi enucleado; e o humor vítreo foi completamente removido e imediatamente armazenado em freezer a - 20 °C até ser feita a análise para determinação da concentração do etoposídeo. Os dispositivos poliméricos implantados também foram removidos dos olhos dos animais e armazenados a - 20 °C até a quantificação do etoposídeo não liberado na

cavidade vítrea. As amostras permaneceram armazenadas a - 20 °C, por no máximo, vinte dias.

5.22.3 Quantificação de etoposídeo nas amostras de humor vítreo e nos implantes removidos da cavidade vítrea dos olhos dos coelhos

Para a quantificação de etoposídeo nas amostras de humor vítreo, essas foram descongeladas a temperatura ambiente e analisadas por meio do método cromatográfico descrito no *item 5.21*. A concentração intravítrea do fármaco dos animais do Grupo I em todos os períodos do estudo (7, 14, 21, 29, 35 e 42 dias) foi comparada por ANOVA e teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

O etoposídeo, que permaneceu nos implantes após serem mantidos na cavidade vítrea dos olhos de coelhos por diferentes períodos, foi quantificado por CLAE, empregando o método descrito no *item 5.12*. Cada implante removido dos olhos dos coelhos foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, no qual foram adicionados 4 mL de acetonitrila e o volume foi ajustado com mistura de tampão acetato pH 4,56 (0,05 mol/L) e PBS (5:95). Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de etoposídeo remanescente nos implantes de PLGA em relação à concentração inicial.

A porcentagem de etoposídeo liberado a cada tempo, a partir dos implantes de PLGA, na cavidade vítrea dos olhos dos coelhos foi calculada pelo emprego da *Equação 6*:

$$\text{Etoposídeo liberado a partir do implante de PLGA (\%)} = \frac{(ETP_0 - ETP_{Rt})}{ETP_0} \times 100 \quad (6)$$

em que ETP_0 corresponde ao conteúdo inicial de etoposídeo nos implantes de PLGA antes da inserção na cavidade vítrea, e ETP_{Rt} é a quantidade de fármaco presente no implante após a sua remoção no tempo t .

A média da porcentagem de fármaco liberado a cada tempo foi calculada e utilizada para construir a curva do perfil de liberação *in vivo*.

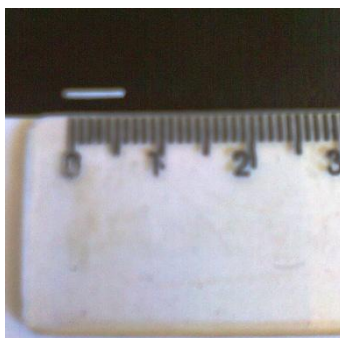
RESULTADOS E DISCUSSÃO

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Preparo dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL

Os implantes desenvolvidos consistiram de sistemas cilíndricos com peso médio de $2,26 \pm 0,08$ mg, comprimento médio de $6,34 \pm 0,18$ mm e diâmetro médio de $0,62 \pm 0,02$ mm ($n=10$) (Figura 8). Tais implantes foram preparados pelo método de fusão seguido pela moldagem a quente. O método de fusão consiste, inicialmente, em fundir o polímero, e em seguida, dispersar o fármaco na matriz fundida. Logo, polímeros que apresentam baixa temperatura de fusão, como é o caso da PCL ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$), são ideais para o preparo dos implantes por este método, visto que temperaturas mais baixas são empregadas no procedimento, minimizando, assim, a degradação térmica do fármaco (LI *et al.*, 2010). O método de fusão apresenta as vantagens de ser um processo facilmente executável, e que não há a necessidade de utilização de solventes orgânicos.

Figura 8 - Implante de PCL contendo etoposídeo (50% p/p)



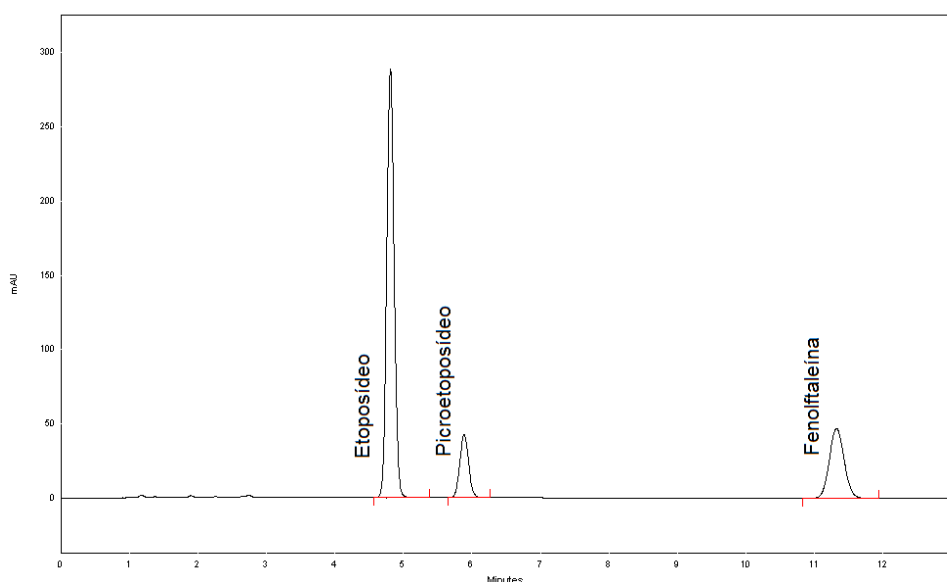
A PCL é um material hidrofóbico capaz de incorporar fármacos, como o etoposídeo, em suas cadeias poliméricas. A moldagem a quente da matriz polimérica contendo o fármaco, em temperatura próxima a fusão da PCL, permitiu a obtenção de dispositivos sólidos implantáveis. A moldagem a quente também foi utilizada por Saliba *et al.* (2008) e Cheng *et al.* (2009) para preparo de implantes poliméricos.

6.2 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL

A determinação das condições analíticas para a quantificação de etoposídeo em implantes de PCL por CLAE foi baseada no método preconizado pela Farmacopeia Internacional (INTERNATIONAL..., 2006) para o doseamento deste fármaco em matéria-prima.

Objetivando a redução do tempo de análise das amostras contendo etoposídeo, a proporção de acetonitrila na fase móvel foi aumentada de 24% (condição analítica farmacopeica) para 27% (v/v), o que promoveu a diminuição do tempo de corrida de 24 para 18 minutos. Quando a proporção de 30% (v/v) foi testada, o tempo de análise reduziu para 13 minutos. Para avaliar os efeitos na mudança da condição cromatográfica, foi calculada a resolução entre os picos do etoposídeo e do picroetoposídeo (epímero formado em meio alcalino, pH 9) presentes no cromatograma da solução de resolução (Figura 9). O valor de resolução encontrado foi superior a dois (SNYDER *et al.*, 1997) em todas as condições testadas, demonstrando a completa separação entre o etoposídeo e o seu produto de degradação. Assim, a proporção de acetonitrila de 30% foi a condição analítica selecionada para o método por CLAE.

Figura 9 - Cromatograma obtido para solução de resolução, empregando fase móvel composta por acetonitrila e ácido acético 4% (v/v) (30:70), fluxo de 2 mL/min, coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) a 25 °C e detecção a 285 nm



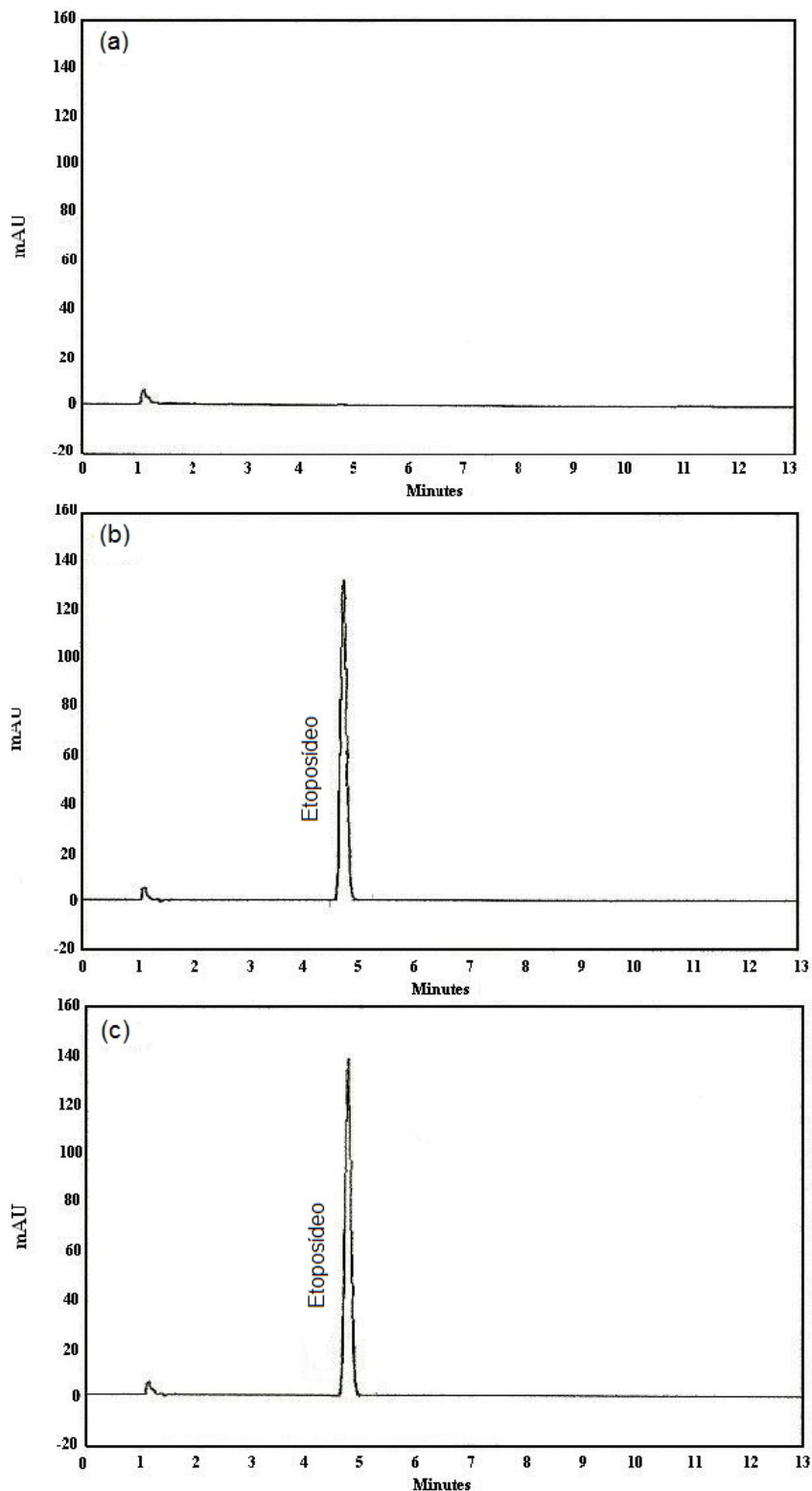
6.2.1 Validação

6.2.1.1 Seletividade

Após avaliação do espectro de etoposídeo na região do ultravioleta (200 a 400 nm), 285 nm foi selecionado para detecção e realização das análises, devido à alta absorção deste fármaco neste comprimento de onda e elevada seletividade em relação à possível interferência da PCL presente nas amostras. Essa seletividade foi confirmada pelo cromatograma da solução de PCL na concentração de 35 µg/mL (Figura 10), no qual não foram observados picos interferentes no mesmo tempo de retenção do etoposídeo.

A seletividade do método também foi avaliada por meio da comparação da concentração de etoposídeo determinada em soluções padrão de etoposídeo a 35 µg/mL com e sem adição de PCL (35 µg/mL). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as concentrações médias de etoposídeo determinadas para os dois grupos de soluções: soluções padrão de etoposídeo ($35,03 \pm 0,93$ µg/mL) e soluções padrão de etoposídeo adicionada de PCL ($35,04 \pm 0,40$ µg/mL). Além disso, foram obtidos altos valores de pureza dos picos de etoposídeo para as amostras de padrão (99,97%) e de implantes (99,94%), sugerindo que não houve co-eluição de outros compostos com o pico de interesse. Considerando esses resultados, o método desenvolvido apresentou seletividade adequada para a determinação de etoposídeo em implantes de PCL.

Figura 10 - Cromatogramas obtidos para solução de PCL a 35 $\mu\text{g/mL}$ (a); solução padrão de etoposídeo a 35 $\mu\text{g/mL}$ (b) e solução contendo PCL (35 $\mu\text{g/mL}$) e etoposídeo (35 $\mu\text{g/mL}$) (c)



Nota: As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel composta por acetonitrila e ácido acético 4% (v/v) (30:70), fluxo de 2 mL/min, coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm) a 25 $^{\circ}\text{C}$ e detecção a 285 nm.

6.2.1.2 Linearidade

Foi verificada que, sob as condições experimentais do método cromatográfico e dentro da faixa de 5 a 65 µg/mL, a regressão entre as concentrações de etoposídeo e as áreas do pico foi significativa ($p < 0,05$). O modelo linear foi adequado para as duas curvas analíticas, obtidas em dias diferentes, apresentando normalidade e independência dos resíduos, homocedasticidade e desvio de linearidade não significativo (Tabela 12) (MONTGOMERY *et al.*, 2001; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005)

Tabela 12 - Parâmetros da análise de regressão linear dos resultados obtidos para etoposídeo na faixa entre 5 e 65 µg/mL

Parâmetros da análise de regressão	Curva analítica - dia 1	Curva analítica - dia 2
Inclinação ± desvio padrão	28510 ± 167,8	27290 ± 899,4
Intercepto ± desvio padrão	- 3891 ± 5922	- 2835 ± 3593
Coefficiente de determinação (r^2)	0,999	0,996
Coefficiente de correlação (r)	1,000	0,993
Normalidade dos resíduos (Coefficiente de correlação do teste de Ryan-Joiner)	0,951 ($R_{\text{crítico}} = 0,950$) ^a	0,957 ($R_{\text{crítico}} = 0,950$) ^a
Independência dos resíduos (Estatística de Durbin-Watson)	2,64 (1,33-2,67) ^a	1,80 (1,35 – 2,65) ^a
Homocedasticidade (Estatística t de Levene)	-1,03 ($t_{\text{crítico}} = 2,10$) ^a	0,26 ($t_{\text{crítico}} = 2,10$) ^a
Falta de ajuste ($p_{\text{calculado}}$)	0,110 ^b	0,823 ^b

Nota: ^a valores críticos para avaliação do teste de hipóteses. Para aceitação das hipóteses nulas, que consistem nos resíduos seguirem a distribuição normal, serem independentes e apresentarem homocedasticidade, deve-se ter: coeficiente de correlação $> R_{\text{crítico}}$ para o teste de normalidade; estatística de Durbin-Watson dentro dos limites calculados para verificação da independência dos resíduos; estatística t de Levene $> t_{\text{crítico}}$. Considerou-se para todos os testes $\alpha=0,05$.

^b $p > 0,05$.

As duas curvas analíticas apresentaram coeficiente de correlação superior a 0,99 (Tabela 12), conforme critério estabelecido pela Resolução RE n° 899/2003 (BRASIL, 2003). O coeficiente de determinação de ambas as curvas também foi superior a 0,99, indicando que mais de 99% da variação total das áreas do pico do etoposídeo foram explicados pela variação da concentração deste fármaco (MONTGOMERY *et al.*, 2001).

A duas retas foram comparadas e as diferenças entre os interceptos e as inclinações não foram significativas. Considerando os resultados obtidos, o método apresentou relação linear adequada entre a área do pico e a concentração do antitumoral, na faixa entre 5 a 65 µg/mL.

6.2.1.3 Precisão

As precisões intradia e interdias foram avaliadas por meio de três determinações em três níveis de concentração: baixo (5 µg/mL), médio (35 µg/mL) e alto (65 µg/mL). Os valores de concentração média de etoposídeo e DPR estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores de concentração média e DPR obtidos para avaliação da precisão intradia e interdias do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL

Concentração (µg/mL)	Precisão intra-corrida (n=3)		Precisão inter-corridas (n=6)	
	Concentração média (µg/mL)	DPR (%)	Concentração média (µg/mL)	DPR (%)
5	5,10	0,2	5,14	1,9
35	34,72	2,3	34,44	1,8
65	64,82	1,1	64,40	1,5

Os valores de DPR foram inferiores a 5% para todos os níveis de concentrações testadas, indicando que o método apresentou precisão intradia e interdias adequadas (BRASIL, 2003).

6.2.1.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo ensaio de recuperação, em três níveis de concentração. Os testes foram realizados em dois dias diferentes e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Porcentagem de recuperação de etoposídeo para avaliação de exatidão do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL

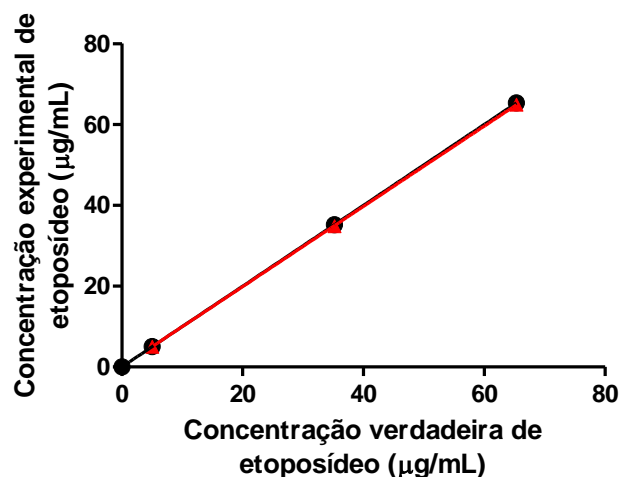
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão intradia				Exatidão interdias (n=6)	
	Dia 1 (n=3)		Dia 2 (n=3)		Recuperação média (%)	DPR (%)
	Recuperação média (%)	DPR (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)		
5	101,5	0,2	100,3	1,2	100,9	1,0
35	98,7	2,2	98,6	2,1	98,7	1,9
65	99,2	1,1	98,5	0,4	98,9	0,8

Os valores de porcentagem de recuperação entre 98% e 102% indicam que o método cromatográfico apresentou exatidão satisfatória para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL (GREEN, 1996).

A proximidade dos resultados encontrados ao valor aceito como verdadeiro é resultante da soma de erros sistemáticos e randômicos ou aleatórios, isto é, do erro total associado ao resultado. Portanto, a exatidão pode ser estudada como duas componentes: tendência (*bias*) e precisão (desvio padrão) (HUBERT *et al.*, 2007a).

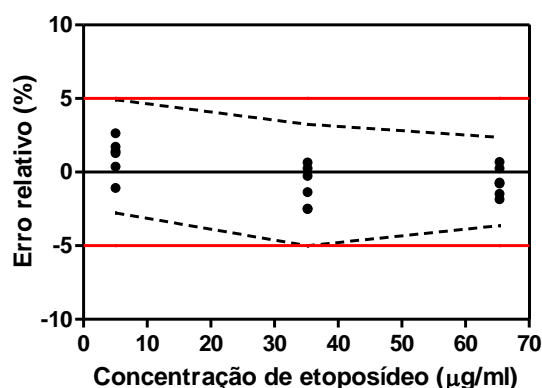
A tendência está relacionada com os erros sistemáticos do procedimento analítico e pode ser avaliada ao se plotar o valor esperado *versus* o observado. Neste caso, espera-se obter uma reta cujo intercepto seja igual a zero e a inclinação igual a um (CAULCUTT; BODDY, 1983; JARDY; VIAL, 1999). A Figura 11 apresenta o gráfico obtido ao se plotar os valores esperados de concentração de etoposídeo *versus* os resultados experimentais. O intercepto da reta experimental foi igual a 0,042, contudo seu intervalo de confiança incluiu o valor zero (-0,354 a 0,439). Desta forma, não existe evidência suficiente de que o valor do intercepto seja diferente de zero. Em relação à inclinação, o intervalo de confiança incluiu o valor um (0,983 a 1,001), logo a inclinação não é diferente de um. Em vista disso, os resultados obtidos nas análises realizadas não apresentaram erros sistemáticos (*bias*).

Figura 11 - Concentração de etoposídeo esperada *versus* concentração determinada experimentalmente para avaliação de tendência. Reta ideal (em preto): $y = x$; reta experimental (em vermelho): $y = (0,042 \pm 0,187) + (0,992 \pm 0,004)x$



O β -intervalo de tolerância é o intervalo que contém $\beta\%$ dos resultados individuais futuros. Dois termos são contidos no intervalo de tolerância, sendo que um deles é a veracidade e o outro é o coeficiente de variação da precisão intermediária. Por esta razão, o intervalo de tolerância pode ser considerado como uma expressão da exatidão dos resultados (HUBERT *et al.*, 2007b). A Figura 12 apresenta o β -intervalo de tolerância, a um nível de significância de 5%, que foi calculado segundo os procedimentos descritos por Hubert *et al.* (2007b). O β -intervalo de tolerância para cada nível de concentração encontra-se inserido no limite de variação máxima de 5% (ROZET *et al.*, 2007), confirmando que o método apresentou exatidão adequada.

Figura 12 - Erro relativo *versus* concentração de etoposídeo, com intervalo de tolerância a 95% (linhas tracejadas) e limites de aceitação de $\pm 5\%$ (em vermelho)



6.2.1.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação estimado pelos parâmetros da equação da curva analítica foi igual a 1,76 µg/mL. Baseado neste valor, soluções de PCL (35 µg/mL) adicionadas de etoposídeo em diferentes concentrações foram analisadas e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 15. A concentração de 2 µg/mL foi definida como o limite de quantificação do método, desde que nesta concentração resultados precisos (DPR < 5%) e exatos (porcentagem de recuperação entre 98% e 102%) foram obtidos.

Tabela 15 - Valores de concentração média, DPR e porcentagem de recuperação média para determinação do limite de quantificação do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL

Concentração (µg/mL)	Concentração média (µg/mL)	DPR (%)	Recuperação média (%)
1	2,40	28,3	159,8
1,5	2,33	14,2	155,2
1,75	2,22	10,2	126,6
2	2,04	2,8	100,8

6.2.1.6 Robustez

A robustez do método cromatográfico foi avaliada por meio do método proposto por Youden e Steiner (1975), em que foi avaliada a influência de sete parâmetros analíticos sobre a área do pico, tempo de retenção, assimetria, número de pratos teóricos, resolução e conteúdo de etoposídeo nos implantes. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultado do efeito dos parâmetros analíticos sobre a área, tempo de retenção (t_r), assimetria, número de pratos teóricos (N), teor de etoposídeo e resolução do método por CLAE para determinação de etoposídeo em implantes de PCL

Parâmetros analíticos	Efeito X/x^a (valor absoluto)					
	Área	t_r	Assimetria	N	Teor	Resolução ^b
Proporção de acetonitrila na fase móvel (% v/v) (A= 30; a= 32)	16021	1,0198 ^c	0,0061	425,88	2,5212	0,8251 ^c
Concentração de ácido acético na fase móvel (% v/v) (B= 4; b= 4.2)	31162	0,4943	0,0042	378,13	3,2503	0,3755
Temperatura do compartimento das amostras (°C) (C= 25; c= 30)	24875	0,0220	0,0039	91,63	2,1412	0,0161
Temperatura da coluna (°C) (D= 25; d= 30)	22994	0,0333	0,0013	615,38	2,3354	0,0288
Fluxo da fase móvel (mL/min) (E= 2; e= 1.8)	117526	0,5840	0,0026	821,63	0,6057	0,2809
Proporção de acetonitrila nas soluções padrão e amostra de etoposídeo (% v/v) (F= 13; f= 20)	94185	0,0375	0,0041	43,88	3,1928	0,0167
Comprimento de onda de detecção (nm) (G= 285; g= 287)	2792	0,0250	0,0026	41,88	0,8035	0,0116
Valor crítico	119681	0,9648	0,0076	891,28	4,6700	0,7180

Nota: ^a Diferença entre as médias dos valores obtidos sob as condições nominais e dos valores obtidos sobre as condições alteradas.

^b Resolução entre os picos do etoposídeo e do picoetoposídeo.

^c Efeito significativo.

O método cromatográfico para quantificação de etoposídeo em implantes poliméricos foi robusto em relação à maioria dos parâmetros analíticos investigados, uma vez que a diferença entre os resultados obtidos sob as condições nominais e sob as condições modificadas foi menor que o valor crítico para o parâmetro analítico analisado. A variação na proporção de acetonitrila na fase móvel foi a única condição analítica com efeito significativo sobre o tempo de retenção do pico do etoposídeo e sobre a resolução entre o pico do fármaco e seu produto de degradação. O aumento da proporção de acetonitrila na fase móvel promoveu o aumento da sua força eluente, proporcionando, assim, a redução do tempo de retenção do pico e da resolução. Apesar da observação de redução da resolução, os valores deste parâmetro ainda permaneceram acima de dois, demonstrando a completa separação entre o etoposídeo e o picroetoposídeo.

6.3 Quantificação de etoposídeo em implantes de PCL

O método cromatográfico foi aplicado para quantificação de etoposídeo incorporado aos implantes de PCL. O teor médio de etoposídeo para os implantes analisados foi $101,41 \pm 1,03$ % (n=6) do valor rotulado (50% p/p).

6.4 Caracterização dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL

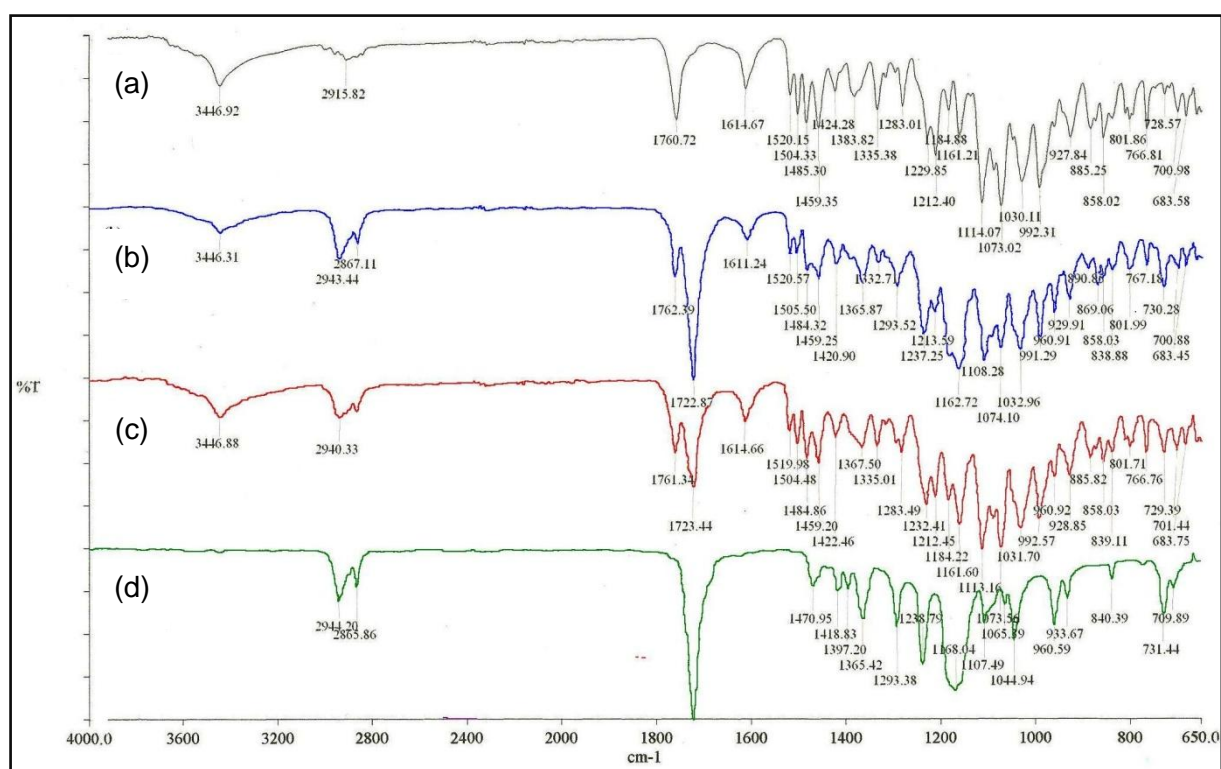
A taxa de liberação do fármaco a partir dos implantes poliméricos depende das condições do meio, das propriedades físico-químicas do polímero, das características do fármaco, da organização dos constituintes no sistema, da forma e dimensão dos implantes e da quantidade de princípio ativo incorporada ao sistema (LI *et al.*, 2010). Assim, FTIR, análise térmica, WAXS e SEM foram utilizadas para investigar algumas propriedades dos implantes e de seus componentes.

6.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

O espectro do etoposídeo (Figura 13a) na região do infravermelho apresentou uma banda característica a 3446 cm^{-1} correspondente ao estiramento de $-\text{OH}$

fenólico, bandas a 1614, 1504 e 1459 cm^{-1} referentes ao estiramento de C=C de grupos aromáticos, e uma banda a 1760 cm^{-1} atribuída ao estiramento do grupo carbonila do anel lactona. Resultados semelhantes a estes foram encontrados por Shah e colaboradores (2013). No espectro da PCL (Figura 13d) foram observadas bandas a 2944 e 2865 cm^{-1} correspondentes ao estiramento de $-\text{CH}_2$, e uma banda intensa a 1724 cm^{-1} atribuída ao estiramento do grupo carbonila de éster. As bandas de absorção típicas dos grupos funcionais presentes no etoposídeo e PCL foram observadas nos espectros da mistura física e do implante (Figura 13b-c), indicando que a integridade química do fármaco foi mantida após a sua incorporação na matriz polimérica.

Figura 13 - Espectros na região do infravermelho de etoposídeo (a), implantes constituídos de etoposídeo e PCL (1:1) (b), mistura física de etoposídeo e PCL na proporção 1:1 (c) e PCL (d)

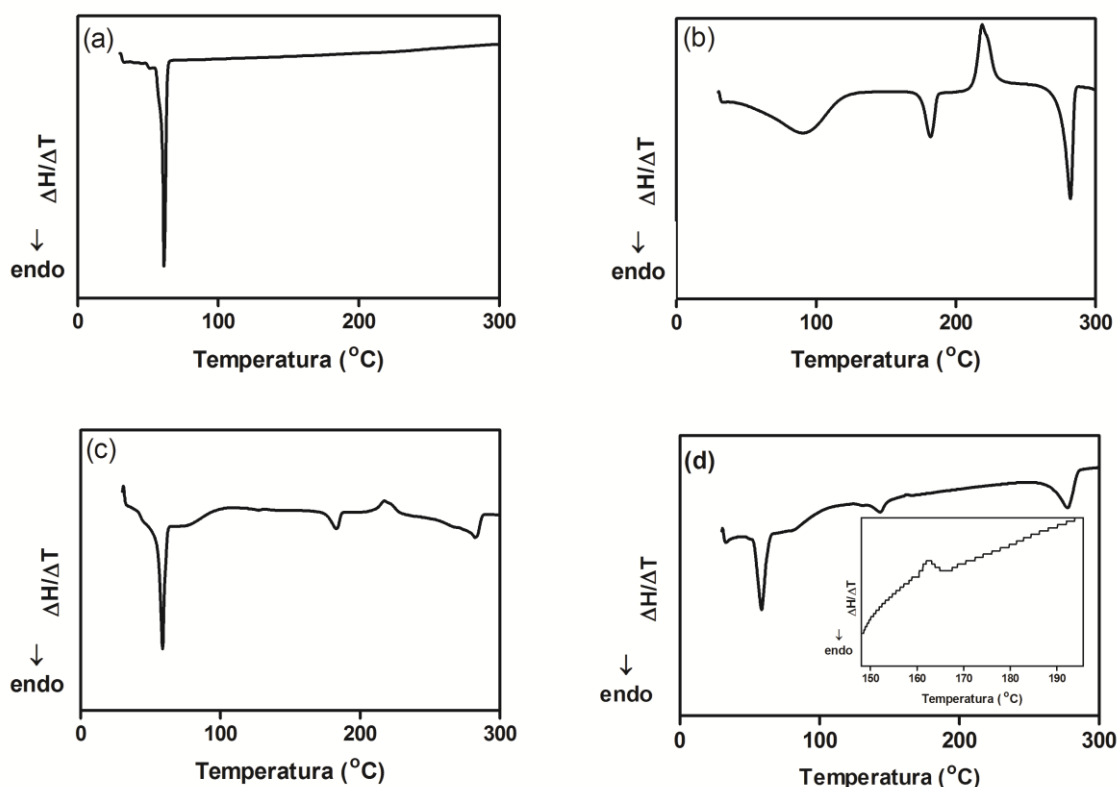


6.4.2 Análise térmica

A análise térmica tem sido utilizada para determinar o estado físico do polímero e do fármaco na formulação e para avaliar a possibilidade da ocorrência de

interações entre os constituintes dos implantes (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Assim, o comportamento térmico do etoposídeo, PCL, mistura física de etoposídeo e PCL e implantes foi analisado por DSC e TG.

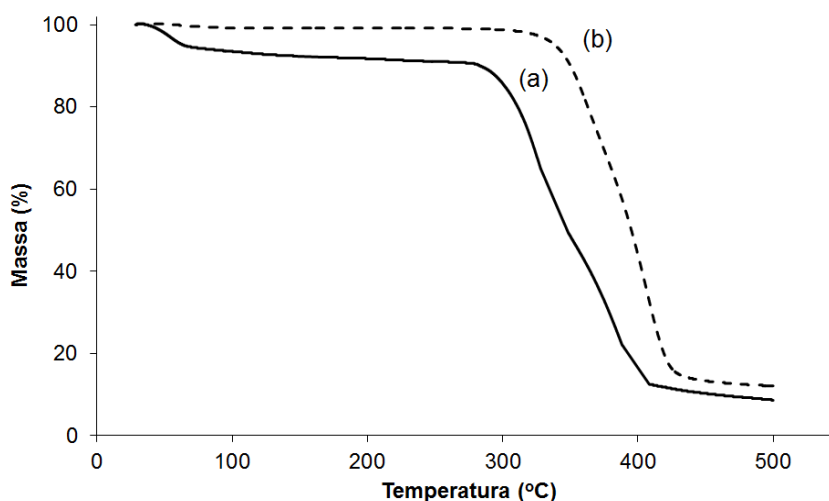
Figura 14 - Curvas de DSC da PCL (a), etoposídeo (b), mistura física de etoposídeo e PCL (c) e implantes constituídos de etoposídeo e PCL (1:1) (d)



A Figura 14a apresenta a curva de DSC da PCL, na qual pode ser observada a ocorrência de um evento endotérmico em 61 $^{\circ}\text{C}$, característico da fusão do polímero (CHENG *et al.*, 2010). A curva de DSC do etoposídeo (Figura 14b) apresentou um pico endotérmico largo, entre 41,8 e 121 $^{\circ}\text{C}$, atribuído à reação de desidratação, o que foi confirmado no termograma do fármaco (Figura 15a). Este evento endotérmico também foi observado por Jasti *et al.* (1995). Após a desidratação do fármaco, não houve perda significativa de massa até a decomposição do etoposídeo, que foi observada em temperatura acima de 290 $^{\circ}\text{C}$, conforme Figura 15a (JASTI *et al.*, 1995; SHAH *et al.*, 2013). Desta forma, a temperatura empregada para a incorporação do fármaco à matriz polimérica, bem como para a moldagem dos implantes (60 $^{\circ}\text{C}$) não representa um risco para a estabilidade do etoposídeo, pois se encontra bem abaixo da temperatura de

degradação do antitumoral. Na Figura 14b, foi observado um segundo pico endotérmico, no intervalo de 173 a 187 °C, que pode estar relacionado à possível fusão do etoposídeo (MOHANTY *et al.*, 2010). O terceiro pico correspondeu a um evento exotérmico (213 – 230 °C), que provavelmente está relacionado com a recristalização do fármaco a uma forma polimórfica diferente, uma vez que a ocorrência de um evento endotérmico seguido por um exotérmico, geralmente, está associada às transições polimórficas, devido à fusão seguida por recristalização (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Jasti e colaboradores (1995) estudaram as formas polimórficas de etoposídeo e relataram que o fármaco, após a sua desidratação e fusão, recristaliza em uma forma polimórfica diferente a 206 °C. O quarto evento endotérmico no intervalo de 270 a 286 °C (Figura 14b) pode ser atribuído à fusão do etoposídeo recém-cristalizado, como relatado anteriormente por Shah *et al.* (2013) e Jasti *et al.* (1995). A decomposição do fármaco ocorre logo após a sua fusão, fato que pode ser confirmado na Figura 15a, como anteriormente relatado.

Figura 15 – Perfil termogravimétrico do etoposídeo (a) e implantes constituídos de etoposídeo e PCL (1:1) (b)



A curva de DSC da mistura física do etoposídeo e polímero, na proporção de 1:1, é apresentada na Figura 14c. Um comportamento térmico similar ao identificado para o fármaco e polímero puros foi observado, sendo: o primeiro evento endotérmico (51,5 - 63,3 °C) devido à fusão da PCL; o segundo pico endotérmico (174 – 188 °C) atribuído à fusão do etoposídeo, seguido pelo evento exotérmico devido à transição polimórfica que ocorre na faixa de temperatura de 209 a 230 °C.

Finalmente, o evento entre 261 e 288 °C é atribuído à fusão da forma polimórfica do etoposídeo. A curva de DSC dos implantes (Figura 14d) apresentou uma variação endotérmica em 58 °C referente à fusão da PCL. Um pico endotérmico largo (135 – 150 °C) e um evento exotérmico de baixa intensidade (160 – 165 °C) foram atribuídos à fusão e recristalização do etoposídeo, respectivamente. A fusão e a transição de fase do fármaco ocorreram em temperaturas menores que as identificadas para o etoposídeo puro, o que poderia ser explicado pela possível dispersão do antitumoral no polímero fundido durante o processo de preparo dos implantes. Comportamento térmico similar a este foi relatado previamente por Cheng e colaboradores (2010). O evento endotérmico observado na faixa entre 261 e 285 °C pode ser atribuído à fusão da forma polimórfica do etoposídeo.

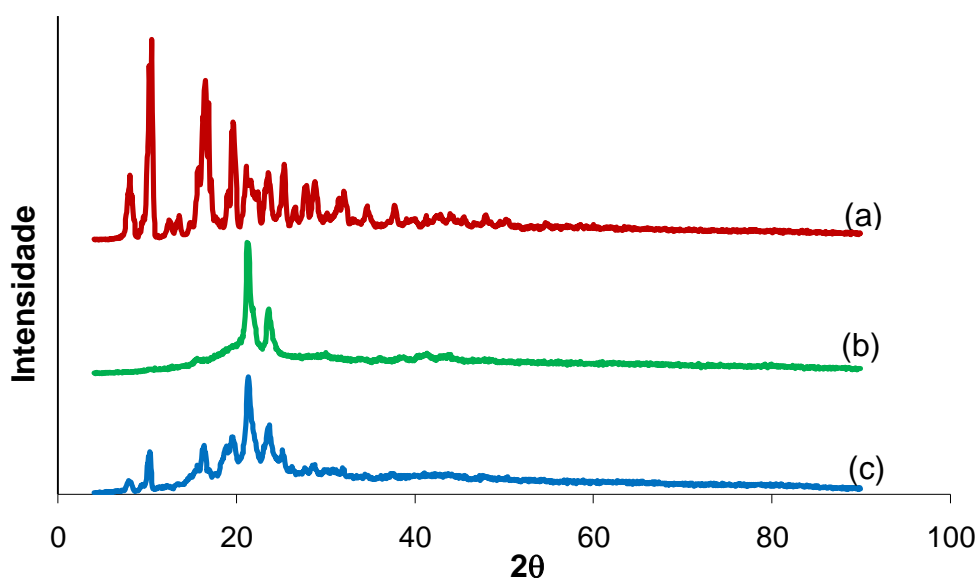
O termograma do implante (Figura 15b) apresentou um evento único e bem definido correspondente à degradação térmica do sistema polimérico, a qual ocorreu em temperatura superior a 342 °C. Estes dados confirmam um incremento na estabilidade térmica do etoposídeo incorporado ao implante polimérico. O aumento da estabilidade térmica de fármacos incorporados a sistemas poliméricos foi descrito no estudo de Oliveira *et al.* (2013), no qual foi observada a decomposição do metotrexato encapsulado em nanopartículas de PLGA em temperatura superior aquela verificada para o fármaco puro.

6.4.3 Difração de raios-X em baixo ângulo

A análise de WAXS foi empregada para caracterizar o estado cristalino do fármaco e do polímero no implante. A forma e intensidade das bandas no padrão de WAXS para o etoposídeo (Figura 16a) confirmam a natureza cristalina do fármaco, sendo que foram observadas seis bandas principais em 10,53°; 16,53°; 19,65°; 21,09°; 23,55° e 25,35° (2 θ). Duas bandas características a 2 θ = 21,21° e 2 θ = 23,61° foram observadas no padrão de WAXS para a PCL (Figura 16b), confirmando a sua estrutura semi-cristalina (WANG et al., 2008). As bandas características do fármaco e do polímero foram observadas no padrão de WAXS do implante (Figura 16c), porém com menor intensidade que para o fármaco e polímero puros. Tal fato sugere que parte dos cristais de etoposídeo foi dissolvida na PCL fundida durante o

processo de preparo dos implantes. Esses dados confirmam os resultados obtidos na análise térmica.

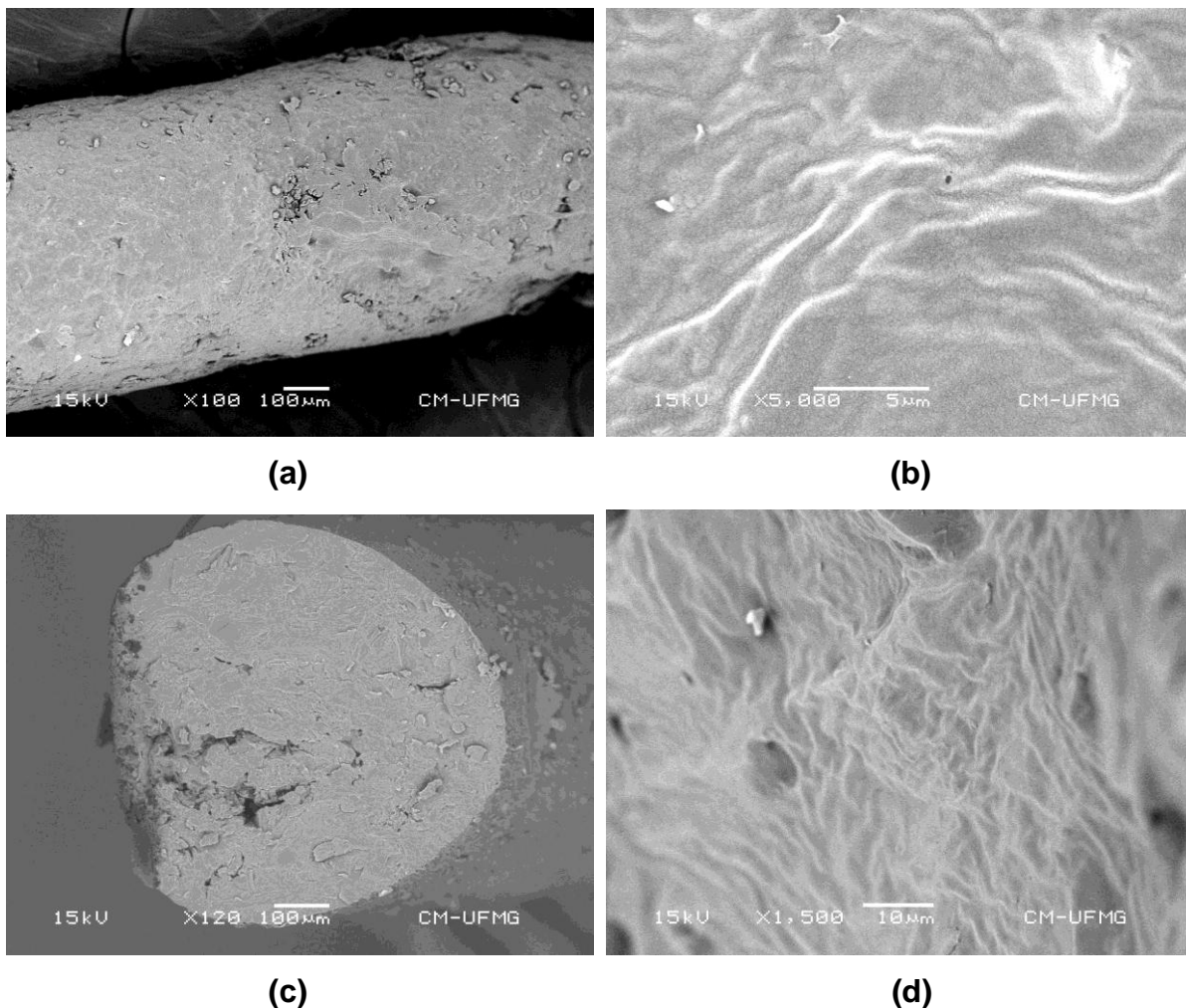
Figura 16 - Padrões de WAXS para etoposídeo (a), PCL (b) e implantes constituídos de PCL e etoposídeo (1:1) (c)



6.4.4 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia dos implantes é uma característica importante para a liberação do fármaco a partir do sistema polimérico. Em sistemas monolíticos, como é o caso dos implantes constituídos por PCL e etoposídeo, a liberação do fármaco pode ser resultante da difusão do fármaco, da degradação do polímero ou da combinação de ambos os mecanismos. Em escala macroscópica, a difusão do princípio ativo pode ocorrer através dos poros da matriz. Portanto, a presença destes poros ou canais na matriz pode favorecer a difusão do fármaco, que provavelmente, não será controlada pela velocidade de degradação do polímero (KIMURA; OGURA, 2001; MCDONALDS *et al.*, 2010). A superfície dos implantes desenvolvidos se apresentou lisa e homogênea, sem evidência de poros ou canais (Figura 17 a-b). Contudo, a seção transversal dos implantes revelou poucos poros, como apresentado na Figura 17 c – d.

Figura 17 - Fotomicrografias dos implantes constituídos de PCL e etoposídeo (1:1): superfície externa em aumento de 100X (a) e 5000X (b); seção transversal em aumento de 120X (c) e 1500X (d)



6.5 Uniformidade de conteúdo

Uma possível desvantagem associada ao processo de preparo dos implantes pelo método de fusão é a falta de uniformidade da dispersão do fármaco na matriz polimérica, devido, principalmente, ao curto tempo de mistura dos componentes da formulação (CHENG *et al.*, 2009). Desta forma, o teste de uniformidade de conteúdo foi realizado para avaliar a etapa de mistura do processo de produção dos implantes. O teor de etoposídeo em todas as unidades testadas variou de 99,73% a 103,84% (DPR = 1,18%) do valor pré-definido para a formulação (50% p/p). Além disso, o limite de variação do conteúdo de fármaco destes implantes (3,49), calculado

conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira, foi inferior à especificação farmacopeica (15) (BRASIL, 2010), atendendo, portanto, aos critérios de avaliação do teste de uniformidade de conteúdo. Esses resultados confirmam que o etoposídeo apresentou uma distribuição uniforme nos implantes de PCL, apesar do curto tempo de mistura dos componentes da formulação durante o processo de produção dos dispositivos.

6.6 Resultados do processo de esterilização dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL

6.6.1 Avaliação da estabilidade dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL frente ao processo de esterilização

Os implantes contendo etoposídeo foram esterilizados por radiação ultravioleta. A exposição de fármacos a essa radiação pode promover a degradação destes compostos, e conseqüentemente, reduzir a sua atividade biológica.

Na literatura, não há relatos sobre a estabilidade do etoposídeo, no estado sólido, quando exposto à radiação ultravioleta. Estudos de degradação forçada (exposição à radiação de 320 – 400 nm, a 25 °C, por 8 h) deste fármaco, em solução metanólica na concentração de 100 µg/mL, comprovaram a formação de dois produtos de degradação. No entanto, as estruturas químicas não foram elucidadas pelos autores (AKHTAR *et al.*, 2013).

Em vista disso, o etoposídeo, exposto à radiação ultravioleta por trinta minutos (condição utilizada no processo de esterilização dos implantes), foi avaliado por meio da DSC e FTIR. Os resultados obtidos indicam que esse procedimento não promoveu modificação detectável na estrutura química do fármaco, uma vez que não foram observadas alterações no espectro na região do infravermelho (Figura 18) e na curva de DSC (Figura 19) do etoposídeo exposto à radiação.

Figura 18 – Espectro na região do infravermelho do etoposídeo antes (a) e após (b) ser submetido à radiação ultravioleta por trinta minutos

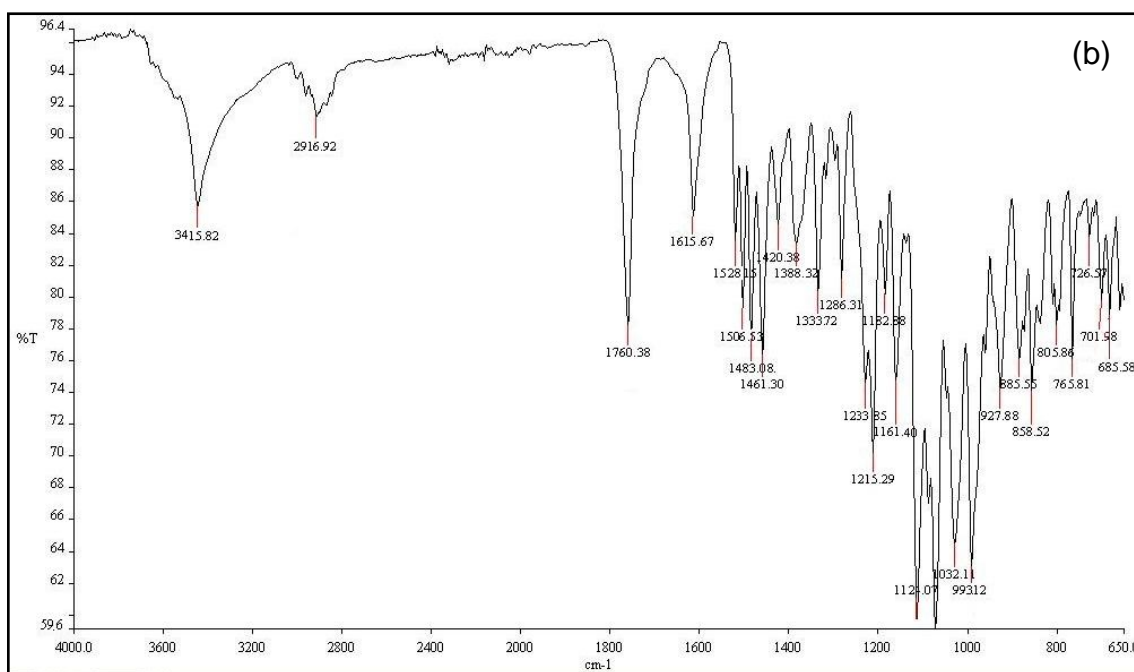
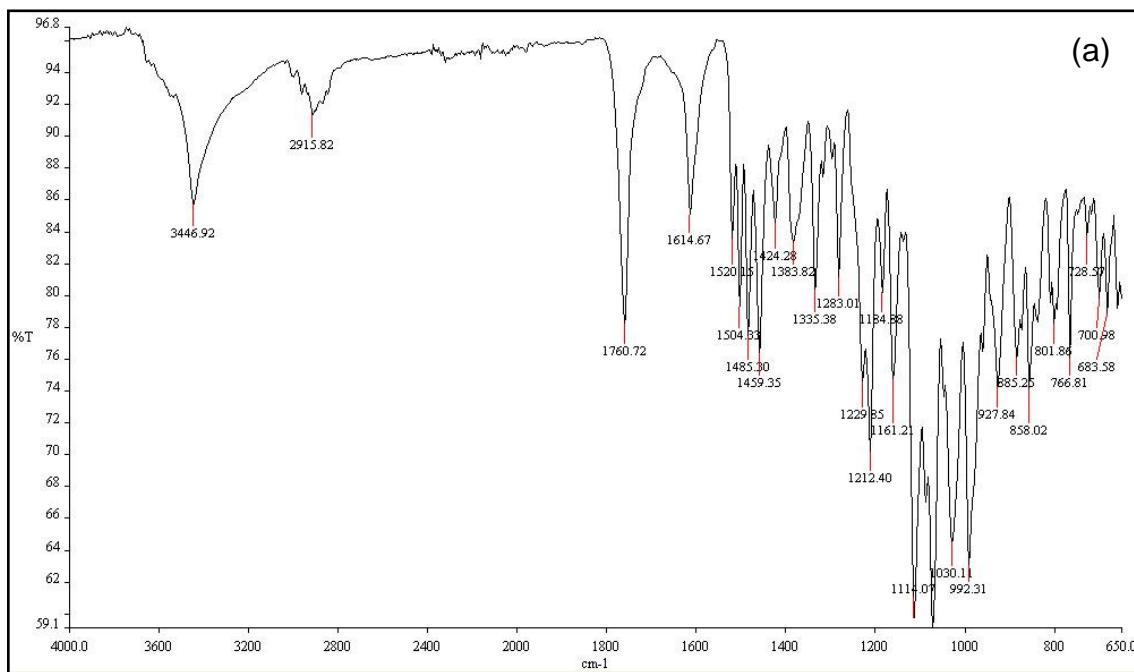
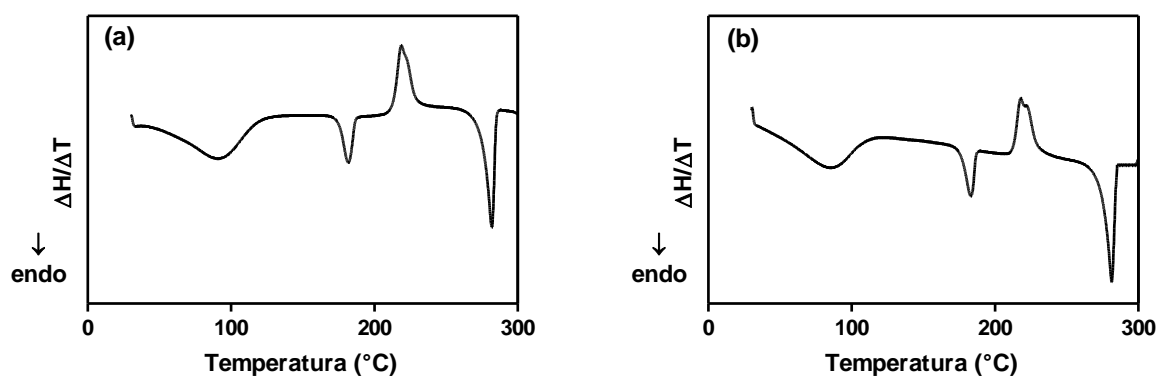
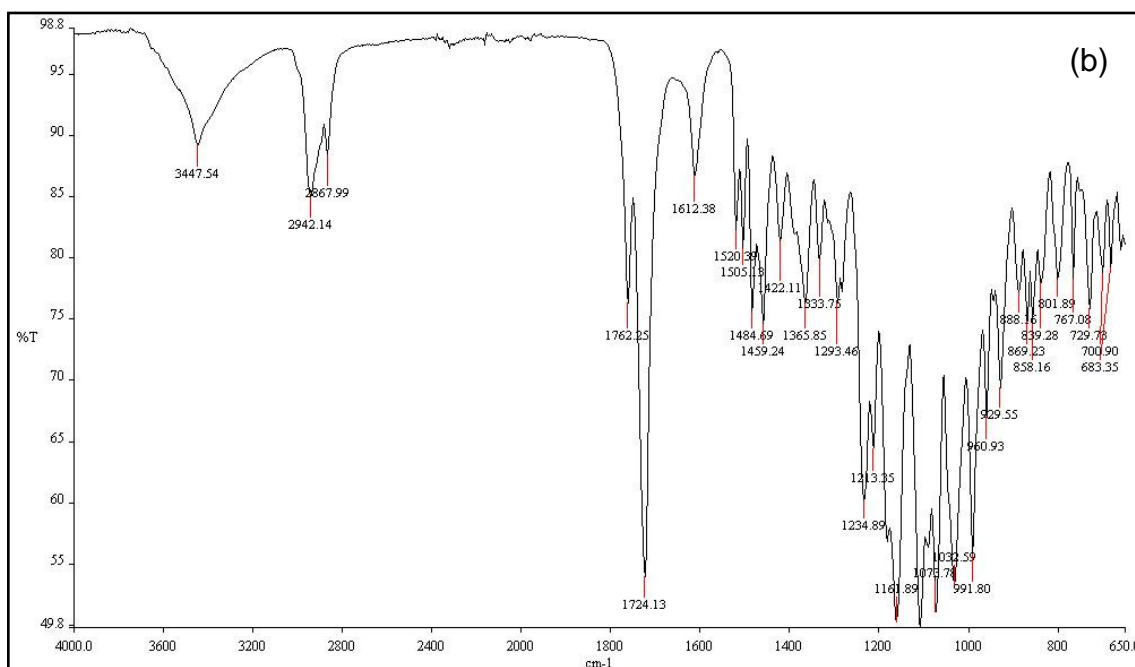
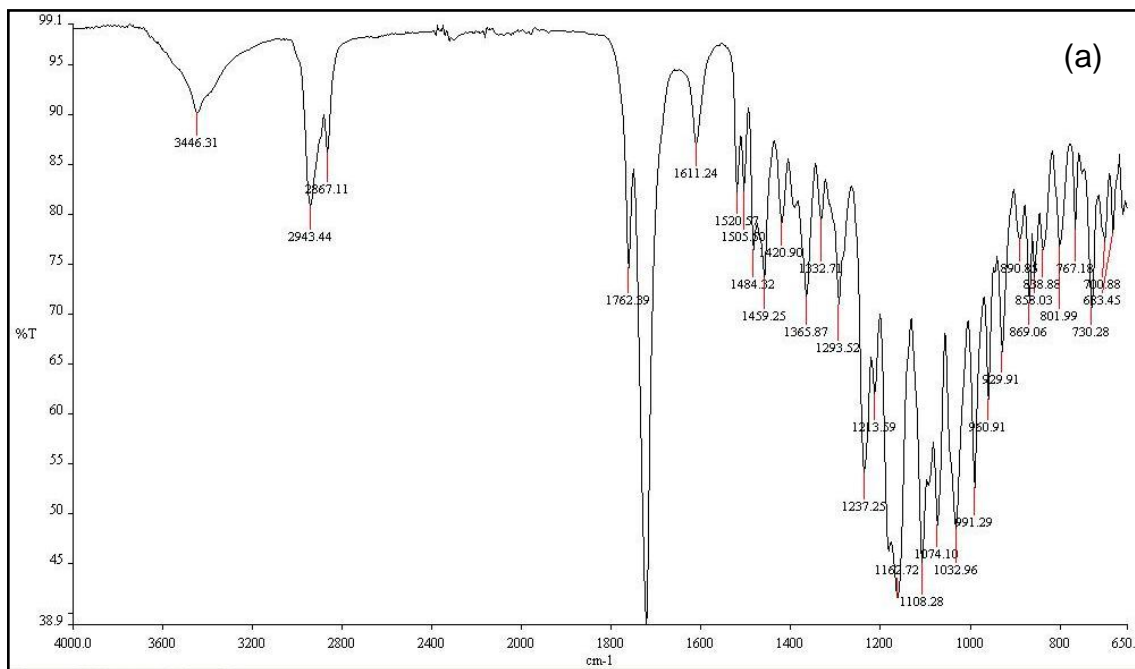


Figura 19 – Curvas de DSC do etoposídeo antes (a) e após (b) ser submetido à radiação ultravioleta por trinta minutos



Quando comparados os espectros na região do infravermelho dos implantes antes e após serem submetidos ao processo de esterilização (Figura 20), também não foram verificadas diferenças. Além disso, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o teor de etoposídeo presente nos implantes estéreis ($100,78 \pm 0,95 \%$) e não estéreis ($101,07 \pm 0,67 \%$). Esses resultados corroboram os dados descritos anteriormente para o etoposídeo, indicando que a integridade química do fármaco foi mantida após o processo de esterilização.

Figura 20 – Espectros de absorção na região do infravermelho dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL antes (a) e após (b) serem submetidos à radiação ultravioleta por trinta minutos



6.6.2 Teste de esterilidade

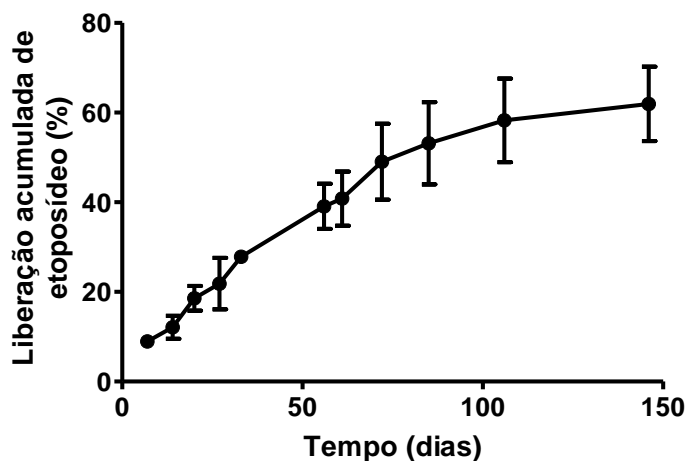
Não foi observado crescimento microbiano nos tubos contendo o implante e meio de cultura, confirmando a esterilidade dos sistemas expostos à radiação ultravioleta. O teste de esterilidade foi realizado conforme método direto descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), não havendo necessidade de alterações das condições de ensaio, uma vez que os constituintes do implante não apresentaram incompatibilidade físico-química com os meios de cultura e nem atividade antimicrobiana frente a alguns microrganismos padrão.

Os implantes confeccionados consistem em uma formulação extremamente simples, constituída apenas por etoposídeo e polímero, e na qual não houve o acréscimo de substâncias conservantes. Isso explica, em parte, a ausência do efeito bacteriostático e fungistático da formulação.

6.7 Avaliação *in vitro* da perda de massa, da absorção de água e perfil de liberação dos implantes constituídos de etoposídeo e PCL

O perfil de liberação *in vitro* do etoposídeo a partir dos implantes poliméricos foi obtido na forma de porcentagem acumulada de liberação do fármaco em função do tempo em dias (Figura 21). Os implantes poliméricos desenvolvidos promoveram a liberação do etoposídeo por longo período e apresentaram um padrão de liberação em duas etapas: um *burst* inicial de curta duração, seguido por uma fase de liberação lenta por tempo prolongado.

Figura 21 - Perfil de liberação acumulada *in vitro* de etoposídeo a partir dos implantes de PCL

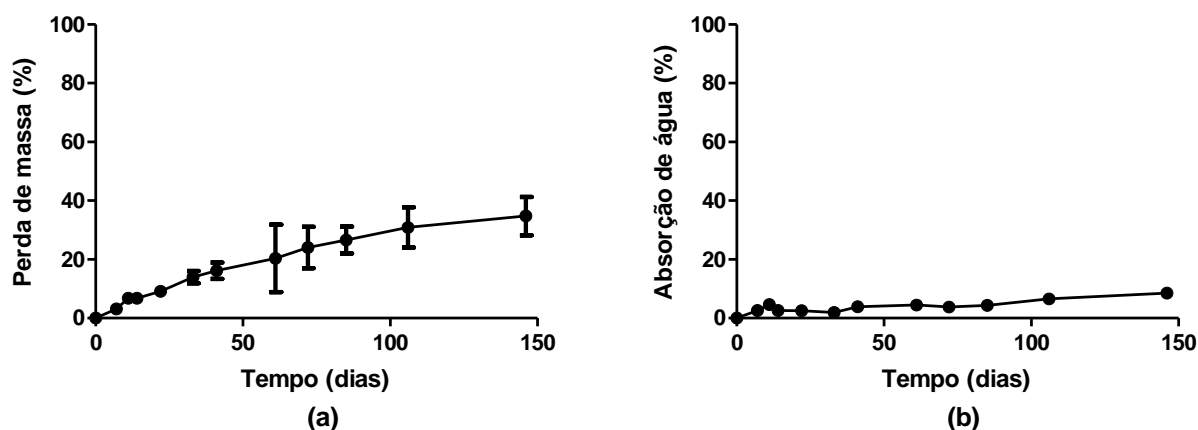


Nota: Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (n=5).

Durante os primeiros quinze dias, aproximadamente 12% do etoposídeo foram liberados a partir dos implantes. Na segunda fase, a taxa de liberação do fármaco reduziu gradualmente, e cerca de 60% do antitumoral foram liberados a partir do sistema polimérico.

A liberação de um fármaco a partir de um sistema monolítico pode ocorrer por difusão pelos poros da matriz, por degradação do polímero ou por uma combinação dos dois mecanismos (KIMURA; OGURA, 2001). Objetivando avaliar a possível contribuição da degradação da matriz polimérica no processo de liberação do fármaco, foi obtido o perfil de perda de massa dos implantes de PCL contendo etoposídeo (Figura 22a). Foi verificado que, em 15 dias, houve uma redução de massa do implante de aproximadamente 6%, que correspondeu à massa de fármaco lixiviada neste período. Portanto, não há contribuição da erosão da matriz polimérica na fase inicial da liberação do antitumoral. Esta etapa foi caracterizada por uma alta taxa de liberação do fármaco (Figura 21), que possivelmente ocorreu devido à presença de etoposídeo associado à superfície da matriz polimérica (CHENG *et al.*, 2009).

Figura 22 - Alteração de massa representada pela porcentagem de perda de massa dos implantes de PCL contendo etoposídeo (a), e absorção de água dos implantes, a 37°C, em PBS (b)



Nota: Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (n=5).

Os resultados de absorção de água estão apresentados como porcentagem em relação à massa seca dos implantes de PCL e etoposídeo.

Após 150 dias de estudo, o etoposídeo liberado representou uma perda de massa de aproximadamente 30%. Neste período, a perda de massa total do implante foi de 35%, indicando que apenas 5% são decorrentes da degradação do polímero. Portanto, a liberação lenta do antitumoral observada na segunda etapa do perfil obtido (Figura 21), provavelmente, ocorreu devido à difusão do etoposídeo a partir da matriz polimérica, uma vez que a PCL apresentou uma baixa velocidade de degradação, como pôde ser comprovado pelos resultados apresentados anteriormente.

A degradação da matriz de um poliéster, como a PCL, envolve os fenômenos de clivagem das ligações éster, a redução de peso molecular decorrente da produção de oligômeros e a perda de massa (erosão) devido à produção de fragmentos de baixo peso molecular capazes de difundir através matriz do polímero para o meio. Um fator limitante da velocidade de degradação polimérica é a permeabilidade da formulação à água (DASH; KONKIMALLA, 2012). Foi observada uma baixa penetração de água nos implantes de PCL contendo etoposídeo (Figura 22b), que pode ser justificada pela natureza hidrofóbica do fármaco e do polímero do sistema. Além disso, a hidrofobicidade do etoposídeo contribui para que o fármaco apresente alta afinidade pela matriz polimérica e baixa solubilidade em meio aquoso,

fatores que podem dificultar a liberação do antitumoral para o meio, tornando a sua difusão muito lenta (DASH; KONKIMALLA, 2012; FIALHO *et al.*, 2008).

O fato do implante de PCL ser capaz de promover a liberação do etoposídeo durante um período prolongado pode ser considerado uma vantagem do sistema avaliado, visto que estudos pré-clínicos e clínicos sugerem que o período de exposição das células neoplásicas ao etoposídeo é um fator importante para obtenção da atividade antitumoral máxima, o que pode estar relacionado ao fato do etoposídeo ser um fármaco citotóxico fase-específica (CLARK *et al.*, 1994). Este fármaco é capaz de inibir a enzima topoisomerase II, que é mais ativa na etapa final da fase S e inicial da fase G2 do ciclo celular. O etoposídeo estabiliza o complexo enzima-DNA, promovendo quebras na cadeia de DNA, e assim, levando à permanência do ciclo celular na fase G2 e à subsequente ativação do processo de apoptose. A inibição enzimática é reversível e a dissociação do complexo etoposídeo-DNA-topoisomerase II permite a reparação do DNA, o que, conseqüentemente, reduz a atividade citotóxica do fármaco. Assim, a exposição prolongada ao etoposídeo poderia produzir períodos mais longos de inibição de enzima, resultando no aumento da citotoxicidade do antitumoral (HANDE, 2008; MONTECUCCO; BIAMONTI, 2007; TOFFOLI *et al.*, 2004).

6.8 Avaliação do potencial tóxico dos implantes de PCL contendo etoposídeo empregando o teste HET-CAM

O teste HET-CAM é um ensaio alternativo aos testes *in vivo* para avaliação da irritação ocular induzida por medicamentos, cosméticos e outras substâncias químicas. O ensaio se baseia na observação das alterações da MCA após a aplicação das amostras (BARILE, 2010). A MCA, por responder às injúrias com um processo inflamatório similar aquele observado no tecido conjuntival de olhos de coelhos, foi utilizado por diferentes autores para determinar a tolerabilidade ocular de sistemas de liberação de fármacos para aplicação oftálmica (ALANY *et al.*, 2006; GILHOTRA *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 2010).

A Tabela 17 apresenta os escores médios para as diferentes amostras e sua classificação quanto ao potencial de irritação ocular.

Tabela 17 - Escore médio e classificação quanto ao potencial de irritação ocular das amostras submetidas ao teste HET-CAM

Amostras	Escore médio (n=6)	Classificação
Solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L	15	Irritante
Solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v)	0	Não irritante
Etoposídeo lixiviado de implantes poliméricos após sete dias de incubação em PBS	0	Não irritante
Solução de etoposídeo 24,9 µg/mL preparada em DMSO 1% (v/v);	0	Não irritante
PBS em que implantes de PCL sem fármaco foram incubados por sete dias	0	Não irritante
DMSO 1% (v/v)*	0	Não irritante
Implantes constituídos por PCL e etoposídeo (1:1)	0	Não irritante
Implantes constituídos por PCL	0	Não irritante

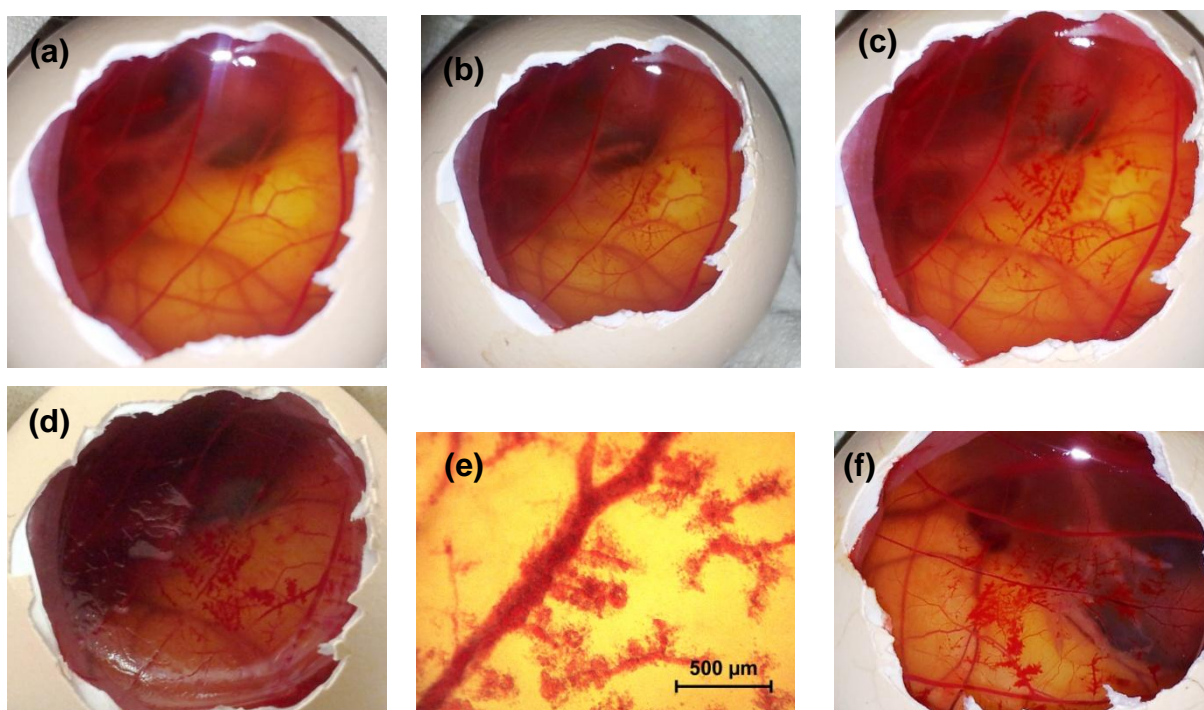
Nota: * Solução testada para verificar se o DMSO, utilizado como solvente para o etoposídeo, apresentava potencial irritante. Assim, essa solução foi considerada o branco da solução de etoposídeo.

A solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L foi classificada como irritante, conforme relatado anteriormente por Alany e colaboradores (2006). Para esta amostra, foram observados os fenômenos de hiperemia, coagulação e hemorragia apresentados na

Figura 23. A solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v) foi considerada não irritante (Figura 24), resultado que corrobora o estudo de Gupta e colaboradores

(2010). Essas soluções foram utilizadas como controles positivo e negativo do ensaio.

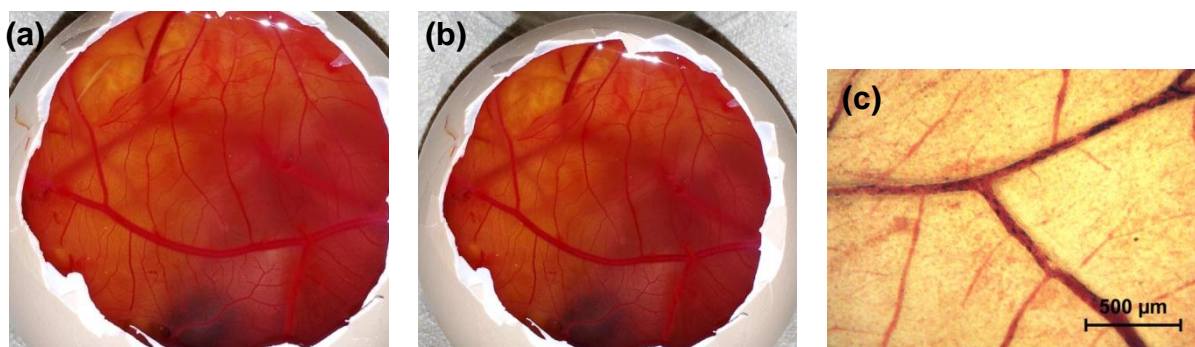
Figura 23 - MCA intacta (a) e visualizada em diferentes intervalos de tempo após o tratamento com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L: 30 segundos (b); 2 minutos (c); 5 minutos (d); 5 minutos em aumento de 24x (e); e 24 horas (f)



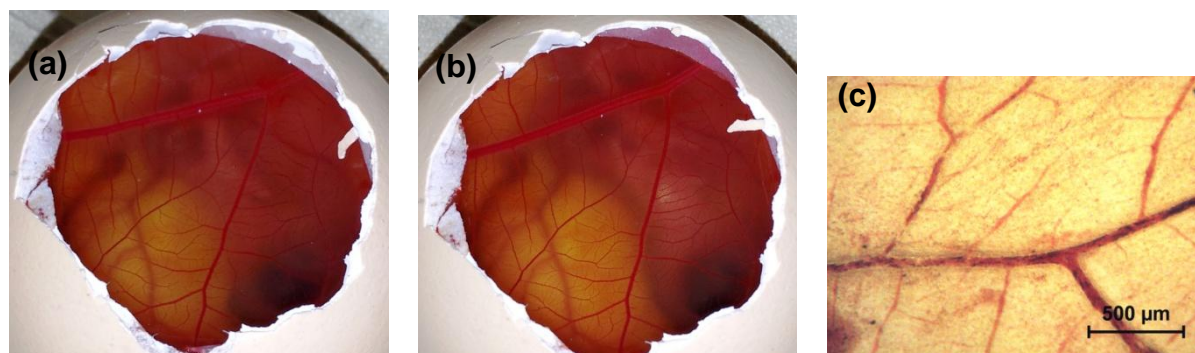
Os implantes com e sem etoposídeo, bem como o meio no qual o implante foi incubado por sete dias, foram classificados como não irritantes (Figura 24). Esses resultados eram esperados para os implantes constituídos apenas por PCL, uma vez que este polímero é reconhecidamente biocompatível (FIALHO *et al.*, 2008). Os resultados obtidos para os implantes contendo etoposídeo indicam que esses sistemas serão bem tolerados após inserção na cavidade vítrea do olho.

Figura 24 - MCA intacta (a) e visualizada em 5 minutos após o tratamento com diferentes amostras (b), cujos detalhes dos vasos sanguíneos estão apresentados na micrografia em aumento de 24x (c)

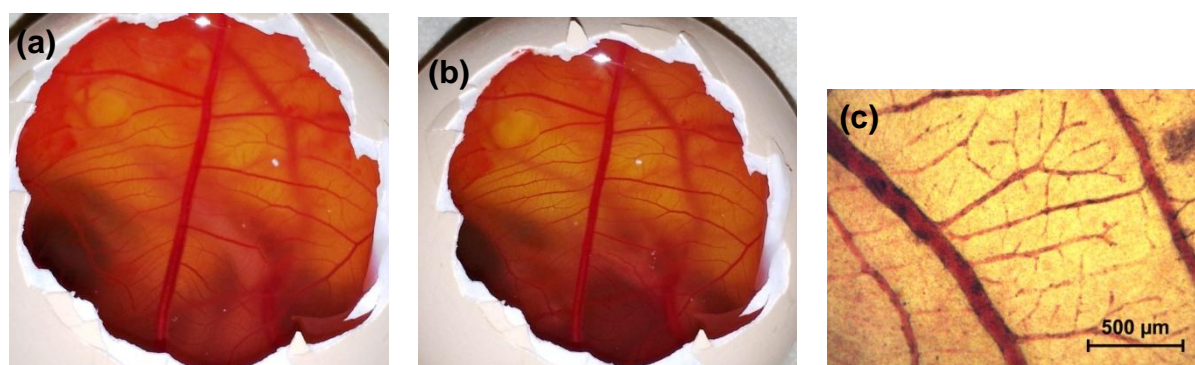
Amostra: solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v)



Amostra: meio de incubação (PBS), no qual os implantes de PCL sem fármaco foram incubados por sete dias



Amostra: etoposídeo lixiviado de implantes poliméricos após sete dias de incubação em PBS



As MCA também foram avaliadas após 24 horas de tratamento com as diferentes amostras e não foram verificadas alterações nas respostas vasculares.

6.9 Preparo dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA

Os implantes, constituídos por etoposídeo e PLGA, consistiram de sistemas cilíndricos com peso médio de $1,78 \pm 0,06$ mg, comprimento médio de $8,04 \pm 0,17$ mm, e diâmetro médio de $0,42 \pm 0,02$ mm ($n=10$) (Figura 25).

Figura 25 - Implante de PLGA contendo etoposídeo (33,3%p/p).

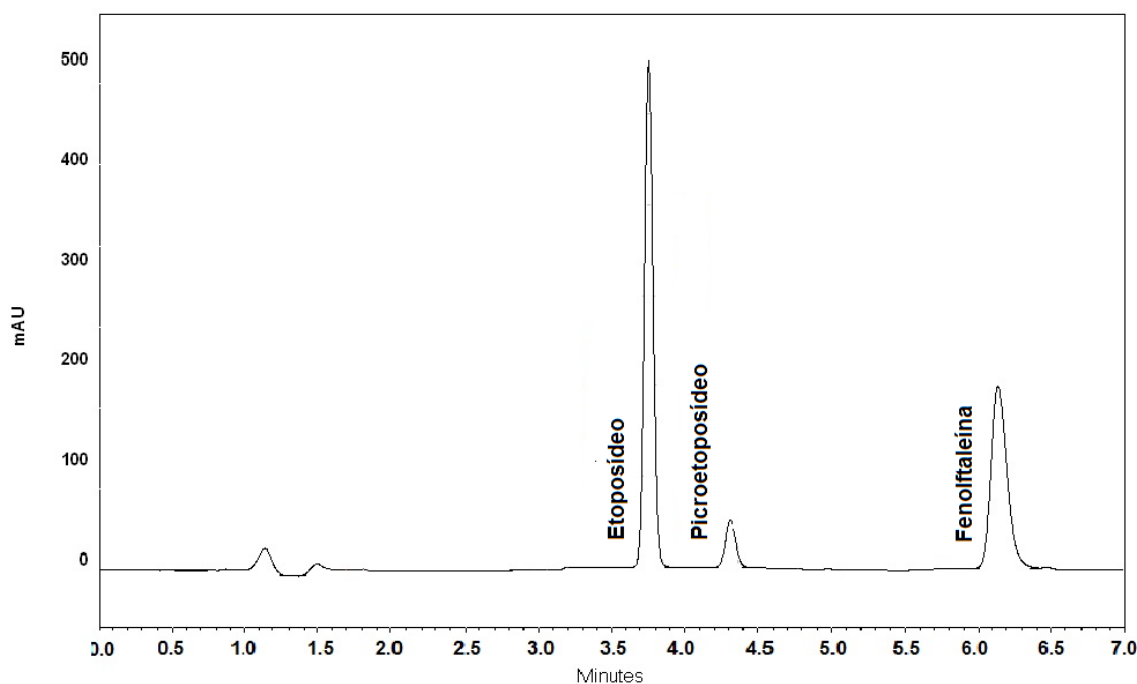


Os sistemas de PLGA e etoposídeo foram preparados pelo método de evaporação do solvente seguido pela moldagem a quente. Nesse método, o fármaco e o polímero são dissolvidos em um solvente orgânico adequado, formando uma solução, que é, então, submetida a um processo para completa evaporação do solvente e obtenção de um filme contendo o fármaco incorporado ao polímero (MAKADIA; SIEGEL, 2011). O filme, previamente obtido, foi moldado a quente, permitindo a confecção de sistemas cilíndricos, compactos e homogêneos.

6.10 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA

Durante o desenvolvimento do método analítico para a quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA, que foi baseado no trabalho de Tian *et al.* (2006), verificou-se que o aumento da proporção de acetonitrila na fase móvel e a elevação de seu fluxo promoveram a redução do tempo de retenção do pico do etoposídeo, e conseqüentemente, diminuíram o tempo de análise. Contudo, os picos do etoposídeo e do picroetoposídeo não apresentaram resolução adequada quando foi testada a proporção de 40% (v/v) de acetonitrila, e portanto, a proporção de 38% (v/v) foi selecionada para a realização das análises. Além disso, quando foram empregados os fluxos de 1,9 e 2 mL/min, essa resolução foi adequada e não foi observada diferença significativa entre o tempo de retenção do etoposídeo obtido em ambas as condições. Assim, definiu-se o fluxo como 1,9 mL/min, o qual geraria menor consumo de solvente. As condições cromatográficas determinadas permitiram a eluição do fármaco em apenas 3,7 minutos (Figura 26).

Figura 26 - Cromatograma obtido para solução de resolução, empregando fase móvel composta por acetonitrila e tampão acetato pH 4,56 (0,05 mol/L) (38:62), fluxo de 1,9 mL/min, coluna fenil (250 x 4,6 mm; 5 µm) a 25 °C e detecção a 247 nm

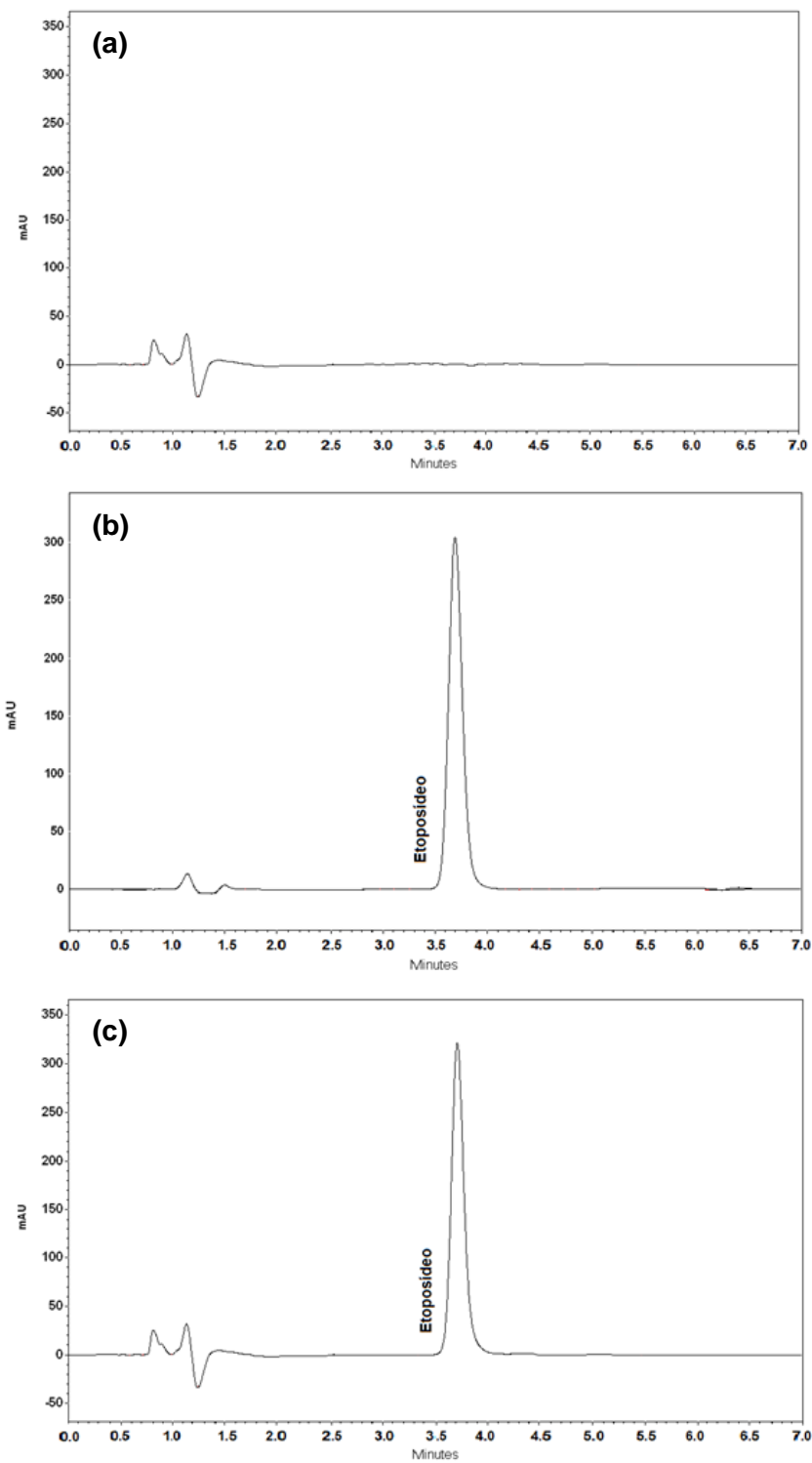


6.10.1 Validação

6.10.1.1 Seletividade

O espectro do etoposídeo na região do ultravioleta (200 a 400 nm) apresentou máximos de absorção em 247 e 285 nm, sendo que maior valor de absorvância foi observado para a leitura realizada a 247 nm. Desta forma, 247 nm foi selecionado para detecção devido à maior sensibilidade do método, que foi comprovada pela maior inclinação da curva obtida neste comprimento de onda (77460 ± 525) quando comparada à inclinação da curva a 285 nm (32170 ± 224). Também foi verificada alta seletividade para o etoposídeo em relação à possível interferência do PLGA presente nas amostras, que foi confirmada pela ausência de picos interferentes no cromatograma da solução de PLGA na concentração de 50 µg/mL (Figura 27b).

Figura 27 - Cromatogramas obtidos para: solução de PLGA a 50 $\mu\text{g/mL}$ (a); solução padrão de etoposídeo a 25 $\mu\text{g/mL}$ (b) e solução contendo PLGA (50 $\mu\text{g/mL}$) e etoposídeo (25 $\mu\text{g/mL}$) (c)



Nota: As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel composta por fase móvel composta por acetonitrila e tampão acetato pH 4,56 (0,05 mol/L) (38:62), fluxo de 1,9 mL/min, coluna fenil (250 x 4,6 mm; 5 μm) a 25 °C e detecção a 247 nm.

A seletividade também foi comprovada pela diferença não significativa ($p > 0,05$) entre as concentrações médias de etoposídeo determinadas para as soluções padrão de etoposídeo não adicionadas ($25,48 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$) e adicionadas de PLGA ($25,53 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$). Além disso, foram obtidos altos valores de pureza dos picos de etoposídeo para as amostras de padrão (99,95%) e de implantes (99,93%), sugerindo que não houve co-eluição de outros compostos com o pico de interesse. Considerando esses resultados, o método desenvolvido apresentou seletividade adequada para a determinação de etoposídeo em implantes de PLGA.

6.10.1.2 Linearidade

Foi verificada regressão significativa entre as concentrações de etoposídeo, dentro da faixa de 5 a 45 $\mu\text{g/mL}$, e as áreas do pico. O modelo linear foi adequado para as duas curvas analíticas, uma vez que foram comprovadas a normalidade e independência dos resíduos, homocedasticidade, desvio de linearidade não significativo e coeficientes de determinação e de correlação superiores a 0,99 (Tabela 18) (MONTGOMERY *et al.*, 2001; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

A duas curvas, obtidas em dias diferentes, foram comparadas e as diferenças entre os interceptos e as inclinações não foram significativas. Considerando os resultados obtidos, o método apresentou relação linear adequada entre a área do pico e a concentração do etoposídeo, na faixa entre 5 a 45 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 18 - Parâmetros da análise de regressão linear dos resultados obtidos para etoposídeo na faixa entre 5 e 45 µg/mL

Parâmetros da análise de regressão	Curva analítica - dia 1	Curva analítica - dia 2
Inclinação ± desvio padrão	76640 ± 250,6	76580 ± 145,9
Intercepto ± desvio padrão	- 33960 ± 6705	- 29900 ± 3218
Coefficiente de determinação (r^2)	0,9998	0,9999
Coefficiente de correlação (r)	1,000	1,000
Normalidade dos resíduos (Coefficiente de correlação do teste de Ryan-Joiner)	0,9597 ($R_{\text{crítico}} = 0,955$) ^a	0,9728 ($R_{\text{crítico}} = 0,956$) ^a
Independência dos resíduos (Estatística de Durbin-Watson)	1,508 (1,38 - 2,62) ^a	1,227 (1,39 - 2,61) ^a
Homocedasticidade (Estatística t de Levene)	0,04 ($t_{\text{crítico}} = 2,13$) ^a	-0,20 ($t_{\text{crítico}} = 2,12$) ^a
Falta de ajuste ($p_{\text{calculado}}$)	0,064 ^b	0,062 ^b

Nota: ^a valores críticos para avaliação do teste de hipóteses. Para aceitação das hipóteses nulas, que consistem nos resíduos seguirem a distribuição normal, serem independentes e apresentarem homocedasticidade, deve-se ter: coeficiente de correlação $> R_{\text{crítico}}$ para o teste de normalidade; estatística de Durbin-Watson dentro dos limites calculados para verificação da independência dos resíduos; estatística t de Levene $> t_{\text{crítico}}$. Considerou-se para todos os testes $\alpha=0,05$.

^b $p > 0,05$.

6.10.1.3 Precisão

Os valores de concentração média de etoposídeo e DPR obtidos para avaliação da precisão intradia e interdias estão apresentados na

Tabela 19.

Tabela 19 - Valores de concentração média e DPR obtidos para avaliação da precisão intradia e interdias do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA

Concentração (µg/mL)	Precisão intradia (n=3)		Precisão interdias (n=6)	
	Concentração média (µg/mL)	DPR (%)	Concentração média (µg/mL)	DPR (%)
2	1,98	1,1	2,02	2,2
5	5,11	1,4	5,08	1,3
25	25,53	0,2	25,41	0,9
45	45,48	0,1	45,13	0,8

Os valores de DPR foram inferiores a 5% para todos os níveis de concentrações testadas, indicando que o método apresentou precisão intra-corrída e inter-corrídas adequadas (BRASIL, 2003).

6.10.1.4 Exatidão

Os valores de porcentagem de recuperação obtidos para a avaliação da exatidão estão apresentados na Tabela 20. Os resultados, obtidos em dois dias de análise, estão dentro da faixa de 98 a 102%, indicando que o método apresentou exatidão satisfatória para determinação de etoposídeo em implantes de PLGA (GREEN, 1996).

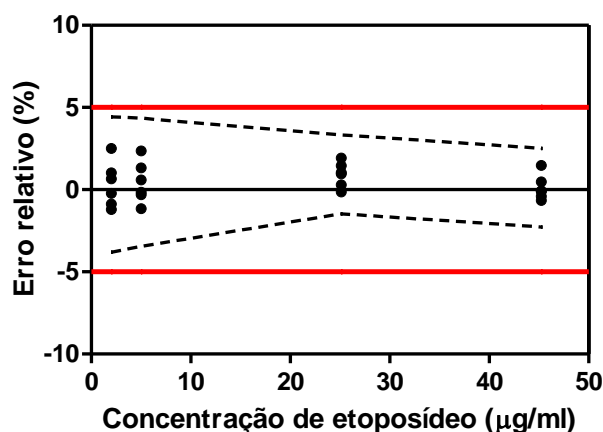
Tabela 20 - Porcentagem de recuperação de etoposídeo para avaliação de exatidão do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão intra-corrida				Exatidão inter-corridas (n=6)	
	Dia 1 (n=3)		Dia 2 (n=3)		Recuperação média (%)	DPR (%)
	Recuperação média (%)	DPR (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)		
2	100,8	1,7	99,9	1,1	100,3	1,4
5	100,9	1,4	100,0	1,3	100,4	1,3
25	101,1	1,1	100,8	0,4	100,9	0,8
45	100,3	1,0	99,9	0,6	100,1	0,8

A equação da reta, que relaciona os valores esperados de concentração de etoposídeo e os resultados experimentais, apresentou intercepto e inclinação que não foram diferentes de zero e um, respectivamente. Tal resultado sugere que os resultados obtidos nas análises realizadas não apresentaram erros sistemáticos (*bias*).

O β -intervalo de tolerância (Figura 28), calculado a um nível de significância de 5%, confirmou a exatidão adequada do método, uma vez que os valores de intervalo de tolerância para cada nível de concentração estão inseridos no limite de variação máxima de 5% (ROZET *et al.*, 2007).

Figura 28 - Erro relativo versus concentração de etoposídeo, com intervalo de tolerância a 95% (linhas tracejadas) e limites de aceitação de $\pm 5\%$ (em vermelho)



6.10.1.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação estimado pelos parâmetros da equação da curva analítica foi 0,37 µg/mL. Baseado neste valor, soluções placebo contendo etoposídeo em diferentes concentrações foram analisadas e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 21. A concentração de 1 µg/mL foi definida como o limite de quantificação do método, desde que nesta concentração resultados precisos (DPR < 5%) e exatos (porcentagem de recuperação entre 98% e 102%) foram obtidos.

Tabela 21 - Valores de concentração média, DPR e porcentagem de recuperação média para determinação do limite de quantificação do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA

Concentração (µg/mL)	Concentração média (µg/mL)	DPR (%)	Recuperação média (%)
0,25	0,70	18,9	275,1
0,5	0,67	8,3	131,9
1	1,00	1,3	98,5

6.10.1.6 Robustez

A Tabela 22 apresenta os resultados obtidos nas diferentes condições de análises utilizadas para avaliar a robustez do método.

Tabela 22 - Resultados das análises obtidas em condições nominais e modificadas para avaliação da robustez do método para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA

Condições de análise	Teor médio ± dp (%)	t _r (min)	Resolução
Nominais Fase móvel: Acetonitrila 38%(v/v) Fluxo da Fase móvel: 1,9 mL/min	100,6 ± 0,4	3,668 ± 0,002	2,68 ± 0,03
Modificadas Fase móvel: Acetonitrila 39%(v/v) Fluxo da Fase móvel: 1,9 mL/min	100,5 ± 0,3	3,564 ± 0,003*	2,53 ± 0,03*
Modificadas Fase móvel: Acetonitrila 38%(v/v) Fluxo da Fase móvel: 1,8 mL/min	100,5 ± 0,3	3,719 ± 0,002*	2,71 ± 0,03

Nota: *p<0,05: diferença significativa quando o resultado foi comparado ao obtido nas condições nominais.

Resultados apresentados como média ± desvio padrão (n=6).

Foram observados, respectivamente, o aumento e a redução do tempo de retenção do fármaco quando foram alterados a composição da fase móvel e o seu fluxo. Foi verificada redução da resolução quando se aumentou a proporção de acetonitrila na fase móvel, no entanto, sob essa condição analítica, foi observada completa separação dos picos. Apesar desses resultados, o método foi considerado robusto para a quantificação de etoposídeo nos implantes de PLGA, uma vez que as alterações das condições cromatográficas não influenciaram nos resultados de teor ($p > 0,05$).

6.11 Quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA

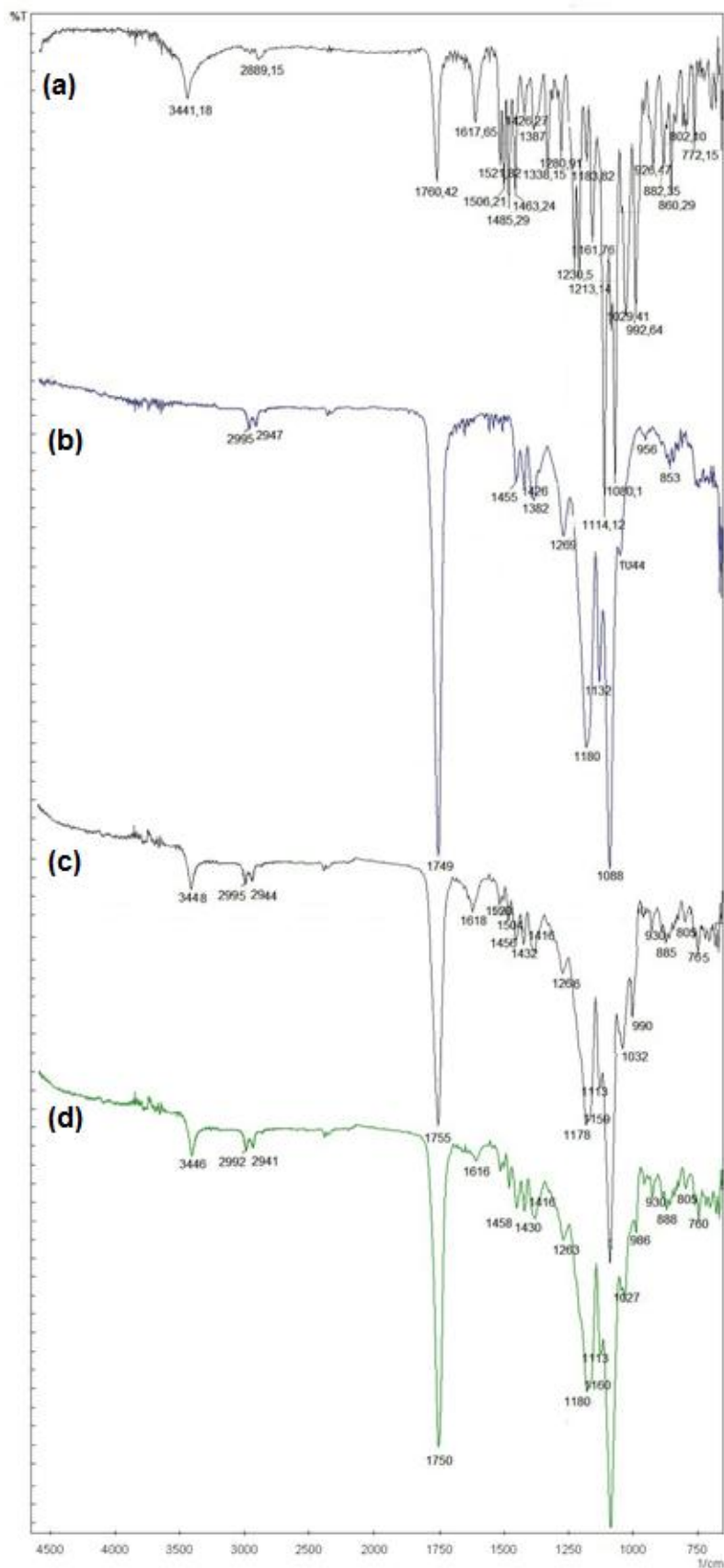
O método cromatográfico foi aplicado para quantificação de etoposídeo incorporado aos implantes de PLGA. O teor médio de etoposídeo para os implantes analisados foi $99,78 \pm 0,86$ % ($n=6$) do valor rotulado (33,3% p/p).

6.12 Caracterização dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA

6.12.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

A Figura 29 apresenta os espectros na região do infravermelho do etoposídeo, PLGA, mistura física de etoposídeo e PLGA (1:2), e implantes. Na Figura 29a foram observadas absorções típicas do etoposídeo, tais como: 1760 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo carbonila do anel lactona, 1617 , 1506 e 1463 cm^{-1} correspondentes ao estiramento de C=C de grupos aromáticos; 3441 cm^{-1} correspondente ao estiramento de -OH fenólico; 2890 cm^{-1} referente ao estiramento de -CH₂. Resultados semelhantes a estes foram encontrados por Shah e colaboradores (2013). O copolímero PLGA 75:25 (Figura 29b) apresentou uma banda em 1749 cm^{-1} atribuída ao estiramento de grupos carbonilas (C=O) de ésteres, bandas em 2995 e 2947 cm^{-1} correspondentes ao estiramento dos grupos metila (C-H) e bandas na região entre 1050 e 1300 cm^{-1} relativas ao estiramento de ligações C-O de éster (MAINARDES *et al.*, 2006).

Figura 29 - Espectros na região do infravermelho de etoposídeo (a), PLGA (b), mistura física de etoposídeo e PLGA (1:2), implante de etoposídeo e PLGA (2:1) (d)



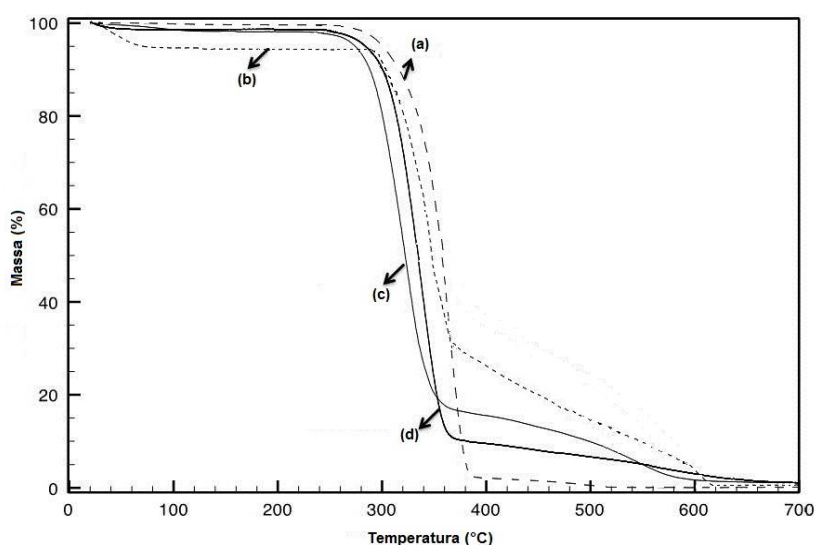
Os espectros da mistura-física e de implantes (Figura 29c-d) apresentaram bandas de absorção típicas dos grupos funcionais presentes no etoposídeo e PLGA. Nesses espectros, as bandas de absorção do fármaco, na região de baixo comprimento de onda, não puderam ser perfeitamente observadas, devido à baixa proporção do fármaco na mistura física e nos implantes. Esse fato já havia sido relatado por Mainardes e colaboradores (2006) em estudo sobre nanopartículas de PLGA contendo praziquantel.

Assim, os resultados de FTIR sugerem que as estruturas químicas do fármaco e polímero foram preservadas após a incorporação do etoposídeo à matriz polimérica.

6.12.2 Análise térmica

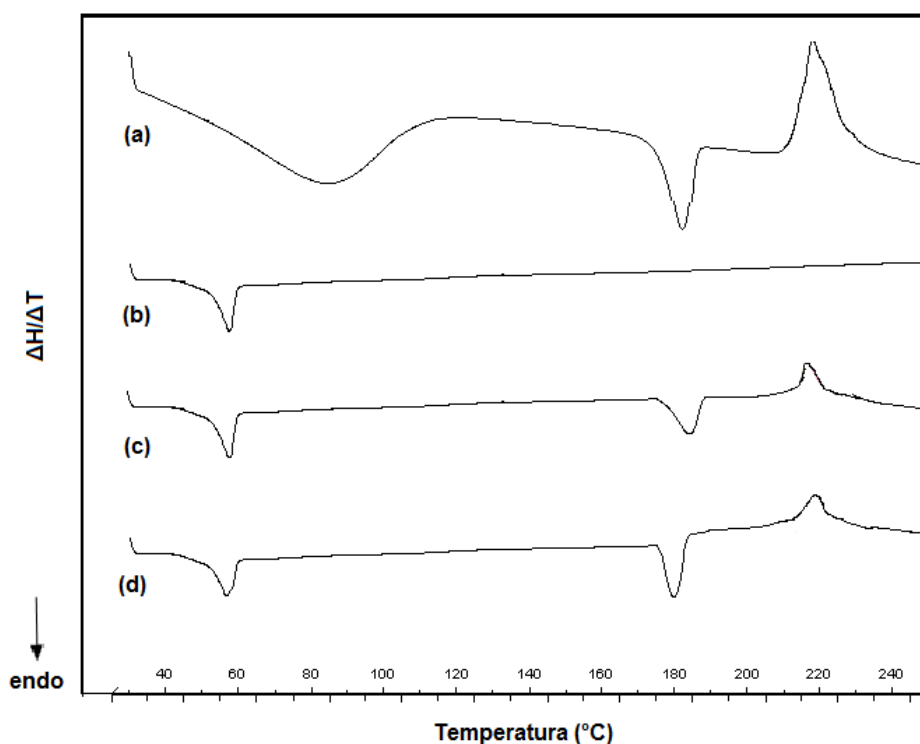
A curva de TG do PLGA (Figura 30a) apresenta um evento térmico atribuído à etapa única da decomposição térmica do polímero que ocorreu na região de 250 °C a 390 °C. Resultados semelhantes foram observados anteriormente por Saliba *et al* (2008). Já o etoposídeo é termicamente estável até aproximadamente 290 °C, conforme pode ser verificado na Figura 30b. Esses resultados demonstram que o método de preparo dos implantes não interfere na estabilidade térmica do polímero e do fármaco, uma vez que o início da decomposição térmica desses ocorre em temperatura mais elevada que a aplicada na obtenção dos dispositivos (100 - 120 °C).

Figura 30 - Curvas de TG do PLGA (a), etoposídeo (b), mistura física de etoposídeo e PLGA (1:2) (c) e implantes constituídos de etoposídeo e PLGA (1:2) (d)



A Figura 31a apresenta a curva de DSC do etoposídeo, na qual foram verificados três eventos atribuídos à reação de desidratação (35 - 121 °C), fusão (175 - 190 °C), transição polimórfica (210 - 235 °C) do etoposídeo, conforme discutido no *item 6.4.2*. O evento endotérmico referente à fusão do etoposídeo recém-cristalizado não foi observada, pois a análise foi realizada na faixa de 30 a 250 °C.

Figura 31 - Curvas de DSC do etoposídeo (a), PLGA (b), mistura física de etoposídeo e PLGA (1:2) (c) e implantes constituídos de etoposídeo e PLGA (1:2) (d)



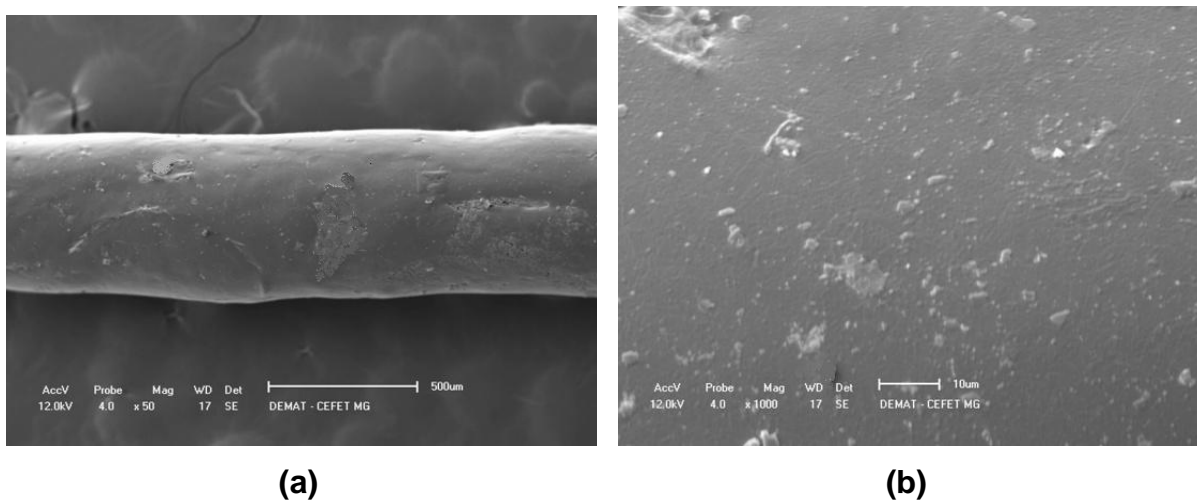
A curva de DSC do PLGA (Figura 31b) apresentou um evento endotérmico (57 °C) referente à transição vítrea do polímero (MITRA *et al.*, 2011). As curvas de DSC da mistura física e dos implantes (Figura 31 c-d) apresentaram eventos térmicos similares aos identificados para o fármaco e polímero puros, sendo o primeiro pico endotérmico devido à transição vítrea do PLGA; o segundo evento endotérmico atribuído à fusão do etoposídeo, seguido pelo evento exotérmico devido à transição polimórfica.

Os resultados da análise térmica corroboram com os dados do FTIR, indicando que não houve interação significativa entre o etoposídeo e a PLGA nos implantes.

6.12.3 Microscopia eletrônica de varredura

Como relatado anteriormente, a morfologia dos implantes é um fator que pode influenciar a liberação do fármaco a partir do dispositivo polimérico. A Figura 32 apresenta a fotomicrografia dos implantes de PLGA contendo etoposídeo (2:1). A superfície destes implantes se apresentou lisa e homogênea, sem a evidência de poros ou canais, que poderiam favorecer a difusão do fármaco (KIMURA; OGURA, 2001; MCDONALDS *et al.*, 2010).

Figura 32 - Fotomicrografias da superfície externa de implantes constituídos de etoposídeo e PLGA (1:2) em aumento de 50X (a) e 1000X (b)



6.13 Uniformidade de conteúdo

O método de evaporação do solvente foi utilizado para a obtenção do filme de PLGA e etoposídeo que, então, foi moldado em dispositivos cilíndricos. No entanto, esse método apresenta como desvantagem a possibilidade de formação de agregados dos componentes da formulação, o que contribui para a falta de uniformidade da dispersão do fármaco na matriz polimérica. O processo de

eliminação do solvente é um fator crítico para a formação de agregados, pois, durante um longo processo de eliminação do solvente, as forças intermoleculares atrativas são favorecidas (MORALES; MCCONVILLE, 2011; PERUMAL, 2007). Considerando esse problema, a evaporação do solvente sob pressão reduzida, procedimento relativamente rápido, foi utilizado para eliminação da acetonitrila empregada para solubilizar o PLGA e o etoposídeo. Assim, para confirmar a distribuição homogênea do fármaco nos implantes produzidos, o teste de uniformidade de conteúdo foi realizado. O teor de etoposídeo nas dez unidades testadas variou de 98,76% a 103,39% (DPR = 1,51%) do valor pré-definido para a formulação (33,3% p/p). Além disso, o limite de variação do conteúdo de fármaco destes implantes (3,63) foi inferior à especificação de 15 (BRASIL..., 2010), atendendo, portanto, aos critérios farmacopeicos de avaliação do teste de uniformidade de conteúdo. Esses resultados confirmam que o etoposídeo foi distribuído de forma uniforme nos implantes preparados, indicando que o método de elaboração dos sistemas garante homogeneidade do fármaco nestes dispositivos.

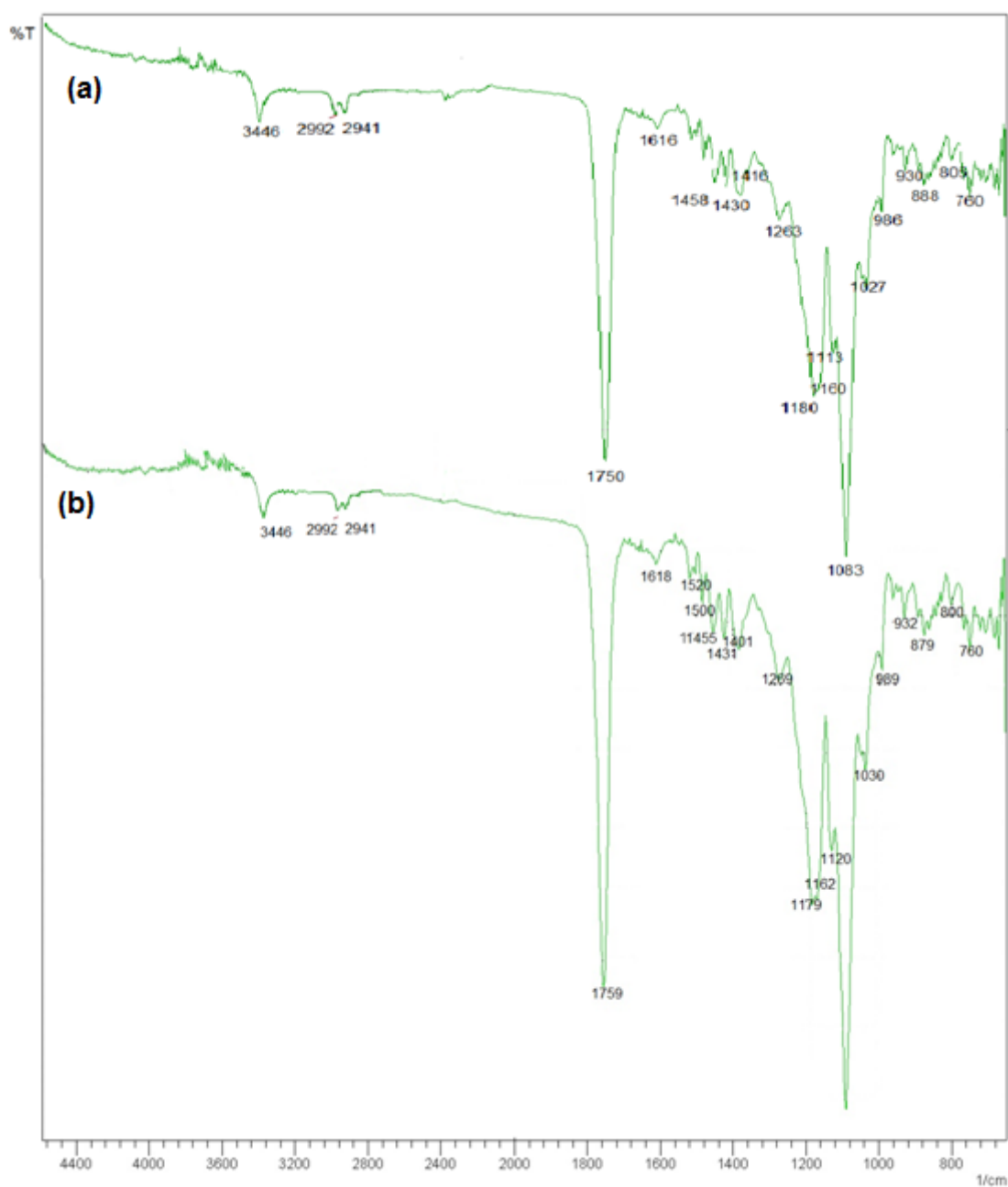
6.14 Resultados do processo de esterilização dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA

6.14.1 Avaliação da estabilidade dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA frente ao processo de esterilização

Os implantes de PLGA contendo etoposídeo foram esterilizados por exposição à radiação ultravioleta. Os resultados apresentados no *item 6.6.1* indicaram que o etoposídeo não sofreu alterações detectáveis após ser submetido às condições de esterilização. Tais condições também não promoveram modificações detectáveis na estrutura química dos componentes dos implantes (PLGA e etoposídeo), uma vez que não foram observadas alterações no espectro na região do infravermelho dos implantes submetido ao processo de esterilização (Figura 33). Adicionalmente, o teor de etoposídeo dos implantes estéreis ($100,07 \pm 0,84$ %) foi comparado ao teor dos implantes não estéreis ($100,79 \pm 0,94$ %), sendo que não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$) entre eles. Esse resultado

indica que o conteúdo de etoposídeo dos implantes de PLGA não é alterado após a exposição à radiação ultravioleta, por trinta minutos.

Figura 33 – Espectros na região do infravermelho de implantes constituídos de etoposídeo e PLGA (1:2) antes (a) e após (b) serem submetidos à radiação ultravioleta por trinta minutos



6.14.2 Teste de esterilidade

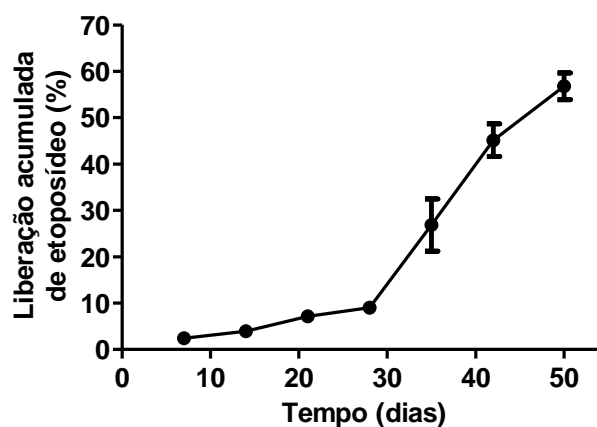
O teste de esterilidade foi realizado conforme método direto descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), não havendo necessidade de alterações das condições de ensaio, uma vez que os constituintes do implante não apresentaram incompatibilidade físico-química com os meios de cultura e nem atividade antimicrobiana frente a alguns microrganismos padrão. Como no caso dos implantes de PCL e etoposídeo, os sistemas de PLGA e o antitumoral também consistem em uma formulação simples, cuja adição de substâncias conservantes não foi necessária. Esse fato facilita a execução do teste de esterilidade devida à ausência de atividade antimicrobiana do sistema.

Nos tubos contendo o implante e meio de cultura, não foi observado crescimento microbiano, o que confirma a esterilidade dos sistemas expostos à radiação ultravioleta.

6.15 Avaliação *in vitro* da perda de massa, da absorção de água e do perfil de liberação dos implantes constituídos de etoposídeo e PLGA

A Figura 34 apresenta o perfil de liberação *in vitro* do etoposídeo a partir dos implantes de PLGA, que foi obtido na forma de porcentagem acumulada de liberação do fármaco em função do tempo em dias. Os implantes de PLGA promoveram a liberação prolongada do etoposídeo, cujo perfil *in vitro* foi caracterizado por duas fases definidas: uma etapa inicial, em que cerca de 9% do etoposídeo foram liberados lentamente durante os primeiros 28 dias de incubação; e a segunda fase, na qual 48% do antitumoral foram liberados no período entre o 29° e o 50° dia de estudo.

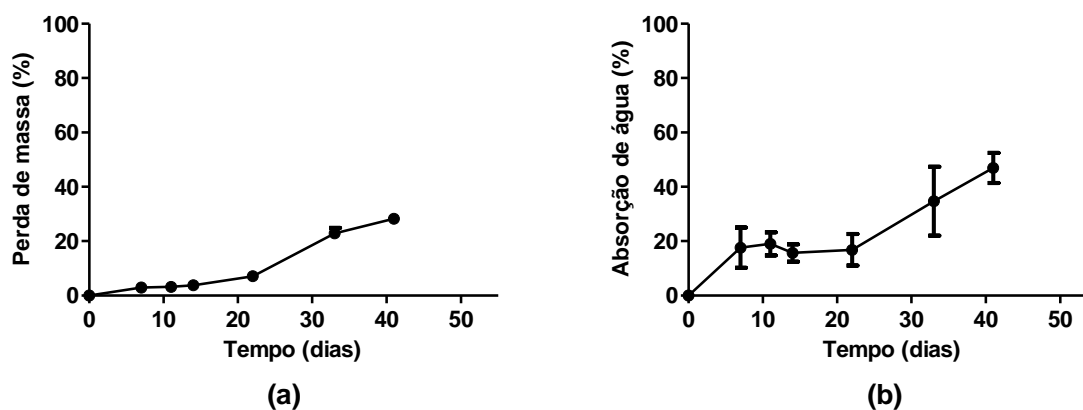
Figura 34 - Perfil de liberação acumulada *in vitro* de etoposídeo a partir dos implantes de PLGA



Nota: Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (n=5).

A perda de massa *in vitro* dos implantes de PLGA contendo etoposídeo está apresentada na Figura 35a. Durante os primeiros 21 dias, praticamente, não houve perda de massa dos dispositivos poliméricos. Esta etapa pode ser atribuída à fase inicial do processo de degradação do PLGA, na qual há absorção de água pelo sistema (Figura 35b), promovendo a hidrólise das ligações éster na estrutura do polímero. O processo de quebra aleatória da cadeia polimérica promove uma redução inicial do peso molecular, porém sem qualquer perda de massa apreciável (MAKADIA; SIEGEL, 2011).

Figura 35 - Alteração de massa representada pela porcentagem de perda de massa dos implantes de PLGA contendo etoposídeo (a), e absorção de água dos implantes, a 37°C, em PBS



Nota: Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (n=5).

Os resultados de absorção de água estão apresentados como porcentagem em relação à massa seca dos implantes de PLGA e etoposídeo.

A partir do 21º dia de incubação, foi observado um aumento na perda de massa do implante (Figura 35a) decorrente tanto da liberação do fármaco, como da erosão da matriz polimérica. Após 42 dias de incubação, o etoposídeo liberado a partir do implante de PLGA, representou uma perda de massa de aproximadamente 13,7%. Neste período, a perda de massa total do sistema foi cerca de 28,3%, indicando que aproximadamente 14,6% são decorrentes da degradação do polímero. A erosão do PLGA, nesta fase, é consequência da difusão de seus produtos de degradação para o meio de liberação. Este processo cria poros na matriz polimérica, os quais se tornam maiores devido ao contato com a água, que continua a promover a hidrólise polimérica, gerando compostos ácidos. Essas substâncias ácidas catalisam a reação de degradação do PLGA, promovendo a sua dissolução no interior dos poros, levando à erosão subsequente. Assim, esta fase é caracterizada por uma redução no peso molecular acompanhada pela perda de massa da matriz polimérica (FREDENBERG *et al*, 2011;. MAKADIA; SIEGEL, 2011). A degradação da matriz favorece a penetração de água no sistema, fato que pode explicar o aumento do conteúdo de água nos implantes a partir do 22º dia de incubação (Figura 35b).

Como relatado anteriormente, a liberação do etoposídeo a partir dos implantes de PLGA apresentou um perfil bifásico. Contudo, geralmente, a cinética de liberação a partir de matrizes constituídas por esse polímero apresenta um perfil trifásico, sendo que a primeira fase é caracterizada pela alta taxa de liberação do fármaco decorrente da difusão do princípio ativo presente na superfície do sistema ou próximo a ela. Na segunda etapa, considerada uma fase de latência, ocorre a difusão do fármaco da matriz para o meio externo antes da erosão do polímero. Esta difusão é dependente do coeficiente de difusão do princípio ativo, da saturação do meio de incubação e da concentração do fármaco no sistema. Na terceira fase tem-se uma liberação pronunciada do princípio ativo, geralmente, atribuída ao início da erosão da matriz polimérica (FREDENBERG *et al.*, 2011; KUNO; FUJII, 2010).

Para os dispositivos de etoposídeo e PLGA, a primeira etapa do perfil de liberação não apresentou uma liberação pronunciada do fármaco (Figura 34). Este comportamento pode ser justificado pela difusão lenta do antitumoral presente na matriz e pela provável ausência do fármaco associado à superfície do sistema. A difusão muito lenta do etoposídeo pode ser decorrente da sua natureza hidrofóbica, que contribui para que o fármaco apresente alta afinidade pela matriz polimérica e

baixa solubilidade em meio aquoso, fatores que dificultam a liberação do princípio ativo para o meio (DASH; KONKIMALLA, 2012; FIALHO *et al.*, 2008). Saliba e colaboradores (2012) também relataram a ausência de uma liberação pronunciada do fármaco na fase inicial do perfil de liberação de ciclosporina a partir dos implantes de PLGA.

Na segunda fase do perfil de liberação do etoposídeo, que ocorreu a partir do 28º dia de incubação, foi observado um aumento da taxa de liberação do fármaco que pode ser atribuído a sua difusão pelos poros iniciais já presentes na matriz polimérica e pelos novos canais formados durante o processo de erosão do polímero conforme discutido anteriormente.

6.16 Avaliação do potencial tóxico dos implantes de PLGA contendo etoposídeo empregando o teste HET-CAM

O potencial tóxico dos implantes desenvolvidos foi avaliado pelo teste HET-CAM. As soluções de hidróxido de sódio 1 mol/L e de cloreto de sódio 0,9% (p/v), utilizadas como controle do ensaio, foram avaliadas e classificadas, respectivamente, como irritante e não irritante. Esses resultados estão em concordância com dados da literatura e do *item 6.8* (ALANY *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2010).

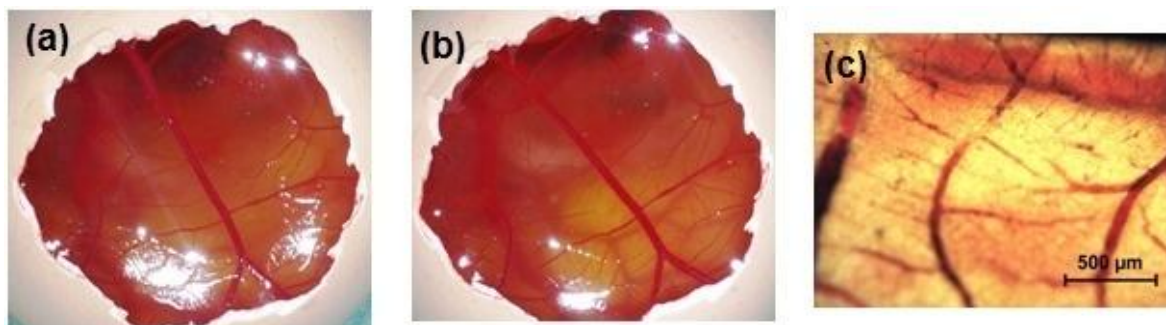
Não foram observadas alterações nos vasos sanguíneos das MCA tratadas com as demais amostras. Portanto, os implantes com e sem etoposídeo, bem como o meio no qual os dispositivos foram incubados, a solução de etoposídeo (20 µg/mL) e o DMSO 1% (v/v) foram classificados como não irritantes. Os resultados obtidos para os implantes de PLGA (Figura 36) são congruentes com o fato deste polímero ser reconhecidamente biocompatível (MAKADIA; SIEGEL, 2011).

Os resultados para os implantes de PLGA contendo etoposídeo (Figura 36) indicam que esses dispositivos podem ser bem tolerados após a inserção na cavidade vítrea do olho.

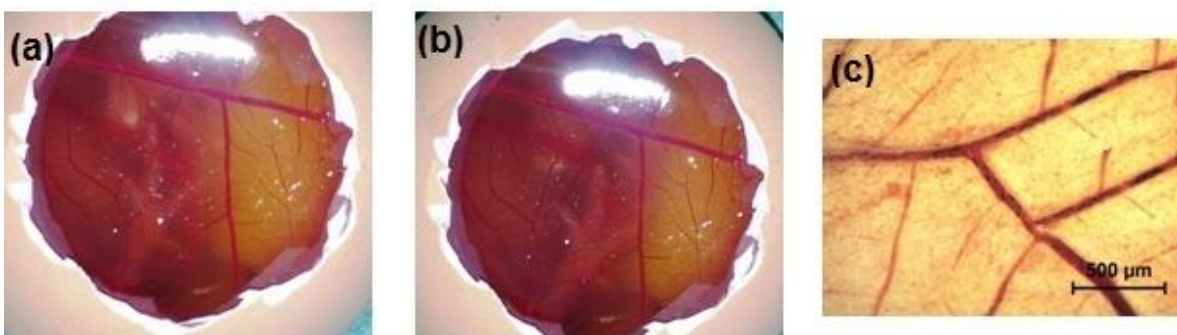
As MCA também foram avaliadas após 24 horas de tratamento com as diferentes amostras e não foram verificadas alterações nas respostas vasculares.

Figura 36 - MCA intacta (a) e visualizada em 5 minutos após o tratamento com diferentes amostras (b), cujos detalhes dos vasos sanguíneos (em aumento de 24x) estão apresentados na micrografia (c)

Amostra: meio de incubação (PBS), no qual os implantes de PLGA sem fármaco foram incubados por sete dias



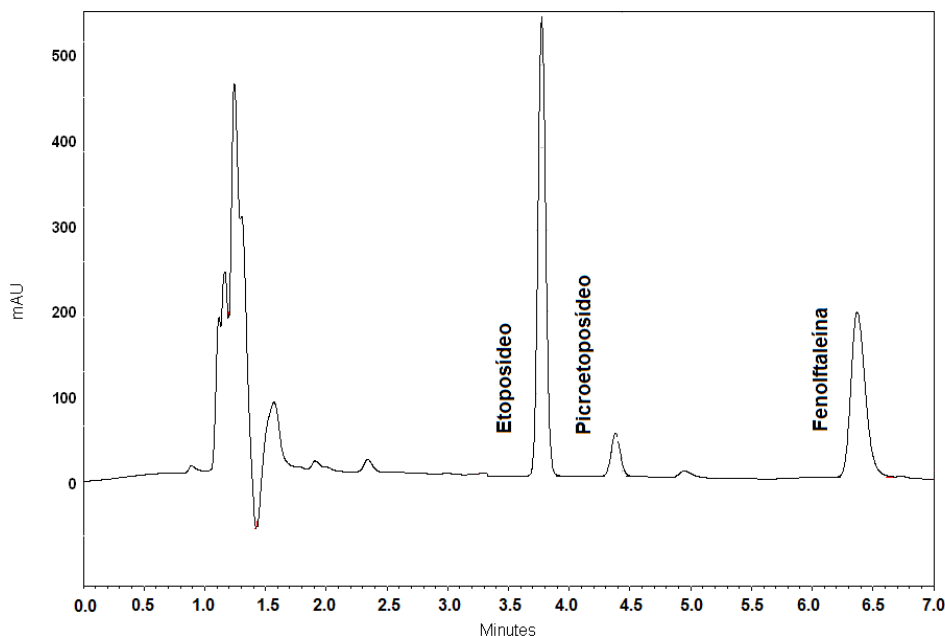
Amostra: etoposídeo lixiviado de implantes poliméricos após sete dias de incubação em PBS



6.17 Validação de método analítico por CLAE para quantificação de etoposídeo em humor vítreo

Para a quantificação de etoposídeo em humor vítreo, foram empregadas as condições cromatográficas descritas anteriormente para a determinação deste fármaco em implantes de PLGA (item 5.12.3). A adequação das condições cromatográficas foi verificada por meio da análise da solução de resolução preparada em humor vítreo. A Figura 37 apresenta o cromatograma desta solução, no qual foi verificada completa separação entre o pico do etoposídeo e o pico do etoposídeo (Resolução > 2).

Figura 37 - Cromatograma obtido para solução de resolução preparada em humor vítreo, empregando fase móvel composta por acetonitrila e tampão acetato pH 4,56 (0,05 mol/L) (38:62), fluxo de 1,9 mL/min, coluna fenil (250 x 4,6 mm; 5 µm) a 25 °C e detecção a 247 nm



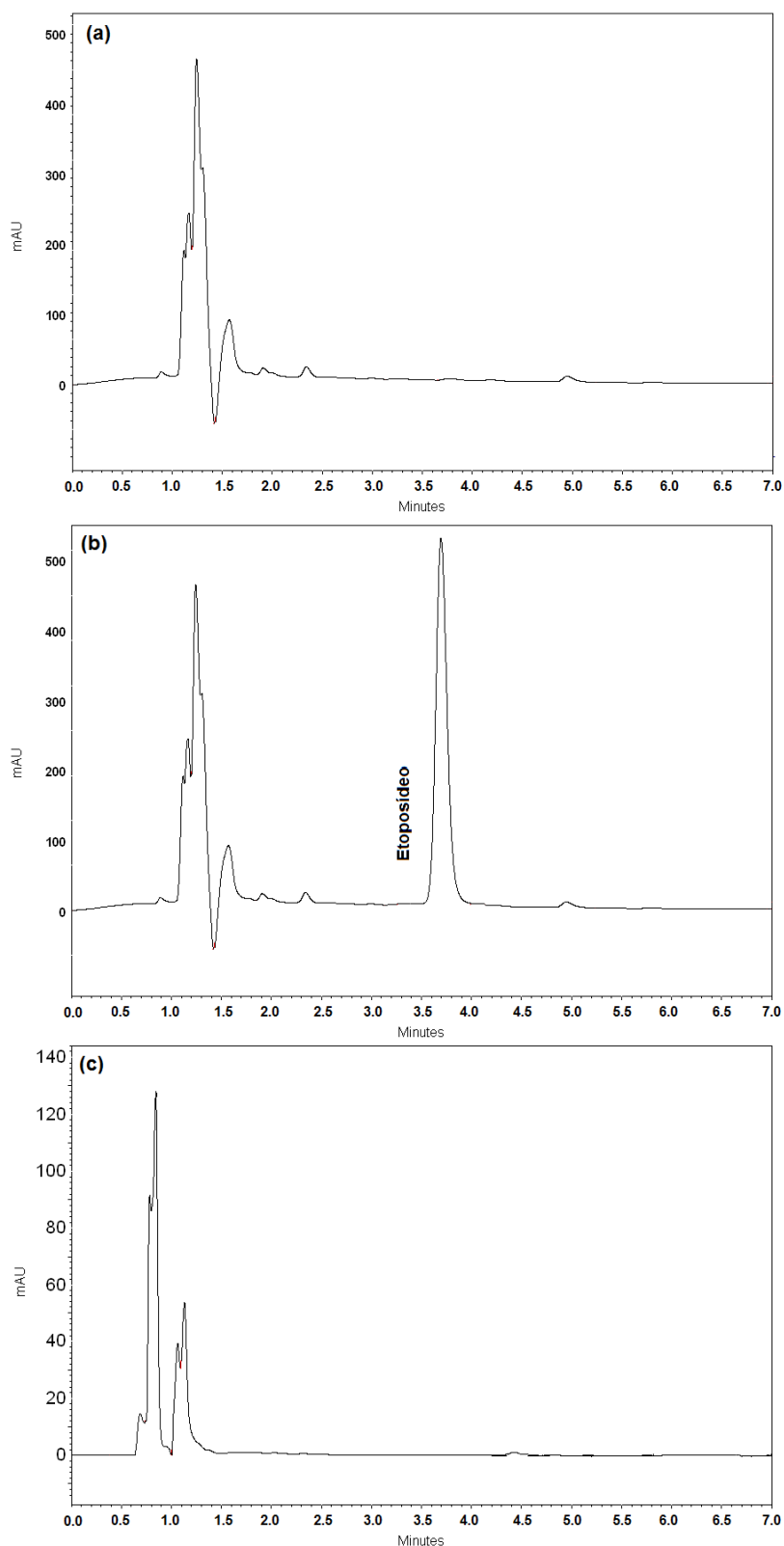
Devido à ausência de quantidade suficiente de humor vítreo para realização da validação do método, uma solução de humor vítreo simulado foi empregada no preparo das soluções do fármaco. A utilização de uma matriz alternativa no processo de validação é permitida pelos guias de validação (BRASIL, 2012; EMEA, 2011; FDA, 2001). No entanto, para a avaliação de alguns parâmetros (precisão, seletividade e estabilidade do analito em matriz biológica), as soluções de fármaco foram preparadas na própria matriz biológica (BRASIL, 2012).

6.17.1 Validação

6.17.1.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por meio da análise de seis amostras de humor vítreo, sendo que em nenhuma delas foram observados picos interferentes no mesmo tempo de retenção do etoposídeo (Figura 38a). Os picos mais próximos ao do etoposídeo apresentaram tempos de retenção de 2,3 e 4,9 minutos, os quais não interferem na quantificação desse fármaco, uma vez que seu tempo de retenção é 3,8 minutos (Figura 38b).

Figura 38 - Cromatogramas obtidos para: amostra de humor vítreo (a), amostra de humor vítreo contendo etoposídeo a 50 µg/mL (b) e solução de humor vítreo simulado (c)



Nota: As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel composta por fase móvel composta por acetonitrila e tampão acetato pH 4,56 (0,05 mol/L) (38:62), fluxo de 1,9 mL/min, coluna fenil (250 x 4,6 mm; 5 µm) a 25 °C e detecção a 247 nm.

Segundo a Resolução RDC n° 27/2012 (BRASIL, 2012), a resposta de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do fármaco deve ser inferior a 20% da resposta do analito no limite inferior de quantificação. Em todas as amostras de humor vítreo analisadas, não foram observados picos interferentes no mesmo tempo de retenção de etoposídeo. Além disso, as áreas dos picos mais próximos ao pico do etoposídeo foram inferiores a 20% da resposta do analito na concentração de 1 µg/mL.

A Figura 38c apresenta o cromatograma do humor vítreo simulado, na qual não foram verificados picos interferentes no mesmo tempo de retenção do etoposídeo, demonstrando a seletividade do método para o etoposídeo, também, em relação à possível interferência do humor vítreo simulado.

6.17.1.2 Efeito da matriz

O efeito de matriz foi avaliado pela comparação das áreas obtidas para o etoposídeo em humor vítreo e em fase móvel. Além disso, foi investigado o efeito de matriz decorrente do uso de uma solução de humor vítreo simulado como diluente. Os resultados obtidos (Tabela 23) demonstraram que não houve efeito de matriz significativo, tanto para o humor vítreo quanto para a solução de humor vítreo simulado, uma vez que os valores de DPR foram inferiores a 15% (BRASIL, 2012).

Tabela 23 - Resultados das análises para avaliação do efeito de matriz para o método por CLAE para quantificação de etoposídeo em humor vítreo

Concentrações de etoposídeo (µg/mL)	Amostras em humor vítreo e em fase móvel			Amostras em humor vítreo simulado e em fase móvel		
	FM médio*	DPR (%)	DPR _{total} (%)	FM médio*	DPR (%)	DPR _{total} (%)
2	1,05	8,4	7,3	1,04	4,0	3,9
80	1,00	5,2		1,00	2,9	

Nota: FM médio para n=6.

6.17.1.3 Efeito residual

Nos cromatogramas das amostras de humor vítreo, que foram obtidos após a injeção de uma amostra de humor vítreo adicionada de etoposídeo na concentração de 100 µg/mL, não foram observados picos interferentes no mesmo tempo de retenção do analito. Portanto, não foi observado o efeito residual.

6.17.1.4 Linearidade

Foi verificada que, sob as condições experimentais do método cromatográfico e dentro da faixa de 1 a 100 µg/mL, a regressão entre as concentrações de etoposídeo e as áreas do pico foi significativa ($p < 0,05$).

O modelo linear foi adequado para as três curvas analíticas obtidas em três dias diferentes, cujos valores do coeficiente de determinação foram superiores a 0,99 (Tabela 24). O gráfico de resíduos, obtido para cada curva, demonstrou a distribuição aleatória dos resíduos, de forma que não se verificou qualquer tendência nas curvas analíticas.

Tabela 24 - Equações das retas e respectivos coeficientes de correlação e de determinação obtidos na avaliação da linearidade do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em humor vítreo

Parâmetros da análise de regressão	Curva analítica - dia 1	Curva analítica - dia 2	Curva analítica - dia 3
Inclinação \pm desvio padrão	77820 \pm 185	78470 \pm 401	78550 \pm 443
Intercepto \pm desvio padrão	104100 \pm 9285	79730 \pm 20650	77340 \pm 23030
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9998	0,9991	0,9988
Coeficiente de correlação (r)	1,000	1,000	0,999

As áreas utilizadas para construir as três curvas atenderam aos critérios de aceitação preconizados pela Resolução RDC nº 27/2012 (BRASIL, 2012), uma vez que apresentaram desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o limite inferior de quantificação e desvio menor ou igual 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva. No caso da curva do dia 3, uma das réplicas da concentração de 2 µg/mL apresentou desvio superior a 15%, sendo este dado, portanto, não considerado no cálculo dos parâmetros da equação da curva analítica. Considerando os resultados obtidos, o método apresentou relação linear adequada entre a área do pico e a concentração do etoposídeo, na faixa entre 1 a 100 µg/mL.

6.17.1.5 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas pela análise em quatro concentrações, em quintuplicata, em três dias diferentes. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 25. Os resultados obtidos demonstraram que o método apresenta precisão intradia e interdias adequadas, uma vez que todos os valores de DPR foram inferiores a 15% (BRASIL, 2012).

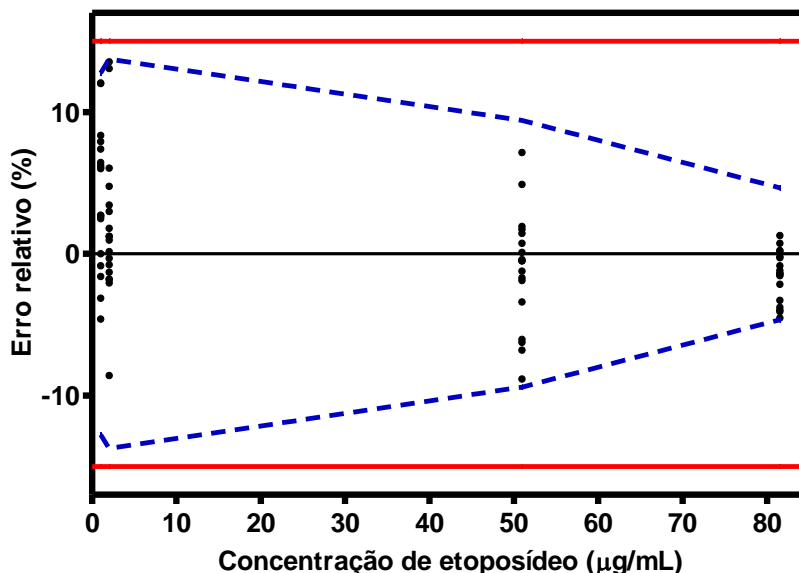
Para a avaliação da exatidão, o erro padrão relativo, que considera os erros sistemáticos (*bias*) do método analítico, foi calculado para todos os níveis de concentração de etoposídeo testados. Todos os valores de erro padrão relativo determinados estavam inseridos no intervalo de $\pm 15\%$, demonstrando que o método apresenta exatidão adequada para quantificação do etoposídeo em humor vítreo (BRASIL, 2012).

Tabela 25 - Resultados obtidos para avaliação da precisão e exatidão intradia e interdias do método por CLAE para quantificação de etoposídeo em humor vítreo

Parâmetros		Concentração de etoposídeo ($\mu\text{g/mL}$)			
		1	2	50	80
Dia 1 (n=5)	Concentração média ($\mu\text{g/mL}$)	1,05	2,03	50,59	80,01
	DPR (%)	6,2	7,3	1,5	3,8
	Erro padrão relativo (%)	2,9	-1,0	-1,2	-1,2
Dia 2 (n=5)	Concentração média ($\mu\text{g/mL}$)	1,05	2,04	51,16	80,31
	DPR (%)	3,5	2,0	1,2	1,2
	Erro padrão relativo (%)	2,9	0,2	0,8	-1,3
Dia 3 (n=5)	Concentração média ($\mu\text{g/mL}$)	1,09	2,17	49,27	79,80
	DPR (%)	6,4	8,1	3,7	2,2
	Erro padrão relativo (%)	7,7	6,7	-3,1	-1,9
Inter- dias (n=15)	Concentração média ($\mu\text{g/mL}$)	1,06	2,08	50,34	80,04
	DPR (%)	5,6	6,9	4,4	2,3
	Erro padrão relativo (%)	4,5	1,9	-1,2	-1,8

O β -intervalo de tolerância (Figura 39), calculado a um nível de significância de 5%, confirmou a exatidão do método, uma vez que os valores de intervalo de tolerância para cada nível de concentração estão inseridos no limite de variação máxima de 15% (ROZET *et al.*, 2007)

Figura 39 - Erro relativo versus concentração de etoposídeo, com intervalo de tolerância a 95% (linhas tracejadas) e limites de aceitação de $\pm 15\%$ (em vermelho)



6.17.1.6 Limite inferior de quantificação

O limite de quantificação foi determinado pela análise, em quintuplicata, de amostras de humor vítreo contendo etoposídeo nas concentrações 0,25; 0,5; 0,75 e 1 µg/mL. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 26. A concentração de 1 µg/mL foi definida como o limite de quantificação do método, desde que nesta concentração resultados precisos (DPR < 15%) e exatos (erro padrão relativo dentro da faixa de $\pm 15\%$) foram obtidos (BRASIL, 2012).

Tabela 26 - Valores de concentração média, DPR e erro padrão relativo para determinação do limite inferior de quantificação (n=5) em humor vítreo

Concentração de etoposídeo (µg/mL)	Concentração média (µg/mL)	DPR (%)	Erro padrão relativo (%)
0,25	0,56	21,5	124,2
0,5	0,60	22,6	21,6
0,75	0,82	21,5	18,3
1	1,04	7,6	5,2

6.17.1.7 Estabilidade

A avaliação da estabilidade do fármaco foi realizada pela análise de amostras de humor vítreo contendo etoposídeo submetidas a diferentes condições experimentais, que reproduzem as etapas de armazenamento, preparo e análise das amostras.

Estabilidade de curta duração e estabilidade pós-processamento

O estudo de estabilidade de curta duração consiste em avaliar as amostras submetidas à temperatura ambiente ou temperatura de processamento do método por período de 4 a 24 horas. Também deve ser investigada a estabilidade do fármaco na matriz biológica após o seu processamento (BRASIL, 2012; EMEA, 2011; FDA, 2001). Como o processamento das amostras no método em questão consistiu no preparo das soluções e seu armazenamento, a temperatura ambiente (25 °C), no compartimento do cromatógrafo até a sua análise, apenas um estudo foi realizado para verificar tanto a estabilidade de curta duração como a estabilidade pós-processamento. Este procedimento foi adotado devido ao pequeno volume de matriz biológica disponível e às condições similares de ambos os estudos.

A Tabela 27 apresenta os resultados obtidos para as amostras de humor vítreo contendo etoposídeo mantidas na bandeja do injetor automático, a 25 °C, durante 10 horas. Os valores de desvio, tanto em relação ao valor nominal das concentrações como em relação à amostra recém-preparada, foram inferiores a 15%, para ambos os níveis de concentração testados. Tais resultados demonstraram que as amostras são estáveis nas condições analisadas (BRASIL, 2012; CASSIANO *et al.*, 2009).

Tabela 27 - Resultados obtidos para avaliação da estabilidade de curta duração e estabilidade pós-processamento de amostras de humor vítreo contendo etoposídeo nas concentrações de 2 e 80 µg/mL

Parâmetros	Humor vítreo contendo etoposídeo 2,05 µg/mL (n=3)		Humor vítreo contendo etoposídeo 81,89 µg/mL (n=3)	
	Recém-preparado	Após tratamento	Recém-preparado	Após tratamento
Concentração média ± dp (µg/mL)	2,09 ± 0,08	1,97 ± 0,03	81,22 ± 0,40	80,07 ± 0,33
Desvio em relação ao valor nominal (%)	2,3	-4	-0,8	-2,2
Desvio em relação à amostra recente (%)	-	-6,2	-	-1,4

Estabilidade de longa duração

A estabilidade de longa duração foi avaliada em amostras de humor vítreo armazenadas a -20 °C por 45 dias. A concentração destas amostras foi determinada e comparada à amostras recém preparadas (Tabela 28). Os valores de desvio, tanto em relação ao valor nominal das concentrações como em relação à amostra recém-preparada, foram inferiores a 15%, para ambos os níveis de concentração testados. Esses resultados indicam que o etoposídeo se mantém estável no humor vítreo durante o período avaliado.

Tabela 28 - Resultados obtidos para avaliação da estabilidade de longa duração de amostras de humor vítreo contendo etoposídeo nas concentrações de 2 e 80 µg/mL

Parâmetros	Humor vítreo contendo etoposídeo 2,03 µg/mL (n=3)		Humor vítreo contendo etoposídeo 81,33 µg/mL (n=3)	
	Recém-preparado	Após tratamento	Recém-preparado	Após tratamento
Concentração média ± dp (µg/mL)	1,98 ± 0,05	1,75 ± 0,02	81,24 ± 0,3	75,17 ± 0,92
Desvio em relação ao valor nominal (%)	-2,9	-13,9	-0,1	-7,6
Desvio em relação à amostra recente (%)	-	-11,4	-	-7,5

Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

O comportamento do analito na matriz biológica foi avaliado após três ciclos de congelamento (-20 °C) e descongelamento. Os resultados indicaram que o etoposídeo é estável sob as condições de congelamento/descongelamento após três ciclos, uma vez que os desvios calculados (Tabela 29) foram inferiores a 15% (BRASIL, 2012) em todas as amostras avaliadas.

Tabela 29 - Resultados obtidos para avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento de amostras de humor vítreo contendo etoposídeo nas concentrações de 2 e 80 µg/mL

Parâmetros	Humor vítreo contendo etoposídeo 2,03 µg/mL (n=3)		Humor vítreo contendo etoposídeo 81,33 µg/mL (n=3)	
	Recém-preparado	Após tratamento	Recém-preparado	Após tratamento
Concentração média ± dp (µg/mL)	1,98 ± 0,05	1,84 ± 0,02	81,24 ± 0,30	79,28 ± 1,12
Desvio em relação ao valor nominal (%)	-2,9	-9,7	-0,1	-2,5
Desvio em relação à amostra recente (%)	-	-7,0	-	-2,4

Estabilidade do etoposídeo em solução

Foi avaliada a estabilidade das soluções estoque e padrão de etoposídeo após a permanência dessas soluções a temperatura ambiente durante 6 horas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 30 e sugerem que as soluções do fármaco são estáveis na temperatura ambiente pelo período de 6 horas, uma vez que os valores de desvio calculados foram inferiores a 10% (BRASIL, 2012).

Tabela 30 - Resultados obtidos para avaliação da estabilidade do etoposídeo em solução nas concentrações de 1 e 1000 µg/mL

Parâmetros	Solução padrão de etoposídeo 1 µg/mL (n=3)		Solução padrão estoque de etoposídeo 1000 µg/mL (n=3)	
	Recém-preparado	Após tratamento	Recém-preparado	Após tratamento
Área média	74082	72902	4058813*	4022770*
DPR (%)	0,4	1,3	0,2	0,9
Desvio em relação à amostra recente (%)	-	-1,6	-	-0,9

Nota: Área correspondente à solução de etoposídeo a 50 µg/mL, devido à diluição necessária para realização da análise pelo método por CLAE desenvolvido.

6.18 Estudo de liberação *in vivo* do etoposídeo a partir dos implantes de PLGA

Os implantes de PLGA e etoposídeo foram inseridos, através da *pars plana*, na cavidade vítrea dos olhos de coelhos albinos (Figura 40a), evitando assim, danos à retina, músculos e nervos (SOUZA *et al.*, 2014). Um trocater transescleral de calibre 25 gauge (Figura 40b) foi utilizado neste procedimento cirúrgico, que apresenta como vantagem, o fato de ser um processo minimamente invasivo e sem a necessidade de sutura, uma vez que a esclerotomia é auto-selante.

Figura 40 - Implante constituído por PLGA e etoposídeo (ponta da seta) inserido na cavidade vítrea do olho direito do coelho (a), por meio de um Trocater transescleral (25G Edgeplus®, Alcon, EUA) (b)



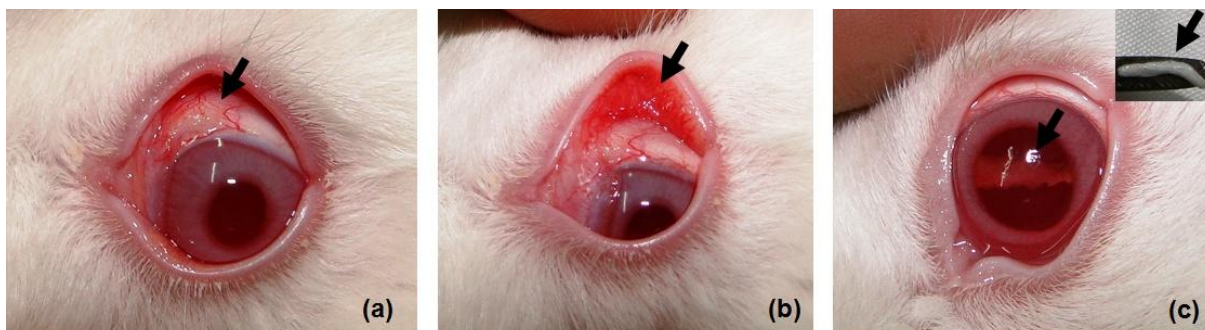
Essa técnica também foi utilizada por Saliba *et al.* (2011) e Souza *et al.* (2014) para inserção de implantes poliméricos na cavidade vítrea de olhos de coelhos com objetivo de avaliar a farmacocinética e toxicidade desses dispositivos.

Devido ao pequeno calibre do trocater utilizado, os implantes devem apresentar dimensões adequadas (diâmetro máximo de 0,4 mm) que possibilitem sua passagem pela cânula. Em vista disso, as dimensões dos implantes de PCL contendo etoposídeo foram alteradas de forma a obter dispositivos com diâmetro ($0,37\pm 0,04$ mm) e comprimento ($7,89\pm 0,16$ mm) adequados para sua introdução na cavidade vítrea utilizando o trocater transescleral. No entanto, estes sistemas foram muito frágeis, impossibilitando a realização desse procedimento. Com intuito de reduzir a fragilidade e conferir flexibilidade aos dispositivos de PCL e etoposídeo, um plasticizante (glicerol na concentração de 30% p/p – PATEL *et al.*, 2009) foi adicionado à formulação. De acordo com Pietro *et al.* (2008), as moléculas do plasticizante seriam capazes de se interporem entre as cadeias do polímero, reduzindo a interação entre elas e, assim, favorecendo a flexibilidade da matriz polimérica. Contudo, os implantes obtidos permaneceram frágeis, impedindo a realização do procedimento cirúrgico. Em vista disso, o estudo de liberação *in vivo* desses sistemas não foi realizado.

Já os dispositivos de PLGA contendo etoposídeo foram implantados com sucesso por meio da técnica descrita anteriormente (Figura 40a).

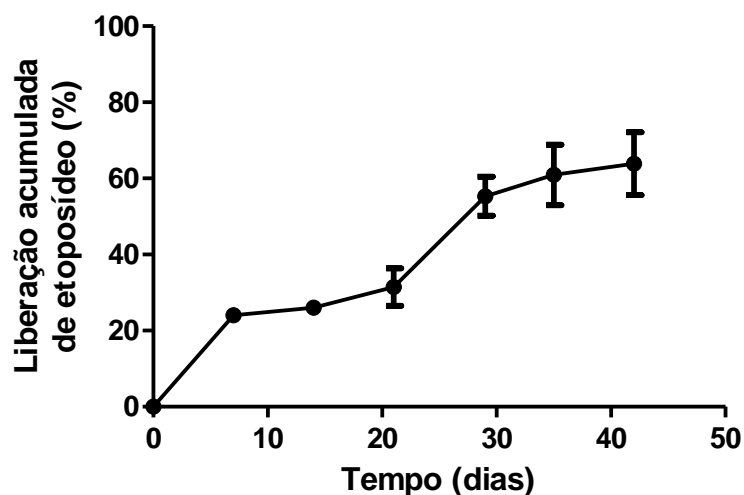
O exame clínico dos olhos dos coelhos, nos quais os implantes foram inseridos na cavidade vítrea, evidenciou a ausência de toxicidade local e nenhum animal do estudo foi perdido. As manifestações clínicas oculares observadas foram: hiperemia moderada da mucosa palpebral em um animal do grupo 1 (coelhos que receberam os implantes constituídos de PLGA e etoposídeo); e hiperemia conjuntival moderada em dois animais desse mesmo grupo (Figura 41). Ambas as manifestações clínicas regrediram de forma espontânea após quatorze dias do processo cirúrgico. Nas semanas seguintes, não foram verificadas alterações significativas nos olhos dos animais dos grupos 1 e 2. Essas observações indicaram que os implantes de PLGA incorporados de etoposídeo foram bem tolerados quando inseridos na cavidade vítrea dos olhos de coelhos, corroborando os resultados obtidos no teste HET CAM desses dispositivos (*item 6.16*).

Figura 41 - Olhos submetidos ao processo cirúrgico para inserção dos implantes constituídos de PLGA e etoposídeo: hiperemia moderada da conjuntiva (a) e da mucosa palpebral (b); implante na cavidade vítrea após 42 dias e sua aparência após a remoção (em destaque) (c)



A Figura 42 apresenta o perfil de liberação *in vivo* do etoposídeo a partir dos implantes de PLGA, que foi obtido na forma de porcentagem acumulada de liberação do fármaco em função do tempo em dias. Os sistemas desenvolvidos promoveram a liberação prolongada do antitumoral na cavidade vítrea dos olhos de coelhos, sendo que aproximadamente 63% do fármaco presente no dispositivo polimérico foram liberados em 42 dias.

Figura 42 - Perfil de liberação acumulada *in vivo* de etoposídeo a partir dos implantes de PLGA



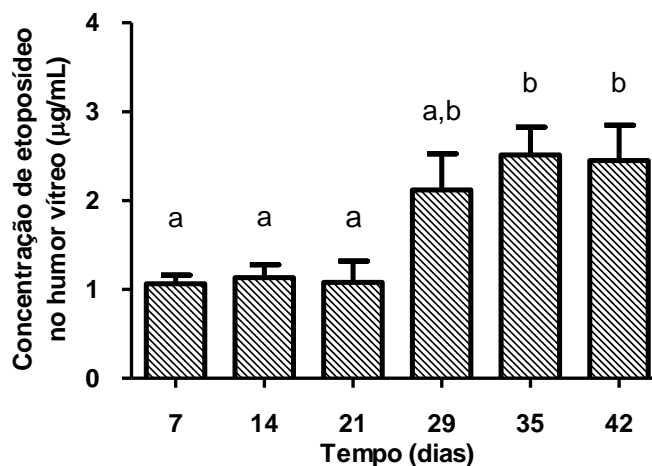
Nota: Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (n=4).

O perfil de liberação *in vivo* do etoposídeo foi caracterizado por uma fase inicial, em que cerca de 24% do antitumoral presente nos implantes foram liberados durante os primeiros sete dias do estudo. Na segunda etapa, que ocorreu entre o 8° e 21° dia, os implantes liberaram aproximadamente 7,4% do fármaco. Nesta fase, foi observada uma liberação lenta do antitumoral, provavelmente, devido a sua difusão através dos poros iniciais presentes na matriz polimérica. Entre o 22° e 29° dia, a taxa de liberação aumentou de forma acentuada e cerca de 23,9% do etoposídeo foram liberados. Uma possível explicação para a maior liberação observada a partir do 22° dia seria o aumento significativo de poros na matriz polimérica decorrente de sua degradação, o que permitiria uma saída mais rápida do fármaco para o meio. A partir do 30° dia, a taxa liberação reduziu novamente e 8,5% do antitumoral foram liberados até o final do estudo.

Comparativamente, o perfil *in vivo* apresentou uma fase inicial de liberação pronunciada do fármaco, ausente no padrão *in vitro* apresentado no item 6.15. Além disso, no estudo *in vivo*, o etoposídeo foi liberado de forma mais rápida. Essas diferenças podem ser atribuídas às diferenças existentes entre as condições fisiológicas e a simulação *in vitro*. O transporte do fármaco no interior do vítreo e sua eliminação do olho são condições fisiológicas que podem contribuir para liberação mais rápida do fármaco no organismo. Além disso, a natureza do humor vítreo e dos tecidos adjacentes ao local de implantação pode gerar gradientes de concentração

dentro do corpo vítreo, afetando a liberação do princípio ativo e contribuindo para a baixa correlação *in vitro/in vivo* observada (AVTAR; TANDON, 2008; FRIEDRICH *et al.*, 1997; TOJO; ISOWAKI, 2001).

Figura 43 – Concentrações intravítreas de etoposídeo liberado a partir dos implantes ao longo de 42 dias de estudo



Nota: Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (n=4).

Médias indicadas com mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Durante o período de estudo, a concentração de etoposídeo no humor vítreo variou de 1,1 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$. A concentração do fármaco (Figura 43) foi relativamente constante (aproximadamente 1,1 $\mu\text{g/mL}$) nos períodos de 7, 14 e 21 dias após a inserção dos dispositivos na cavidade vítrea. A partir do 35º dia, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de etoposídeo (aproximadamente 2,5 $\mu\text{g/mL}$) em relação às primeiras semanas de estudo.

Existem poucos relatos na literatura sobre a farmacocinética ocular do etoposídeo. Mao e colaboradores (2004) determinaram a concentração intravítrea de etoposídeo, após a sua administração por via subconjuntival (2,5 mg/mL, 0,5 mL) em coelhos da raça Nova Zelândia. As concentrações obtidas pelos autores, após 1, 2 e 3 horas da administração do antitumoral, foram, respectivamente, 43,7; 66,7 e 32,4 ng/mL. Nesse estudo, também foram monitorados os níveis de etoposídeo no humor vítreo, após 1, 2 e 3 horas da administração intravenosa, sendo encontradas 12; 25,1; 18 ng/mL, respectivamente aos tempos avaliados. Esses resultados foram inferiores aos níveis intravítreos encontrados durante o estudo de liberação *in vivo* a

partir dos implantes de PLGA e etoposídeo, o que pode ser considerado uma vantagem do sistema desenvolvido.

Não foram encontrados na literatura, dados sobre as concentrações intraoculares efetivas de etoposídeo para o tratamento de retinoblastoma. No entanto, estudos *in vitro* demonstraram que o etoposídeo apresenta atividade antiproliferativa, em concentração micromolar, contra a linhagem Y79 de células de retinoblastoma humano. Shah *et al.* (2008) verificaram que a concentração inibitória a 50% (IC50) para as células Y79 foi de 0,70 µg/mL, enquanto Mitra *et al.* (2011) determinaram uma IC50 de 0,21 µg/mL para a mesma linhagem celular. A relação entre a concentração do etoposídeo no meio de cultura e no tecido tumoral não é conhecida. Contudo, as concentrações no humor vítreo do antitumoral, durante os 42 dias em que os implantes de PLGA e etoposídeo permaneceram inseridos nos olhos dos coelhos, foram superiores aos valores de IC50 para as células Y79. Este resultado é um indício de que concentrações eficazes no corpo vítreo poderiam ser alcançadas a partir dos implantes de PLGA e etoposídeo.

Outro fator importante a ser considerado é que a lipofilicidade ou hidrofiliabilidade do fármaco interferem em sua concentração no tecido (FIALHO *et al.*, 2006). Assim, um fármaco lipofílico, como o etoposídeo, provavelmente, apresentará concentrações diferentes no vítreo e tecidos adjacentes. As concentrações de fármacos lipofílicos tendem a ser maiores em tecidos com características lipofílicas, como a retina, do que em tecidos hidrofílicos como o vítreo.

Em vista dos resultados apresentados, os implantes de PLGA contendo etoposídeo puderam ser facilmente inseridos na cavidade vítrea, por meio de procedimento cirúrgico relativamente simples. Esses implantes apresentaram boa tolerância intraocular no olho de coelho, além de proporcionarem a liberação prolongada do etoposídeo no corpo vítreo, permitindo alcançar concentrações na faixa de 1,1 a 2,5 µg/mL, no período de 42 dias.

Frente ao exposto, pode-se inferir que o implante constituído de PLGA e etoposídeo apresenta potencial para se tornar uma alternativa para o tratamento do retinoblastoma. No entanto, estudos ainda são necessários para assegurar sua aplicação clínica.

CONCLUSÕES



7 CONCLUSÕES

- Foi possível obter dois sistemas poliméricos contendo etoposídeo: implantes constituídos por PCL e etoposídeo (1:1) que foram preparados pelo método de fusão (sem necessidade de adição de solvente) e moldagem a quente; e implantes de PLGA incorporado de etoposídeo (2:1) preparados pelo método de evaporação do solvente e moldagem a quente.

- Os resultados das técnicas FTIR, TG e DSC, para ambos os implantes, demonstraram que a incorporação do fármaco à matriz polimérica não promoveu modificações químicas detectáveis nos componentes da formulação. No caso dos implantes de PCL e etoposídeo, esse resultado também foi confirmado pelas análises de WAXS.

- Ambos os implantes desenvolvidos apresentaram superfície externa lisa e sem poros. Além disso, o etoposídeo apresentou uma distribuição uniforme tanto nos implantes de PCL como nos de PLGA.

- Os implantes constituídos de PCL e etoposídeo promoveram a liberação prolongada do fármaco *in vitro* por 150 dias. Esses sistemas apresentaram baixa permeabilidade a água e perda de massa total de 35% no período de 150 dias.

- Os dispositivos de PLGA incorporados de etoposídeo promoveram a liberação prolongada do antitumoral *in vitro* por 50 dias. Esses sistemas apresentaram perda de massa total de 28% no período de 42 dias.

- Ambos os sistemas poliméricos foram classificados como não irritantes pelo Teste HET-CAM.

- Foi possível inserir os implantes de PLGA contendo etoposídeo na cavidade vítrea dos olhos de coelho, por meio da utilização de um trocater transescleral. Esses dispositivos não apresentaram potencial tóxico quando implantados, por 42 dias, nos de olhos de coelhos.

- Os sistemas de PLGA e etoposídeo promoveram a liberação prolongada do fármaco na cavidade vítrea dos olhos de coelho, permitindo alcançar concentrações na faixa de 1,1 a 2,5 µg/mL, no período de 42 dias.

- O método por CLAE com detecção UV (285 nm) se mostrou adequado para quantificação de etoposídeo em implantes de PCL. O método demonstrou ser seletivo, preciso, exato, robusto, e com linearidade adequada na faixa de 5,0 a 65,0 µg/mL.

- O método por CLAE com detecção UV (247 nm) se mostrou adequado para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA. O método demonstrou ser seletivo, preciso, exato, robusto, e com linearidade adequada na faixa de 2 a 45 µg/mL.

- As condições analíticas do método cromatográfico para quantificação de etoposídeo em implantes de PLGA foram adequadas para determinação deste antitumoral em amostras de humor vítreo. O método bioanalítico foi validado e mostrou ser seletivo, preciso, exato e com linearidade adequada na faixa de 1 a 100 µg/mL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, D.H.; DUNKEL, I.J.; BRODIE, S.E.; MARR, B.; GOBIN, Y.P. Superselective Ophthalmic Artery Chemotherapy as Primary Treatment for Retinoblastoma (Chemosurgery). **Ophthalmology**, v. 117, n. 8, p. 1623-1629, 2010.

AKHTAR, N.; TALEGAONKAR, S.; KHARA, R.K.; JAGGI, M. A validated stability-indicating LC method for estimation of etoposide in bulk and optimized self-nano emulsifying formulation: Kinetics and stability effects. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 1, p. 103-111, 2013.

ALANY, R.G.; RADES, T; NICOLL, J.; TUCKER, I.G.; DAVIES, N.M. W/O microemulsions for ocular delivery: evaluation of ocular irritation and precorneal retention. **Journal of Controlled Release**, v. 111, n. 1-2, p. 145-152, 2006.

AREÁN, C.; ORELLANA, M.E.; ABOURBIH, D.; ABREU, C.; PIFANO, I.; BURNIER, M.N. Expression of vascular endothelial growth factor in retinoblastoma. **Archives Ophthalmology**, v. 128, n. 2, p. 223-229, 2010.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 679 p.

AVTAR, R.; TANDON, D. A mathematical analysis of intravitreal drug transport. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 1, p. 867-877, 2008.

BALMER, A. MUNIER, F.; ZOGRAFOS, L. Retinoblastoma: Diagnosis, Treatment and Prognosis. In: HAYAT, M.T. **Methods of Cancer Diagnosis, Therapy, and Prognosis**. New Jersey: Springer, 2009. cap. 22, p 319 – 336.

BARILE, F.A. Validating and troubleshooting ocular *in vitro* toxicology tests. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 61, n. 2, p. 136-145, 2010.

BEDREGAL, P.; TORRES, B.; UBILLÚS, M.; MENDOZA, P.; MONTOYA, E. Robustness in NAA evaluated by the Youden and Steiner test. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 278, n. 3, p. 801-806, 2008.

BEIJNEN, J.H.; HOLTHUIS, J.J.M.; KERKDIJK, H.G.; HOUWEN, O.A.G.J.; PAALMAN, A.C.A.; BULT, A.; UNDERBERG, W.J.M. Degradation kinetics of etoposide in aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 41, n. 1-2, p. 169-178, 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 2 v. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>. Acesso em: 20 out. 2010.

_____. Ministério da Saúde. 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, n. 104, 2 jun. 2003. Seção 1, p. 56-59. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=02/06/2003&jornal=1&pagina=56&totalArquivos=176>>. Acesso em: 11 out. 2011.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 98, 22 maio 2012. Seção 1, p. 93-94. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=93&data=22/05/2012>>. Acesso em: 11 jun. 2013.

BUITRAGO, E.; DEL-SOLE, M.J.; TORBIDONI, A.; FANDINO, A.; ASPREA, M.; CROXATTO, J.O.; CHANTADA, G.L.; BRAMUGLIA, G.F.; SCHAIQUEVICH, P. *et al.* Ocular and systemic toxicity of intravitreal topotecan in rabbits for potential treatment of retinoblastoma. **Experimental Eye Research**, v. 108, p. 103-109, 2013.

BRITISH pharmacopeia 2012. London: The Stationery Office, 2012. v. 4, 3413-4088 p.

CALLEWAERT, M.; DUKIC, S.; VAN-GULICK, L.; VITTIER, M.; GAFA, V.; ANDRY, M.C.; MOLINARI, M.; ROULLIN, V.G. Etoposide encapsulation in surface-modified poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles strongly enhances glioma antitumor efficiency. **Journal of Biomedical Materials Research: Part A**, v. 101, n. 5, p. 1319-1327, 2013.

CAMARGO, B.; OLIVEIRA-SANTOS, M.; REBELO, M.S.; SOUZA-REIS, R.; FERMAN, S.; NORONHA, C.P.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14 population-based cancer registries. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 3, p. 715 – 720, 2010.

CARCABOSO, A.M.; CHIAPPETTA, D.A.; OPEZZO, J.A.; HÖCHT, C.; FANDIÑO, A.C.; CROXATTO, J.O.; RUBIO, M.C.; SOSNIK, A.; ABRAMSON, D.H.; BRAMUGLIA, G.F.; CHANTADA, G.L. Episcleral implants for topotecan delivery to

the posterior segment of the eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 51, n. 4, p. 2126-2134, 2010.

CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MARTINS, L.R.R.; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CAULCUTT, R.; BODDY, R. **Statistics for analytical chemists**. 1st ed. New York: Chapman and Hall, 1983, 253p.

CHABNER, B.C.; RYAN, D.P.; PAZ-ARESM L.; GARCIA-CARBONERO, R.; CALABRESI, P. Antineoplastic Agents. In: BRUNTON, L.L. *et al.* **Goodman & Gilman**: as bases farmacológicas da terapêutica. 11.ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. cap. 52. p. 1041-1093.

CHENG, L.; GUO, S.; WU, W. Characterization and *in vitro* release of praziquantel from poly(ϵ -caprolactone) implants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, n. 1-2, p. 112- 119, 2009.

CHENG, L.; LEI, L.; GUO, S. *In vitro* and *in vivo* evaluation of praziquantel loaded implants based on PEG/PCL blends. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 387, n. 1-2, p. 129-138, 2010.

CHOW, D.; SHAH, J. Stability-indicating high-performance liquid chromatography of etoposide at various pH conditions using a reversed-phase octyl column. **Journal of Chromatography**, v. 396, p. 217-223, 1987.

CICCOLINI, J.; MONJANEL-MOUTERDE, S.; BUN, S.S.; BLANC, C.; DUFFAUD, F.; FAVRE, R.; DURAND, A. Population pharmacokinetics of etoposide: application to therapeutic drug monitoring. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 74, n. 6, p. 709-714, 2002.

CLARK, P.I.; SLEVIN, M.L.; JOEL, S.P.; OSBORNE, R.J.; TALBOT, D.I.; JOHNSON, P.W.; REZNEK, R.; MASUD, T.; GREGORY, W.; WRIGLEY, P.F. A randomized trial of two etoposide schedules in small-cell lung cancer: the influence of pharmacokinetics on efficacy and toxicity. **Journal of Clinical Oncology**, v. 12, n. 7, p. 1427-1435, 1994.

DASH, T.K.; KONKIMALLA, V.B. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: a review. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 1, p. 15-33, 2012.

DIMARAS, H.; KIMANI, K.; DIMBA, E.A.; GRONSDAHL, P.; WHITE, A.; CHAN, H.S.; GALLIE, B.L. Retinoblastoma. **Lancet**, v. 379, n. 9824, p. 1436-1446, 2012.

DIJK, J.; OOSTROM, K.J.; HUISMAN, J.; MOLL, A.C.; COHEN-KETTENIS, P.T.; RINGENS, P.J.; IMHOF, S.M. Restrictions in daily life after retinoblastoma from the perspective of the survivors. **Pediatric Blood Cancer**, v. 54, n. 1, p. 110-115, 2010.

ELJARRAT-BINSTOCK, E.; PEER, J.; DOMB, A.J. New techniques for drug delivery to the posterior eye segment. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n.4, p. 530-543, 2010.

EUROPEAN MEDICINE AGENCY – EMEA. **Guideline on bioanalytical method validation**. London, 2011. Disponível em: <www.ema.europa.eu>. Acesso em: 25 mar. 2013.

EVANS, W.E.; SINKULE, J.A.; CROM, W.R.; DOW, L.; LOOK, A.T.; RIVERA, G. Pharmacokinetics of teniposide (VM26) and etoposide (VP16-213) in children with cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 7, n. 2-3, p. 147 - 150, 1982.

FIALHO, S.L.; BEHAR-COHEN, F.; SILVA-CUNHA, A. Dexamethasone-loaded poly(ϵ -caprolactone) intravitreal implants: a pilot study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 637-646, 2008.

FIALHO, S.L.; SIQUEIRA, R.C.; JORGE, R.; SILVA-CUNHA, A. Biodegradable implants for ocular delivery of anti-inflammatory drug. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 17, n. 1, p. 93-97, 2007.

FIALHO, S.L.; *et al.* Safety and pharmacokinetics of an intravitreal biodegradable implant of dexamethasone acetate in rabbit eyes. **Current Eye Research**, v. 31, n.6, p. 525-534, 2006.

FIALHO, S.L.; RÊGO, M.B.; SIQUEIRA, R.C.; JORGE, R.; HADDAD, A.; RODRIGUES, A.L.; MAIA-FILHO, A.; SILVA-CUNHA, A. Implantes biodegradáveis destinados à administração intraocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, n. 6, p. 891-896, 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation**. Rockville, 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2013.

FREDENBERG, S.; WAHLGREN, M.; RESLOW, M.; AXELSSON, A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems - a review. **International journal of pharmaceutics**, v. 415, n.1-2, p. 34-52, 2011.

FRIEDRICH, S.; SAVILLE, B.; CHENG, Y. L. Drug distribution in the vitreous humour of the human eye: the effects of aphakia and changes in retinal permeability and vitreous diffusivity. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics**, v. 13, n. 5, p. 445-459, 1997.

_____. Mathematical modeling of drug distribution in the vitreous humor. In: MITRA, A.K. Ophthalmic Drug Delivery Systems. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2003. cap. 6, p. 181-221.

GILHOTRA, R.M.; NAGPAL, K.; MISHRA, D.N. Azithromycin novel drug delivery system of ocular application. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 1, n. 1, p. 22 – 28, 2011.

GREEN, J.M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, v. 68, n.9, p. 305A-309A, 1996.

GUPTA, H.; AQIL, M.; KHAR, R.K.; ALI, A.; BHATNAGAR, A.; MITTAL, G. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 2, p. 324-333, 2010.

HANDE, K.R. Topoisomerase II inhibitors. **Update on Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 1, p. 13-26, 2008.

_____. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. **European Journal of Cancer**, v. 34, n.10, p. 1514 - 1521, 1998.

HUBERT, P.; NGUYEN-HUU, J.J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P.; COHEN, N.; COMPAGNON, P.A.; DEWÉ, W.; FEINBERG, M.; LALLIER, M.; LAURENTIE, M.; MERCIER, N.; MUZARD, G.; NIVET, C.; VALAT, L.; ROZET, E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal – Part II. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 1, p. 70 – 81, 2007a.

HUBERT, P.; HUBERT, P.; NGUYEN-HUU, J.J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; COHEN, N.; COMPAGNON, P.A.; DEWÉ, W.; FEINBERG, M.; LAURENTIE, M.; MERCIER, N.; MUZARD, G.; VALAT, L.; ROZET, E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal–Part III. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 1, p. 82 – 96, 2007b.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 Revisão 02**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, 2007. 25p. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf>. Acesso em: 10 set. 2011.

_____. Coordenação Geral de Acreditação. **DOQ-CGCRE-008 Revisão 04**: Orientação sobre validação de métodos analíticos . 2011. 20p. Disponível em: <www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2012.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUERIMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH. **Validation of analytical procedures**: text and methodology - Q2(R1). Geneva, 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org>>. Acesso em: 23 jul 2011.

INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA. 4.ed. Geneva: World Health Organization, 2006. Disponível em:< <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>>. Acesso em: 22 jul 2014.

JABOUR, P.; CHALOUHI, N.; TJOUMAKARIS, S.; GONZALEZ, L.F.; DUMONT, A.S.; CHITALE, R.; ROSENWASSER, R.; BIANCIOTTO, C.G.; SHIELDS, C. Pearls and pitfalls of intraarterial chemotherapy for retinoblastoma. **Journal of Neurosurgery Pediatrics**, v. 10, n. 3, p. 175 – 181, 2012.

JAIN, R.A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2475-2490, 2000.

JARDY, A.; VIAL, J. L’apport des methods statistiques dans la maîtrise de la qualité des analyses. **Analisis**, v. 27, n.6, p. 511 – 519, 1999.

JASTI, B.R.; DU, J.; VASAVADA, R.C. Characterization of thermal behavior of etoposide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 118, n. 5, p. 161-167, 1995.

KIMURA, H.; OGURA, Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. **Ophthalmologica**, v. 215, n. 3, p. 143-155, 2001.

KISS, S.; LEIDERMAN, Y.; MUKAI, S. Diagnosis, classification, and treatment of retinoblastoma. **International Ophthalmology Clinics**, v. 48, n. 2, p. 135-147, 2008.

KUNO, N.; FUJII, S. Biodegradable intraocular therapies for retinal disorders. **Drugs Aging**, v. 27, n. 2, p. 117-134, 2010.

LI, C.; CHENG, L.; ZHANG, Y.; GUO, S.; WU, W. Effects of implant diameter, drug loading and end-capping on praziquantel release from PCL implants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 386, n. 1-2, p. 23-29, 2010.

LI, D.; GUO, G.; FAN, R.; LIANG, J.; DENG, X.; LUO, F.; QIAN, Z. PLA/F68/Dexamethasone implants prepared by hot-melt extrusion for controlled release of anti-inflammatory drug to implantable medical devices: I. Preparation, characterization and hydrolytic degradation study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1-2, p. 365-372, 2013.

LUEPKE, N.P.; KEMPER, F.H. Toxicity Testing by the Hen's Egg Test (HET). **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 6-7, p. 495-496, 1986.

MAANEM, J.S.M.; RETÈL, J.; VRIES, J.; PINEDO, H.M. Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 80, n. 19, p. 1526-1533, 1988.

MAINARDES, R.B.; GREMIÃO, M.P.D.; EVANGELISTA, R.C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 523-530, 2006.

MAKADIA, H.L.; SIEGEL, S.J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1377-1397, 2011.

MALLIPATNA, A.C.; DIMARAS, H.; CHAN, H.S.; HÉON, E.; GALLIE, B.L. Periocular Topotecan for Intraocular Retinoblastoma. **Archives of Ophthalmology**, v. 129, n. 6, p. 738-745, 2011.

MAO, Y.; WU, Z.; YANG, H.; LIN, S.; ZHENG, J. Measurement of intraocular concentrations of etoposide after systemic and local administration. **Eye Science**, v. 20, n. 3, p. 178-180, 2004.

MCDONALD, P.F.; LYONS, J.G.; GEEVER, L.M.; HIGGINBOTHAM, C.L. *In vitro* degradation and drug release from polymer blends based on poly(DL-lactide), poly(L-lactide-glycolide) and poly(ϵ -caprolactone). **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 5, p. 1284-1292, 2010.

MEEL, R.; RADHAKRISHNAN, V.; BAKHSHI, S. Current therapy and recent advances in the management of retinoblastoma. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology**. v. 33, n. 2, p. 80-88, 2012.

MIDDLETON, J.C.; TIPTON, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2335-2346, 2000.

MITRA, M.; DILNAWAZ, F.; MISRA, R.; HARILAL, A.; VERMA, R.S.; SAHOO, S.K.; KRISHNAKUMAR, S. Toxicogenomics of nanoparticulate delivery of etoposídeo: potential impact on nanotechnology in retinoblastoma therapy. **Cancer Nanotechnology**, v. 2, n. 1-6, p. 21-36, 2011.

MOHANTY, A.K.; DILNAWAZ, F.; MOHANTY, C.; SAHOO, S.K. Etoposide-loaded biodegradable amphiphilic methoxy (poly ethylene glycol) and poly (epsilon caprolactone) copolymeric micelles as drug delivery vehicle for cancer therapy. **Drug Delivery**, v. 17, n. 2, p. 330-342, 2010.

MONTECUCCO, A.; BIAMONTI, G. Cellular response to etoposide treatment. **Cancer Letters**, v. 252, n. 1, p. 9-18, 2007.

MONTGOMERY, D.; PECK, E.; VINING, G. **Introduction to linear regression analysis**. New York: Wiley Interscience Publication, 2001. 641 p.

MORALES, J.O.; MCCONVILLE, J.T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 2, p. 187-199, 2011.

MOROI, S.E.; LICHTER, P.R. Farmacologia Ocular. In: BRUNTON, L.L. *et al.* **Goodman & Gilman**: as bases farmacológicas da terapêutica. 11.ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. cap. 66. p. 1369-1388.

OLIVEIRA, A.R.; MOLINA, E.F.; MESQUITA, P.C.; FONSECA, J.L.C.; ROSSANEZI, G.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; OLIVEIRA, A.G.; SILVA-JÚNIOR, A.A. Structural and thermal properties of spray-dried methotrexate-loaded biodegradable

microparticles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 1, n. 2, p. 1-11, 2013.

PARAREDA, A.; CATALÀ, J.; CARCABOSO, A.M.; SOLA, T.; CRUZ, O.; DÍAZ, J.; SALVADOR, H.; TORRES, C.; ÁLVAREZ-SAMPONS, A.; SUÑOL, M.; VINENT, J.; GUIMARAENS, L.; PRAT, J.; MORA, J. Intra-arterial chemotherapy for retinoblastoma: challenges of a prospective study. **Acta Ophthalmologica**, v. 92, n. 3, p. 209-2015, 2014.

PARMAR, J.J.; SINGH, D.J.; LOHADE, A.A.; HEGDE, D.D.; SONI, P.S.; SAMAD, A.; MENON, M.D. Inhalational system for etoposide liposomes: formulation development and *in vitro* deposition. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, n. 6, p. 656-662, 2011.

PARULEKAR, M.V. Retinoblastoma: current treatment and future direction. **Early Human Development**, v. 86, n. 10, p. 619 – 625, 2010.

PATEL, D.H.; PATEL, M.P.; PATEL, M.M. Formulation and evaluation of drug free ophthalmic films prepared by using various synthetic polymers. **Journal of Young Pharmaceutics**, v. 1, n. 2, p. 116-120, 2009.

PERUMAL, V.A. **Multipolymeric monolayered mucoadhesive films for drug therapy**. Thesis (Masters Degrees Pharmaceutical Sciences) - School of Pharmacy and Pharmacology. University of KwaZulu-Natal, 2011. Disponível em: <<http://researchspace.ukzn.ac.za/xmlui/handle/10413/1275>>. Acesso em: 17 jun. 2013.

PIETRO, L.; SILVA, D.R.; CARMO, A.R.M; DUEK, E.A. The microscopical characterization of membranes poly(L-glycolic-co-lactic acid) with and without added plasticizer: an *in vivo* study. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 3, p. 1069-1074, 2008.

RAY, A; GOMBOS, D.S.; VATS, T.S. Retinoblastoma: an overview. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 79, n. 8, p. 916-921, 2012

REIF, S.; KINGREEN, D.; KLOFT, C.; GRIMM, J.; SIEGERT, W.; SCHUNACK, W.; JAEHDE, U. Bioequivalence investigation of high dose etoposide and etoposide phosphate in lymphoma patients. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 48, n. 2, p. 134-140, 2001.

REIF, S.; NICOLSON, M.C.; BISSET, D.; REID, M.; KLOFT, C.; JAEHDE, U.; MCLEOD, H.L. Effect of grapefruit juice intake on etoposide bioavailability. **Europe Journal Clinical Pharmacology**, v. 58, n. 7, p. 491-494, 2002.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 111–125, 2007.

SALIBA, J.B.; FARACO, A.A.G.; YOSHIDA, M.I.; VASCONCELOS, W.L.; SILVA-CUNHA, A.; MANSUR, H.S. Development and characterization of an intraocular biodegradable polymer system containing cyclosporine-A for the treatment of posterior uveitis. **Materials Research**, v. 11, n. 2, p. 207-211, 2008.

SALIBA, J.B. **Avaliação biológica de implantes biodegradáveis contendo ciclosporina (A) de administração intravítrea**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

SALIBA, J.B.; SILVA-CUNHA, A.; SILVA, G.R.; YOSHIDA, M.I.; MANSUR, A.A.P.; MANSUR, H.S. Characterization and *in vitro* release of cyclosporine-a from poly(d,l-lactide-co-glycolide) implants obtained by solvent/extraction evaporation. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 723-727, 2012.

SHAH, H.R.; CONWAY, R.M.; VAN QUILL, K.R.; MADIGAN, M.C.; HOWARD, S.A.; QI, J.; WEINBERG, V.; O'BRIEN, J.M. Beta-lapachone inhibits proliferation and induces apoptosis in retinoblastoma cell lines. **Eye**, v. 22, n.3, p. 454-460, 2008.

SHAH, J.C.; CHEN, J.R.; CHOW, D. Preformulation study of etoposide: identification of physicochemical characteristics responsible for the low and erratic oral bioavailability of etoposide. **Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 5, p. 408-412, 1989.

SHAH, S.; PAL, A.; GUDE, R.; DEV, S. A novel approach to prepare etoposide-loaded poly(n-vinyl caprolactam-co-methylmethacrylate) copolymeric nanoparticles and their controlled release studies. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 6, p. 4991-4999, 2013.

SILVA-CUNHA, A.; FIALHO, S.L.; NAUD, M.C.; BEHAR-COHEN, F. Poly- ϵ -caprolactone intravitreal devices: an *in vivo* study. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, n. 5, p. 2312-2318, 2009.

SILVA, G.R.; CALDEIRA, A.S.; DAMICO, F.M.; TAKAHASHI, B.S.; SILVA-CUNHA, A.; FIALHO, S.L. Analysis of acyclovir in vitreous humor by a validated HPLC method. **Pharmazie**, v. 68, n. 4, p. 1-5, 2013.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G., **Statistical Methods**. 8 ed. Ames: Jowa State University, 1996, 503 p.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. [S.I.]: John Wiley – Interscience, 1997, 800 p.

SOSNIK, A.; CARCABOSO, A.M. Nanomedicines in the future of pediatric therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 73, p. 140-161, 2014.

SOUZA, M.C.; FIALHO, S.L.; SOUZA, P.A.; FULGÊNCIO, G.O.; DA SILVA, G.R.; SILVA-CUNHA, A. Tacrolimus-loaded PLGA implants: *in vivo* release and ocular toxicity. **Current Eye Research**, v. 39, n. 1, p. 99-102, 2014.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005.

STAY, M.S.; XU, J.; RANDOLPH, T.W.; BAROCAS, V.H. Computer simulation of convective and diffusive transport of controlled-release drugs in the vitreous humor. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 1, p. 96-102, 2003.

TANG, T.; FU, J.; WATKINS, D.N.; HANES, J. Enhanced efficacy of local etoposide delivery by poly(ether-anhydride) particles against small cell lung cancer *in vivo*. **Biomaterials**, v. 31, n. 2, p. 339-344, 2010.

THRIMAWITHANA, T.R.; YOUNG, S.; BUNT, C.R.; GREEN, C.; ALANY, R.G. Drug delivery to the posterior segment of the eye. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 5/6, p. 270 -277, 2011.

TIAN, L.; HE, H.; TANG, X. Stability and degradation kinetics of etoposide-loaded parenteral lipid emulsion. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 96, n. 7, p. 1719 - 1728, 2007.

TOJO, K.; ISOWAKI, A. Pharmacokinetic model for *in vivo/in vitro* correlation of intravitreal drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, Amsterdam, v. 52, n. 1, p. 17-24, 2001.

TOFFOLI, G.; CORONA, G.; BASSO, B.; BOIOCCHI, M. Pharmacokinetic optimisation of treatment with oral etoposide. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 43, n. 7, p. 441-466, 2004.

UNITED States Pharmacopeia: USP 35 / The National Formulary: NF30: 2012. Rockville: The United States Pharmacopeial convention, 2012. v. 1, 2020 p.

UPPAL, P.; JAMPEL, H.D.; QUIGLEY, H.A.; LEONG, K.W. Pharmacokinetics of etoposide delivery by a bioerodible drug carrier implanted at glaucoma surgery. **Journal of ocular pharmacology**, v. 10, n.2, p. 471-479, 1994.

WANG, S.; GUO, S.; CHENG, L. Disodium norcantharidate loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres I. Preparation and evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, n. 1-2, p. 130-137, 2008.

WEINBERG, B.D.; BLANCO, E.; GAO, J. Polymer Implants for Intratumoral Drug Delivery and Cancer Therapy. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 5, p. 1681-1702, 2008.

WILLOUGHBY, C.E.; PONZIN, D.; FERRARI, S.; LOBO, A.; LANDAU, K.; OMIDI, Y. Anatomy and physiology of the human eye: effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function: a review. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 38, n. s1, p. 2-11, 2010.

WOODRUFF, M.A.; HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer – polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217-1256, 2010.

YADAV, K.S.; SAWANT, K.K. Formulation optimization of etoposide loaded PLGA nanoparticles by double factorial design and their evaluation. **Current Drug Delivery**, v. 7, n. 1, p. 51-64, 2010.

YASUKAWA, T.; OGURA, Y.; SAKURAI, E.; TABATA, Y.; KIMURA, H. Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 14, p. 2033-2046, 2005.

YOU DEN, W.J.; STEINER, E.H. **Statistical manual of AOAC - Association of Official Analytical Chemistry**. Washington: AOAC, 1975. 88 p.

ANEXO



Anexo A - Ofício de aprovação do projeto pela Comissão de ética no uso de animais da Funed



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o **Protocolo nº 030/2011**, relativo ao projeto intitulado “**Avaliação in vivo de implantes poliméricos intra-oculares contendo etoposídeo destinados ao tratamento de retinoblastoma**” que tem como responsável **Dra. Sílvia Ligório Fialho**, está de acordo com Princípios Éticos da experimentação animal, adotados pela **Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA/Funed)**, tendo sido **APROVADO** na reunião do dia **15/02/2012**.

Belo Horizonte, 16 de fevereiro de 2012.

Myrian Morato Duarte
Coordenadora da CEUA/Funed

Obs.: a validade deste protocolo é de 02 anos a partir da data de sua expedição.

APÊNDICE



APÊNDICE A - Artigos científicos publicados e trabalhos apresentados em congresso

Artigos científicos publicados

SOLANO, A.G.R.; SILVA, G.R.; FIALHO, S.L.; SILVA-CUNHA, A.; PIANETTI, G.A. development and validation of a High Performance Liquid Chromatographic method for determination of etoposide in biodegradable polymeric implants. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1239-1243, 2012.

SOLANO, A.G.R.; SILVA, G.R.; PIANETTI, G.A. Application of the accuracy profile to validation of chromatographic method for determination of etoposide in polymeric matrix. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 32, n. 2, p. 275-281, 2013.

SOLANO, A.G.R.; PEREIRA, A.F.; PINTO, F.C.; FERREIRA, F.C.; BARBOSA, L.A.O.; FIALHO, S.L.; OLIVEIRA, P.S.P.; SILVA-CUNHA, A.; PIANETTI, G.A. Development and evaluation of sustained-release etoposide-loaded poly(ϵ -caprolactone) Implants. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 2, p. 890-900, 2013.

SOUSA, C.T.; SILVA, G.R.; PIANETTI, G.A.; SOLANO, A.G.R. Spectrophotometric determination of etoposide from polymeric implant and application in the study of *in vitro* release profile. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 3, p. 295-301, 2013.

Artigo submetido ao **European Journal of Pharmaceutical Sciences** (em revisão pelos autores)

SOLANO, A.G.R.; PEREIRA, A.F.; FARIA, L.G.A.; FIALHO, S.L.; PATRICIO, P.S.O.; Silva-Cunha, A.; FULGÊNCIO, G.O.; SILVA, G.R.; PIANETTI, G.A. Etoposide-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) intravitreal implants: *in vitro* and *in vivo* evaluation.

Trabalhos apresentados em congresso

SOLANO, A.G.R.; FIALHO, S.L.; SILVA-CUNHA, A.; ORÉFICE, R.L.; VIEIRA, L.C.; SILVA, G.R.; PIANETTI, G.A. Development of etoposide-loaded poly(ϵ -caprolactone) intraocular implant for retinoblastoma treatment. In: **International Congresso of Pharmaceutical Sciences - CIFARP**, 8., 2011, Ribeirão Preto. Anais... Ribeirão Preto: [s.n.], 2011.

SOLANO, A.G.R.; FIALHO, S.L.; SILVA-CUNHA, A.; FULGÊNCIO, G.O.; SILVA, G.R.; PIANETTI, G.A. Desenvolvimento de implantes biodegradáveis contendo etoposídeo para aplicação intraocular. In: **Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais - COLAOB**, 7., 2012, Natal. Anais... Natal: Sociedade Latino Americana de Biomateriais, 2012.

SOLANO, A.G.R.; FIALHO, S.L.; SILVA-CUNHA, A.; ORÉFICE, R.L.; SILVA, G.R.; PIANETTI, G.A. Desenvolvimento e caracterização de implantes intraoculares poliméricos incorporados de etoposídeo. In: **Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais - COLAOB**, 7., 2012, Natal. Anais... Natal: Sociedade Latino Americana de Biomateriais, 2012.

SOLANO, A.G.R.; FIALHO, S.L.; Silva-Cunha, A.; PEREIRA, A.F.; FARIA, L.G.A.; FULGÊNCIO, G.O.; SILVA, G.R.; PIANETTI, G.A. Development and evaluation of sustained-release etoposide-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) implants. In: **International Congresso of Pharmaceutical Sciences - CIFARP**, 9., 2013, Ribeirão Preto. Anais... Ribeirão Preto: [s.n.], 2013

Quim. Nova, Vol. 35, No. 6, 1239-1243, 2012

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR DETERMINATION OF ETOPOSIDE IN BIODEGRADABLE POLYMERIC IMPLANTS

Ana Gabriela Reis Solano*

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de São João Del Rei, Rua Sebastião Gonçalves Coelho, 400, 35501-296 Divinópolis – MG / Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte – MG, Brasil

Gisele Rodrigues da Silva

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de São João Del Rei, Rua Sebastião Gonçalves Coelho, 400, 35501-296 Divinópolis – MG, Brasil

Silvia Ligório Fialho

Divisão de Desenvolvimento Farmacotécnico, Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, 30510-010 Belo Horizonte – MG, Brasil

Armando da Silva Cunha Júnior e Gérson 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

Recebido em 21/9/11; aceito em 16/1/12; publicado na web em 15/5/12

A method using HPLC-UV was developed and validated for the determination of etoposide incorporated into polycaprolactone implants. The method was carried out in isocratic mode using a C18 column (250 x 4.6 mm; 5 μ m), at 25 °C, with acetonitrile and acetic acid 4% (70:30) as mobile phase, a flow rate of 2 mL/min, and UV detection at 285 nm. The method was linear ($r^2 > 0.99$) over the range of 5 to 65 μ g/mL, precise (RSD < 5%), accurate (recovery of 98.7%), robust, selective regarding excipient of the sample, and had a quantitation limit equal to 1.76 μ g/mL. The validated method can be successfully employed for routine quality control analyses.

Keywords: validation; etoposide; poly(ϵ -caprolactone); intraocular implant.

INTRODUCTION

Etoposide (Figure 1) is a semisynthetic derivative of podophyllo-toxin, a compound extracted from the roots and rhizomes of the plants *Podophyllum peltatum* and *P. emodi*.¹ It is a cytotoxic drug whose mechanism of action is believed to be the inhibition of topoisomerase II enzyme. Etoposide is widely used in chemotherapy of various solid tumors including lung cancer, testicular tumor, gastric tumor, ovarian cancer, and retinoblastoma.² However, the systemic administration of anticancer drugs such as etoposide has limited effectiveness in the treatment of solid tumors. As only a small fraction of the total dose of the drug reaches the tumor site and the remainder of the dose is distributed throughout healthy organs and tissues, it causes undesirable effects such as alopecia, hepatotoxicity, leukopenia, myelosuppression, febrile episodes, gastrointestinal toxicity, nephrotoxicity, and cardiomyopathy.^{2,3}

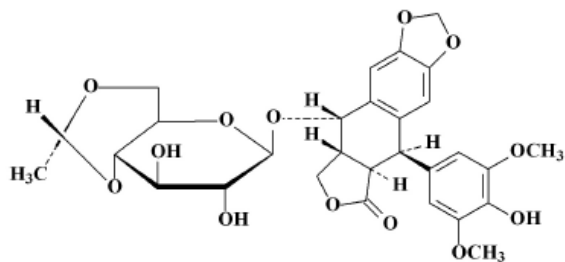


Figure 1. Chemical structure of etoposide

The treatment of solid tumors through locoregional therapy has been widely studied, and the usage of biodegradable polymeric implants containing anticancer drug offers an advantageous alternative. The implants are a sustained drug delivery system that can be inserted in the region where the tumor is located or within the tumor itself. This increases the tumor exposure to drug and also limits systemic toxicity. In addition, the local maintenance of therapeutic levels for a long period of time optimizes the chemotherapy regimen by reducing the number of doses to be administered.³

The implants can be prepared from both biodegradable and non-biodegradable polymers. Nevertheless, biodegradable polymers have been widely used owing to their non-toxic property and biodegradability.⁴ Poly(ϵ -caprolactone) (PCL), a biodegradable and biocompatible polymer, has gained considerable attention owing to its high permeability to several drugs and the possibility of a long sustained and controlled drug release rate.⁵ In an attempt to target the delivery of etoposide for the locoregional treatment of retinoblastoma, a tumor stemming from retinal cells, an etoposide-loaded biodegradable PCL implant has been developed.

Several reports have described methods for quantifying etoposide in different samples. Tang *et al.*⁶ determined etoposide-loaded biodegradable polymeric nanoparticles using the UV-spectrophotometric method at a detection wavelength of 284 nm. However, this method did not provide adequate selectivity for the etoposide, since the drug and its degradation products have the same chromophore.⁷ Chen and Uckun⁸ employed high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS) for measurement of etoposide in human serum and plasma. Although HPLC-MS provides the selective measurement of this drug over a wide analytical range, this technique does not represent a viable analytical method for quantifying the etoposide in routine quality control analysis.

*e-mail: anagabriela@ufsj.edu.br

Application of the Accuracy Profile to Validation of Chromatographic Method for Determination of Etoposide in Polymeric Matrix

Ana G. R. SOLANO ^{1,2}*, Gisele R. SILVA ¹ & Gérson A. PIANETTI ²

¹ *Campus Centro Oeste Dona Lindu, Federal University of São João Del Rei, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil*

² *Department of pharmaceutical products, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil*

SUMMARY. The validation of an analytical method should demonstrate that the method is suitable for its intended purpose. In the current study, the tolerance interval and accuracy profile, a statistical approach that allows defining a region where a predetermined proportion of future measurements obtained with the method will be observed, were applied to the validation of the chromatographic method for determination of etoposide incorporated into a polymeric implant. Hence, it was possible to define the range of etoposide concentrations to which the method may be applied (4.90 to 63.66 $\mu\text{g/mL}$), the quantitation limits (4.61 and 71.0 $\mu\text{g/mL}$), and the linearity of the analytical method. The accuracy profile showed to be a reliable and useful tool for the validation of chromatographic methods.

KEY WORDS: Accuracy profile, Etoposide, Polymeric implant, Tolerance interval, Validation.

* Author to whom correspondence should be addressed. *E. mail:* anagabriela@ufs.br

Research Article

Development and Evaluation of Sustained-Release Etoposide-Loaded Poly(ϵ -Caprolactone) Implants

Ana Gabriela Reis Solano,^{1,2,5,6} Adriana de Fátima Pereira,² Flavia Carmo Horta Pinto,² Letícia Gonçalves Resende Ferreira,² Leandro Augusto de Oliveira Barbosa,² Sílvia Ligório Fialho,³ Patrícia Santiago de Oliveira Patrício,⁴ Armando da Silva Cunha Jr,¹ Gisele Rodrigues da Silva,² and Gérson Antônio Pianetti¹

Received 31 January 2013; accepted 28 April 2013; published online 11 May 2013

Abstract. Poly(ϵ -caprolactone) implants containing etoposide, an important chemotherapeutic agent and topoisomerase II inhibitor, were fabricated by a melt method and characterized in terms of content uniformity, morphology, drug physical state, and sterility. *In vitro* and *in vivo* drug release from the implants was also evaluated. The cytotoxic activity of implants against HeLa cells was studied. The short-term tolerance of the implants was investigated after subcutaneous implantation in mice. The original chemical structure of etoposide was preserved after incorporation into the polymeric matrix, in which the drug was dispersed uniformly. Etoposide was present in crystalline form in the polymeric implant. *In vitro* release study showed prolonged and controlled release of etoposide, which showed cytotoxicity activity against HeLa cells. After implantation, good correlation between *in vitro* and *in vivo* drug release was found. The implants demonstrated good short-term tolerance in mice. These results tend to show that etoposide-loaded implants could be potentially applied as a local etoposide delivery system.

KEY WORDS: etoposide; implant; poly(ϵ -caprolactone); prolonged release.

INTRODUCTION

In recent decades, cancer has become an evident public health problem worldwide. The World Health Organization estimates that in the year 2030, 27 million incidents of cancer and 17 million cancer deaths can be expected (1). Several efforts have been made to obtain more effective treatments for malignant tumors, especially solid cancer, which accounts for about half of all cancer cases worldwide. In addition, these tumors are characterized by not responding well to conventional systemic chemotherapy or radiotherapy, more so when the cancers are large or poorly vascularized (2).

Treatment of solid tumors through locoregional therapy has been widely studied, and usage of polymeric implants containing the anticancer drug acts as an advantageous alter-

native. The implants are a sustained drug delivery system that can be inserted in the region where the tumor is located or within it. This increases the tumor's exposure to the drug and also limits systemic toxicity. In addition, local maintenance of the therapeutic levels for a long period of time optimizes the chemotherapy regimen by reducing the number of doses to be administered (2).

Currently, some successful drug delivery systems are already commercially available, such as Gliadel® Wafer, a biodegradable polyanhydride wafer containing the chemotherapeutic carmustine, used clinically to treat and prevent glioblastoma, a brain cancer. Vantas®, another drug delivery system containing histrelin acetate, is used for the palliative treatment of advanced prostate cancer (3).

The implant can be a preformed device or an *in situ* forming polymeric system. The *in situ* forming polymeric systems are low viscous formulations that are injected and solidify *in situ* to form solid or semi-solid drug depots. These implants are formed from different mechanisms and are classified into: *in situ* cross-linked polymer systems, *in situ* solidifying organogels, and *in situ* phase separation systems (4,5). Kang *et al.* (6) verified that an injectable drug depot for doxorubicin prepared with poly(ethylene glycol)-*b*-polycaprolactone diblock copolymer gel showed a good *in vivo* efficacy after intratumoral injection. This system was more efficacious in inhibiting the growth of the B16F10 tumor implanted subcutaneously on mice than the single injection of

¹ Department of Pharmaceuticals Products, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

² Faculty of Pharmacy, Federal University of São João Del Rei, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil.

³ Ezequiel Dias Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Federal Center of Technological Education, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁵ Rua Sebastião Gonçalves Coelho, 400, Bloco B, sala 301, Chanadour, 35501-296 Divinópolis, Minas Gerais, Brazil.

⁶ To whom correspondence should be addressed. (e-mail: anagabriela@ufsj.edu.br)

Spectrophotometric determination of etoposide from polymeric implant and application in the study of in vitro release profile

Determinação espectrofotométrica de etoposide de implante polimérico e aplicação no estudo do perfil de liberação in vitro

Camila Tavares de Sousa¹, Gisele Rodrigues da Silva¹, Gérson Antônio Pianetti² & Ana Gabriela Reis Solano^{1,2*}

¹Faculty of Pharmacy, Federal University of São João Del Rei, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil

²Department of pharmaceutical products, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

RESUMO

Um método espectrofotométrico rápido, simples e econômico foi desenvolvido para a quantificação de etoposídeo em implantes poliméricos e em amostras obtidas a partir do estudo de liberação *in vitro*. As amostras foram quantificadas a 285 nm. O método foi linear ($r^2 > 0,99$) na faixa entre 5 e 100 µg/ml, preciso (DPR < 5%), exato (valores de recuperação próximos de 100%), seletivo em relação aos excipientes das amostras, e apresentou limite de quantificação igual a 1,68 µg/ml. O método validado foi empregado com sucesso para análises de rotina de controle de qualidade. Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelos método espectrofotométrico e HPLC para a determinação de etoposídeo incorporado em implantes biodegradáveis.

Palavras chave: Estudos de Validação, Espectrofotometria, Polímero.

ABSTRACT

A rapid, economical, and simple UV spectrophotometric method was developed for quantification of etoposide in polymeric implants and samples derived from in vitro release study. The samples were quantified at 285 nm wavelength. The method was linear ($r^2 > 0.99$) over the range of 5 to 100 µg/ml, precise (RSD < 5%), accurate (recovery values close to the 100%), selective regarding excipient of the sample, and had a quantitation limit equal to 1.68 µg/ml. The validated method can be successfully employed for routine quality control analyses. There was no significant difference between the spectrophotometric method and HPLC method for determination of etoposide incorporated into biodegradable devices.

Keywords: Validation Studies, Spectrophotometry, Polymer.

*Corresponding Author: Solano, Gabriela Reis; Rua Sebastião Gonçalves Coelho, 400, sala 301, bloco B, Chanadour, 35501-296, Divinópolis - MG, Brasil, e-mail: anagabriela@ufsj.edu.br

Elsevier Editorial System(tm) for European Journal of Pharmaceutical Sciences
Manuscript Draft

Manuscript Number: EJPS-D-14-00390

Title: Etoposide-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) intravitreal implants: in vitro and in vivo evaluation.

Article Type: Research Paper

Keywords: ocular drug delivery system; retinoblastoma; etoposide; PLGA; In vivo release

Corresponding Author: Prof. Ana Gabriela Reis Solano,

Corresponding Author's Institution: Federal University of São João Del Rei / Federal University of Minas Gerais

First Author: Ana Gabriela Reis Solano