

JULIANA BARBOSA SALIBA

**SISTEMAS BIODEGRADÁVEIS DE
ADMINISTRAÇÃO INTRA-OCULAR CONTENDO
CICLOSPORINA (A) PARA TRATAMENTO DA
UVEÍTE POSTERIOR**

BELO HORIZONTE
Faculdade de Farmácia da UFMG

2007

JULIANA BARBOSA SALIBA

**SISTEMAS BIODEGRADÁVEIS DE
ADMINISTRAÇÃO INTRA-OCULAR CONTENDO
CICLOSPORINA (A) PARA TRATAMENTO DA
UVEÍTE POSTERIOR**

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

Orientador:

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior

Co-orientador:

Prof. Dr. Herman Sander Mansur

BELO HORIZONTE
Faculdade de Farmácia da UFMG

2007

Mapa de Anatomia: O Olho

*O Olho é uma espécie de globo,
é um pequeno planeta
com pinturas do lado de fora.*

*Muitas pinturas:
azuis, verdes, amarelas.*

*É um globo brilhante:
parece cristal,
é como um aquário com plantas
finamente desenhadas: algas, sargaços,
miniaturas marinhas, areias, rochas,
navrágios e peixes de ouro.*

*Mas por dentro há outras pinturas,
que não se vêem:
umas são imagem do mundo,
outras são inventadas.*

*O Olho é um teatro por dentro.
E às vezes, sejam atores, sejam cenas,
e às vezes, sejam imagem, sejam
ausências,
formam, no Olho, lágrimas.*

Cecília Meireles

AGRADECIMENTOS

Ao professor Armando, meu orientador, pela amizade, pela dedicação, por acreditar no meu trabalho e por me proporcionar tanto aprendizado e crescimento acadêmico,

Ao professor Herman, meu co-orientador, pelo apoio, confiança e, principalmente, por me permitir adquirir conhecimentos, até então por mim inalcançáveis,

À professora Maria Irene Yoshida por permitir a realização das análises calorimétricas em seu laboratório e pelo imensurável apoio,

Ao professor André Faraco, por me auxiliar em várias etapas e enriquecer este trabalho com suas inúmeras sugestões,

À Sílvia Fialho pela ajuda nas etapas iniciais deste trabalho,

À Érika, pela amizade e dedicação no momento que mais precisava,

À Laura, Diêgo pela amizade, incansável ajuda e enorme dedicação; sempre presentes e disponíveis nos momentos de necessidades prementes

Ricardo e Gisele pelo colegismo e amizade,

A todos os colegas do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, pelo carinho e apoio nos momentos mais difíceis,

À Nutrição Experimental e à Química Farmacêutica por me concederem espaço no laboratório para o desenvolvimento das formulações e análises das amostras,

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade pela prestatividade e companheirismo,

À minha família pelo apoio e sempre carinho em apoiar os meus projetos de vida e trajetória de estudos, além de forças e ouvidos para concluir essa etapa,

À minha mãe pelo conhecimento profissional,

E a Deus por me proporcionar essa oportunidade tão especial em minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 O olho	17
2.2 Fatores limitantes para a absorção ocular de fármacos	20
2.3. Uveíte: uma doença ocular	23
2.3.1. Medicamentos para o tratamento da uveíte	27
2.4. A Ciclosporina A	28
2.5. Sistemas de liberação modificada	32
2.7 Avaliação físico-química dos constituintes de sistemas de liberação de fármacos (SLF)	38
2.7.1 Características físico-químicas da CsA	39
2.7.3. O copolímero ácido láctico / ácido glicólico (PLGA)	48
2.8 Técnicas de caracterização empregadas	51
2.8.1 Termogravimetria	51
2.8.2. Calorimetria Exploratória Diferencial	52
2.8.3. Espectroscopia no Infravermelho	54
2.8.4 Microscopia eletrônica de varredura	56
2.8.5. Difração de Raios X	57
3 OBJETIVOS	58
3.1 Objetivo geral	58
3.2 Objetivos específicos	58
4 PARTE EXPERIMENTAL	59
4.1 Materiais e métodos	59

4.1.1 Materiais	59
4.1.2 Métodos.....	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
5.1 Validação do método de análise da <i>Ciclosporina A</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	70
5.1.1. Seletividade e especificidade	70
5.1.2 Linearidade.....	73
5.1.3 Precisão intracorridas (repetibilidade)	74
5.1.4 Precisão inter-corrida (intermediária)	75
5.2 Preparo dos implantes biodegradáveis intra-oculares.....	78
5.3 Quantificação da quantidade de CsA presente nos implantes intra-oculares.....	80
5.4 Análise da cristalinidade dos constituintes presentes nos implantes	82
5.5 Caracterização físico-química dos sistemas constituídos por copolímero <i>PLGA 75:25</i> e CsA.....	88
5.5.1 Termogravimetria	88
5.5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial	90
5.5.3 Espectroscopia no Infravermelho	93
5.6 Estudo de liberação <i>in vitro</i> e caracterização morfológica dos implantes intra-oculares contendo CsA	98
5.6.1 Análise do perfil preliminar de liberação do fármaco.....	98
6 CONCLUSÃO.....	109
REFERÊNCIAS	110
CONTRIBUIÇÕES PARA A LITERATURA	118

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Visão externa do olho.	17
FIGURA 2: Esquema anatômico do bulbo do olho em corte horizontal.	18
FIGURA 3: Vias de absorção ocular.	21
FIGURA 4: Classificação anatômica da uveíte.....	24
FIGURA 5: Esquema das funções efetoras e dos linfócitos auxiliares diferenciados	26
FIGURA 6: Representação: (a) da ativação de linfócitos T e (b) do mecanismo de ação da CsA.....	30
FIGURA 7: Estrutura da CsA.....	39
FIGURA 8: Estrutura tridimensional da CsA determinada por Difração de Raios X	40
FIGURA 9: Organização de cadeias poliméricas.	42
FIGURA 10: Estrutura química de alguns polímeros biodegradáveis	44
FIGURA 11: Esquema dos tipos de erosão polimérica	45
FIGURA 12: Ilustração esquemática: (a) erosão superficial e (b) erosão matricial	47
FIGURA 13: Estrutura química do copolímero ácido lático / ácido glicólico	49
FIGURA 14: Mecanismo de hidrólise do PLA, PGA ou PLGA.....	49
FIGURA 15: Exemplo de curva termogravimétrica.....	52
FIGURA 16: Ilustração dos termopares utilizados na técnica. A: amostra e R: referência.	53
FIGURA 17: Esquema das transições térmicas. Tg: temperatura de transição vítrea, Tc: temperatura de recristalização e Tf: temperatura de fusão.	53
FIGURA 18: Tipos de vibrações moleculares (Nota: + indica um movimento se aproximando do leitor; - indica um movimento se afastando do leitor).....	55
FIGURA 19: Espectro eletromagnético indicando a região do infravermelho.....	55
FIGURA 20: Diagrama esquemático de alguns sinais resultantes da interação do feixe de elétron primário com a amostra.	56
FIGURA 21: Esquema da difração do Raios X. No detalhe a interação do feixe com a amostra de forma construtiva (Lei de Bragg).....	57

Figura 22: Fluxograma do preparo dos implantes intra-oculares.	65
FIGURA 23: Cromatograma obtido para: (a) CsA (40 µg/ mL) diluída em TS/ACN e (b) CsA (40 µg/ mL) diluída em ACN.....	71
FIGURA 24: Cromatograma obtido para: (a) TS/ACN e (b) PVA.	72
FIGURA 25: Cromatograma obtido para o polímero PLGA 75:25 em TS após uma semana de degradação.	73
FIGURA 26: Curva de calibração, equação da reta e R ² para a CsA em TS/ACN nas concentrações de 2,5, 5, 10 , 20 e 40 µg/ mL.	74
FIGURA 27: Cromatograma obtido do implante contendo apenas PLGA 75:25 e o padrão de CsA na concentração de 50 µg/ mL após 40 dias de degradação.....	77
FIGURA 28: Fotografia dos implantes a partir: (a) da ML (b) da ME.....	79
FIGURA 29: Espectros no infravermelho na região de 3000 a 2800 cm ⁻¹ das amostras (a) CsA cristalina e (b) CsA amorfa.	83
FIGURA 30: Espectroscopia no Infravermelho na região de 4000 a 2000 cm ⁻¹ das amostras (a) CsA P e (b) CsA L: H = altura do pico 2957 cm ⁻¹ para CsA P (a) e CsA L (b) e h = altura do pico 2855 cm ⁻¹ para CsA P (a) e CsA L (b).	85
FIGURA 31: Difrátograma das amostras: CsA L (a), PLGA 75:25 L (b), ME (c) e ML (d).	87
FIGURA 32: Curvas de TG das amostras: (a) CsA L e (b) PLGA 75:25 L.	89
FIGURA 33: Curvas de DSC das amostras: (a) PLGA L, (b) CsA L, (c) ML, (d) ME e (e) MEB. (*) = transição vítrea do PLGA 75:25 L e transição de fase cristal/líquido - líquido da CsA L.	90
FIGURA 34: Espectroscopia no Infravermelho na região de 4000 a 650 cm ⁻¹ (A) e os principais picos na região de 1500 a 3500 cm ⁻¹ (B), das amostras (a) CsA Pe (b) PLGA P.	94
FIGURA 35: Espectroscopia no Infravermelho na região de 4000 a 650 cm ⁻¹ das amostras de (a) MF, (b) ML e (c) ME.	95
FIGURA 36: Perfis preliminares de liberação da CsA dos implantes ME (a) e ML (b).	98
FIGURA 37: Massa restante dos implantes ML (a) e a quantidade de CsA presente no implante (b) durante os 23 semanas de incubação.....	101

FIGURA 38: Massa restante dos implantes ME (a) e a quantidade de CsA presente no implante (b) durante os 23 semanas de incubação.....	101
FIGURA 39: Fotografia de MEV dos implantes obtidos a partir da ML em aumentos de 200 vezes (a,c) e 1000 vezes (b,d): antes da incubação (a,b); 7 dias após o início da incubação (c,d).....	104
FIGURA 40: Fotografia de MEV dos implantes obtidos a partir da ME em aumentos de 200 vezes (a, c) e 1000 vezes (b,d): antes da incubação (a,b); 7 dias após o início da incubação (c,d).....	105
Figura 41: Proposta esquemática da biodegradação e erosão da matriz polimérica, seguido da liberação da CsA: (a) implantes obtidos a partir da mistura liofilizada e (b) implantes obtidos a partir da microesfera.....	107

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 Doenças associadas à uveíte	25
QUADRO 2 Propriedades dos copolímero ácido láctico/ácido glicólico	50
QUADRO 3 Composição das solução salina balanceada	61
QUADRO 4 Condições cromatográficas adotadas.....	63
QUADRO 5 Valores de transições vítreas endotérmicas apresentadas nas curvas de DSC das amostras analisadas	92
QUADRO 6 Valores das bandas de absorção no IV dos grupos químicos segundo a literatura	96
QUADRO 7 Valores das bandas de absorção no IV observadas.....	97

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Repetibilidade do método de quantificação da CsA	75
TABELA 2 Precisão intermediária do método de quantificação da CsA	76
TABELA 3 Massa dos implantes intra-oculares obtidas	79
TABELA 4 Porcentagem da CsA presente nos implantes.....	80
TABELA 5 Bandas no FTIR características do estado cristalino e amorfo.....	83
TABELA 6 Valores percentuais encontrados das partes cristalinas e amorfas	86
TABELA 7 Valores médios da liberação acumulada de CsA obtidos nos diferentes tempos de incubação dos implantes	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - acetonitrila

Abu – Albumina

Ala – Alanina

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CsA – *Ciclosporina A*

CsA L – *Ciclosporina A* liofilizada

CsA P – *Ciclosporina A* pó

D-Ala – D- Alanina

DRX – Difração de Raios X

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

ME – Espectroscopia de massa

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier

g/mol – gramas por mol

IV – infravermelho

I.V - intravenosa

MeBmt – metilbutirato

MeGli – Metil glicina

Meleu – Metil leucina

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mL.min⁻¹ – mL por minuto

ME – microesfera contendo *Ciclosporina A*

MEB – microesfera branca

MF – mistura física

ML – mistura liofilizada

P.I – ponto isoelétrico

PGA – poli (ácido glicólico)

PLA - poli (ácido lático)

PLGA 75:25 – copolímero ácido lático/ácido glicólico

PLGA 75:25 L – copolímero ácido lático/ácido glicólico liofilizado

PLGA 75:25 P – copolímero ácido lático/ácido glicólico pó

% p/p – porcentagem peso por peso

PVA – poli álcool vinílico

SLC – sistema de liberação controlada

SLM - sistema de liberação modificada

SLP - sistema de liberação prolongada

SLS - sistema de liberação sustentada

TCLL – transição de fase cristal/líquido-líquido

Tg – transição vítrea

TG - Termogravimetria

TS – tampão salina pH 7,4

Val – Valina

°C.min - graus centígrados por minuto

RESUMO

O tratamento da uveíte posterior é limitado uma vez que as formas convencionais de administração de fármacos falham ao disponibilizar doses terapêuticas no vítreo, retina e na coróide. Os implantes intra-oculares biodegradáveis são capazes de disponibilizar o fármaco diretamente na cavidade vítrea em doses terapêuticas e por um período prolongado. O copolímero ácido láctico / ácido glicólico é um clássico exemplo entre os polímeros sintéticos biodegradáveis e bem aplicados em sistemas de liberação de fármacos devido à sua biocompatibilidade e ausência de toxicidade em testes *in vivo*. Neste estudo, dois diferentes implantes biodegradáveis a partir do copolímero ácido láctico / ácido glicólico (PLGA 75:25) e do imunossupressor *Ciclosporina A* (CsA) foram obtidos a partir de dois sistemas: mistura liofilizada e microesfera contendo CsA. O atual trabalho caracterizou, com sucesso, os sistemas por meio de quatro técnicas e esclareceu o perfil preliminar de liberação *in vitro* observado. Os resultados da validação da metodologia desenvolvida por CLAE mostrou-se adequada para quantificação de CsA e os implantes foram satisfatoriamente obtidos pelas duas técnicas propostas. A cristalinidade dos materiais foram analisadas por DRX que mostraram o estado amorfo para o copolímero e o estado semi-cristalino para a *ciclosporina A*. Além disso, a técnica mostrou que as amostras contendo polímero e o fármaco apresentam grande caráter amorfo. As curvas de TG provaram a estabilidade da amostra entre 100 e 120°C. O DSC e FTIR mostraram a ausência aparente de interações químicas e físicas entre o fármaco e o polímero. O estudo preliminar de liberação *in vitro* apresentou um perfil monofásico, onde a liberação do fármaco ocorreu principalmente pela difusão da CsA pela matriz polimérica intumescida. A diferente e maior liberação dos implantes obtidos pelas microesferas contendo CsA ocorreu provavelmente à distinta distribuição do fármaco e ao aspecto morfológico heterogêneo quando comparado ao implante obtido pela mistura liofilizada, o qual apresentou menor porcentagem de liberação e uma matriz mais homogênea, aspectos morfológicos observados por SEM. Em resumo, os sistemas de liberação de fármacos aqui desenvolvidos e caracterizados podem ser empregados, futuramente, para o tratamento da uveíte posterior.

Palavras chaves:

Sistema de liberação de fármacos; Implante biodegradável intra-ocular; *Ciclosporina A*; Polímero biodegradável.

ABSTRACT

The treatment of posterior ocular disease is limited once the conventional forms of drug administration fail to provide therapeutic levels drug to the vitreous, retina and choroids. The biodegradable polymers intraocular implants are able to release drugs directly to the vitreous and are able to maintain long-term vitreous concentration of drugs in therapeutic range. The poly (D,L-lactide-co-glycolide) is a classic example amongst the synthetic polymers and well applied as drug delivery system due to its satisfactory degradability, biocompatibility and absence of significant toxicity accessed by in vivo studies. In this study, two novel different intraocular implants based on poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA 75:25) and the Cyclosporine A (CyA) immunosuppressive have been obtained from two different systems: lyophilized mixture and CyA-loaded microspheres. We have successfully characterized the system with four different techniques and explained to some extent the preliminary long-term in vitro release profile. The HPLC validation results showed to be suitable to quantify the concentrations of CyA and the implants were successfully obtained by both proposed techniques. The TG curves proved the stability of the samples between temperatures of 100 - 120°C. The materials crystallinities were evaluated by RXD diffraction which showed an amorphous state of the polymer and CsA semi-crystalline state. Besides that, the technique has shown the great amorphous state of the samples containing the drug and the polymer. DSC and FTIR have shown the absence of some detectable physical and chemical interaction between drug and polymer. The CyA preliminary release profile consisted by monophasic profile, with the drug delivery occurs mainly due to the drug diffusion from the swelling polymeric matrices. The different and higher CyA release associated with samples of CyA-loaded microsphere implants was probably caused by the distinct drug distribution and heterogeneous morphological aspect from those lyophilized mixture implants, which have presented a slow CyA release and homogeneous surfaces. In summary, the delivery systems developed and fully characterized in the present work can be applied, in the future, for the treatment of various types of posterior uveitis manifestation.

Keywords:

Nanostructured drug delivery system; Biodegradable intraocular implants; Cyclosporine A; Biodegradable polymer.

1 INTRODUÇÃO

Uma das principais causas de cegueira que acomete a população mundial é consequência da doença ocular denominada uveíte posterior, cujo tratamento é dificultado pela presença de barreiras naturais do olho, as quais são constituídas pela córnea, conjuntiva e sistema hematorretiniano. No caso da necessidade de adotar tratamentos que exigem a penetração tecidual de fármacos, as formas farmacêuticas convencionais falham ao disponibilizá-los na cavidade vítrea.

Outro fator de dificuldade está relacionado à utilização de fármacos que causam efeitos adversos no organismo, que muitas vezes levam o paciente a abandonar a terapia prescrita. Dentre os fármacos indicados para o tratamento das uveítes, destaca-se a *Ciclosporina A* (CsA), agente imunossupressor que inibe a manifestação inflamatória desencadeada pela doença.

Uma das formas de veiculação da CsA no tratamento da doença em questão constitui da disponibilização direta do fármaco no interior do olho, por meio de implantes intra-oculares preparados com materiais biocompatíveis e biodegradáveis, possibilitam essa forma de administração, além de proporcionar a liberação gradual do fármaco e em doses efetivas.

Os polímeros biodegradáveis têm sido largamente utilizados nas áreas médica, como biomateriais, e farmacêutica, como sistemas de liberação de fármacos. Dentre eles, destacam-se derivados do ácido lático e glicólico por apresentar satisfatória biocompatibilidade e efeito tóxico *in vivo* reduzido.

O trabalho em questão objetivou desenvolver, visando o tratamento da uveíte posterior, implantes intra-oculares constituídos por uma matriz polimérica contendo o fármaco CsA. Outros objetivos desta pesquisas constituíram da avaliação da viabilidade dos métodos, além de avaliar a possível interação entre o polímero e o fármaco e o perfil de liberação *in vitro* dos sistemas obtidos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O olho

O olho é o órgão responsável pela captação da luz refletida pelos objetos à sua volta. Ele se compõe do “bulbo do olho” e das “estruturas acessórias”, as quais são responsáveis pela sua proteção e movimentação (figura 1).

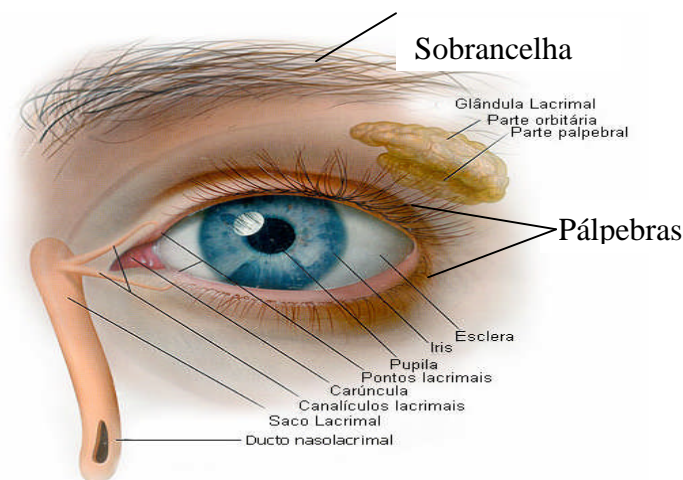


FIGURA 1: Visão externa do olho.
Fonte: Adaptação de Janot (2006).

As estruturas acessórias que protegem o olho incluem as pálpebras, o aparelho lacrimal, os cílios, as sobrancelhas e a conjuntiva. Os cílios e as sobrancelhas impedem o contato de partículas com a superfície do olho e a lágrima, produzida pelo aparelho lacrimal e distribuída na superfície pelas pálpebras, retira aquelas partículas que tiveram contato com a superfície ocular. A conjuntiva, uma vez rica em folículos linfóides, protege o olho por meio de mecanismos de defesa celulares (Dyce et al., 1997).

O bulbo do olho é mantido na órbita, uma cavidade óssea que o separa da cavidade craniana, e que apresenta como principal função protegê-lo. A movimentação do bulbo do olho é realizada pelos músculos oculares, estes também

responsáveis em mantê-lo suspenso na órbita. Quanto à anatomia, este é constituído por inúmeras estruturas, estas apontadas na Figura 2.

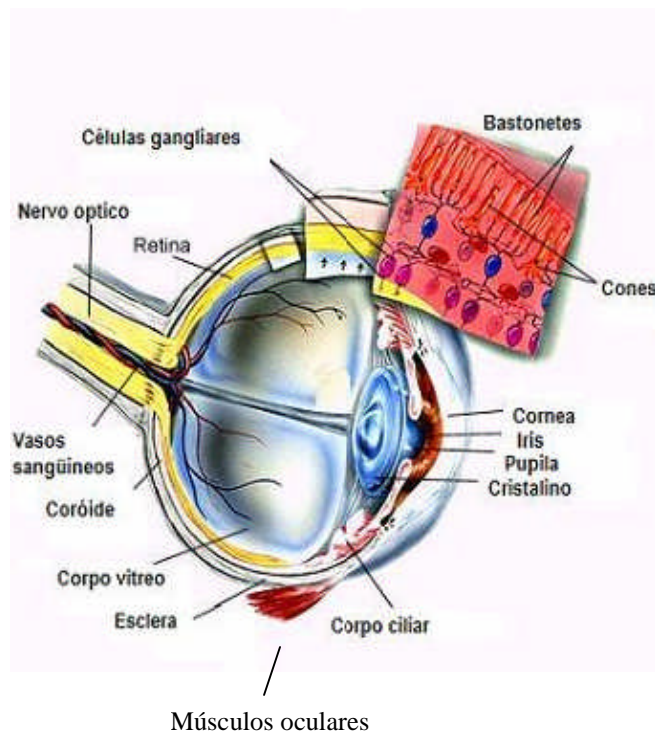


FIGURA 2: Esquema anatômico do bulbo do olho em corte horizontal.
Fonte: Adaptação de Miguel Júnior; Castro (2007).

O bulbo do olho é composto por três túnicas delgadas, denominadas de túnica fibrosa externa, túnica vascular média e túnica nervosa.

A túnica fibrosa externa é formada pela esclera e pela córnea, estruturas que conferem forma e firmeza ao olho. 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, confere a coloração branca ao olho e nesta estão inseridos os músculos oculares. Cerca de um quarto da túnica fibrosa é constituída pela córnea, um tipo especial de tecido conjuntivo denso que se encontra disposto e na forma lamelar. A sua transparência é inerente à sua estrutura tecidual e ao bombeamento contínuo de líquidos intersticiais. Não possui vasos sanguíneos e os nutrientes difundem para o tecido a partir dos vasos do limbo, pelo tecido lacrimal ou pelo humor aquoso, sendo o oxigênio absorvido diretamente da atmosfera (Dyce et al., 1997).

A túnica vascular média, também conhecida como úvea, é formada pela coróide, corpo ciliar e íris. Ela é dividida pelo cristalino nas partes anterior, preenchida pelo humor aquoso, e posterior, preenchida pelo humor corpo vítreo.

O cristalino é uma lente biconvexa coberta por uma membrana transparente. Ele está situado atrás da pupila e orienta a passagem da luz até a retina. A sua flexibilidade permite a visão de objetos próximos e distantes, dando a essa propriedade do cristalino o nome de acomodação visual.

O humor aquoso, líquido aquoso e transparente, além de apresentar propriedades de refração, desempenha um papel importante na manutenção da pressão intra-ocular e é o responsável pela nutrição da córnea. A recepção dos raios luminosos pela retina é permitida pelo corpo vítreo, o qual é constituído, principalmente, por água e fibras transparentes finas.

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 intensamente vascularizada. O espessamento da coróide forma o corpo ciliar que, junto aos músculos ciliares, possibilitam a contração e extensão da íris.

A íris é a terceira e menor parte da túnica vascular. Ela encontra-se suspensa entre a córnea e a lente, e apresenta um orifício central, a pupila, por onde a luz penetra até a parte posterior do olho. Ela divide o espaço entre a córnea nas câmaras anterior e posterior, ambas preenchidas pelo humor aquoso. A íris é a responsável pela coloração do olho que depende do número de células pigmentadas presente em seu estroma e no tipo de pigmentos das células (Dyce et al., 1997).

A túnica nervosa interna é formada pela retina, tecido que contém as células fotossensíveis ou fotorreceptores representadas pelos cones e bastonetes. Estas células transformam a energia luminosa em sinais nervosos, os quais são transmitidos para o cérebro pelo nervo óptico. Os cones são mais sensíveis à visão das cores e os bastonetes mais sensíveis à baixa intensidade de luz, este último responsável pela visão noturna ou visão de penumbra.

Além dos fotorreceptores, a retina possui duas regiões especiais: a *fovea centralis* (ou fóvea ou mancha amarela) e o ponto cego. A fóvea está no eixo óptico do olho, onde é projetada a imagem do objeto focalizado com grande nitidez. É a região da retina especializada para a visão de alta resolução. A fóvea contém apenas cones e permite que a luz atinja os fotorreceptores sem passar pelas demais

camadas da retina, maximizando a acuidade visual. No fundo do olho encontra-se o ponto cego, o qual é insensível à luz. Ele não apresenta cones nem bastonetes e dele emergem o nervo óptico e os vasos sanguíneos da retina (Dyce et al., 1997).

Considerando as estruturas anatômicas do olho, pode-se compreender como ocorre a visão. A luz atinge em primeiro lugar a córnea. Em seu caminho, ela passa através do humor aquoso, atingindo imediatamente a lente que funciona como um sistema de focalização, convergindo os raios luminosos para um ponto focal sobre a retina. Na retina, as células fotossensíveis transformam a luz em impulsos eletroquímicos, os quais são enviados ao cérebro pelo nervo óptico. No cérebro, mais precisamente no córtex visual, ocorre o processamento das imagens recebidas, completando, então, nossa sensação visual.

2.2 Fatores limitantes para a absorção ocular de fármacos

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

Segundo Järvinen e colaboradores (1995), a relativa impermeabilidade das barreiras teciduais e a rápida drenagem lacrimal são responsáveis pela eliminação precoce de medicamentos. Desta forma, uma pequena porcentagem do fármaco veiculado consegue atravessar esses tecidos e o restante atinge rapidamente a circulação sanguínea, sendo assim distribuído por todo o organismo. As vias de absorção ocular estão esquematizadas na Figura 3.

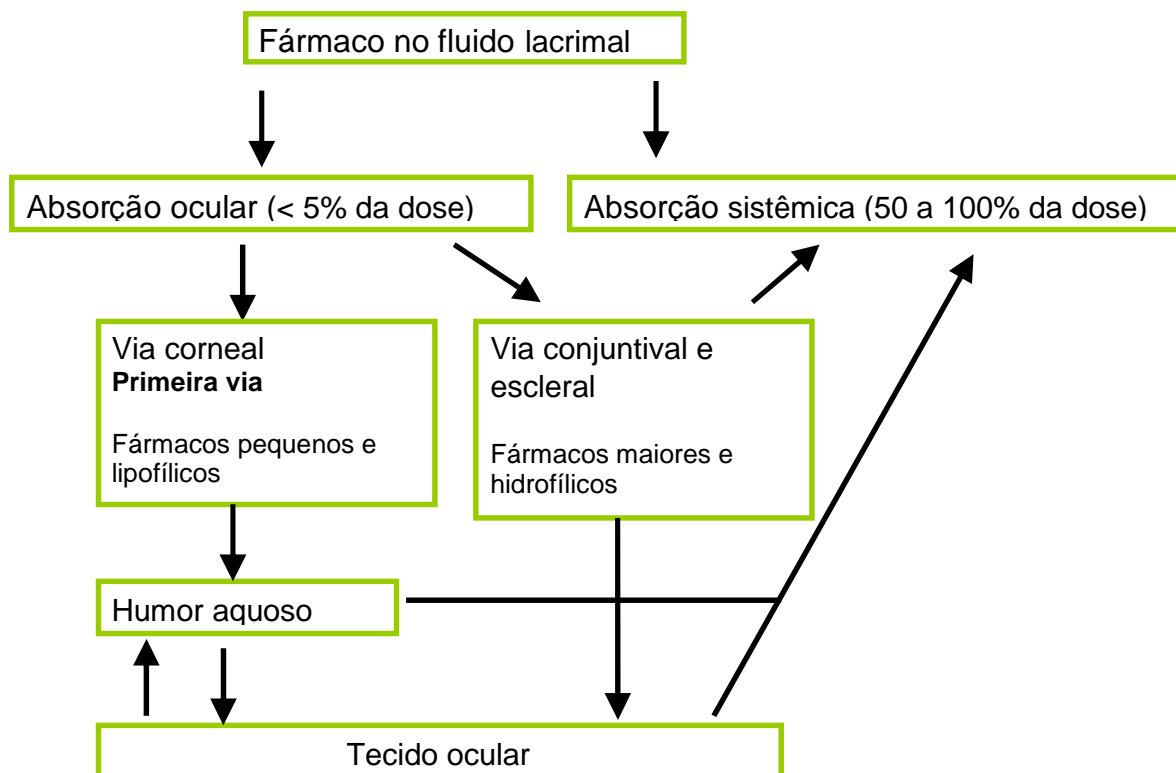


FIGURA 3: Vias de absorção ocular.
Fonte: Adaptação de Järvinen et al. (1995, p. 5).

A drenagem lacrimal é o primeiro obstáculo encontrado para penetração do fármaco. Esse mecanismo permite que apenas 5% da dose sejam absorvidos pelos tecidos oculares, sendo o restante totalmente eliminado.

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

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

Em adição à via corneal, observa-se que o tecido conjuntivo e a esclera também limitam a penetração de fármacos aplicados topicamente (Figura 3).

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

O tratamento tópico também é prejudicado pelos mecanismos oculares de distribuição e eliminação. A distribuição do fármaco está relacionada à via em que este é absorvido: pela via corneal este passa pelo humor aquoso e é distribuído para o corpo ciliar, coróide e retina; pela via conjuntival e escleral, este é distribuído para o trato uveal e corpo vítreo. Por exemplo, pode ocorrer a falha no tratamento se um determinado fármaco que deve ser disponibilizado no corpo vítreo for absorvido pela via corneal.

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

A administração sistêmica também é pouco eficaz uma vez que a existência da barreira hematorretiniana dificulta a passagem de substâncias presentes na circulação sanguínea para a retina (Peyman; Ganiban, 1995). Além disso, a eficiente circulação sanguínea presente nos tecidos oculares posteriores promove a redução da meia-vida dos fármacos no local, diminuindo suas concentrações a níveis inferiores ao terapêutico.

Já a injeção intra-vítrea constitui uma alternativa à aplicação tópica e sistêmica. Trata-se da administração direta do fármaco ou do medicamento na parte interior do bulbo do olho (Pras et al., 2004). A sua grande desvantagem está

relacionada à necessidade de injeções repetidas para manter o nível terapêutico do fármaco (Yasukawa et al., 2001; Jaffe et al., 1998; Baeyens et al., 2006), o que pode ocasionar endoftalmites, deslocamento da retina, catarata e perfuração do olho (Peyman; Ganiban, 1995).

2.3. Uveíte: uma doença ocular

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

Esta vem sendo mundialmente abordada como uma doença de grande impacto sócio-econômico, uma vez que acometem indivíduos de todas as faixas etárias e classes sociais (Jaffe et al., 2006). Na clínica médica, considera-se que são responsáveis por 3 a 15% de todas as causas de cegueira mundial (Hesssenlink et al., 2004). Entre os indivíduos que apresentam a uveíte, pelo menos 35% dos casos sofrem sérias seqüelas da doença, que vão desde o comprometimento da visão até a cegueira plena (Jabs et al., 2000).

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

A uveíte é dividida em uveíte anterior, uveíte intermediária, uveíte posterior e uveíte difusa, classificação anatômica esquematizada na Figura 4.

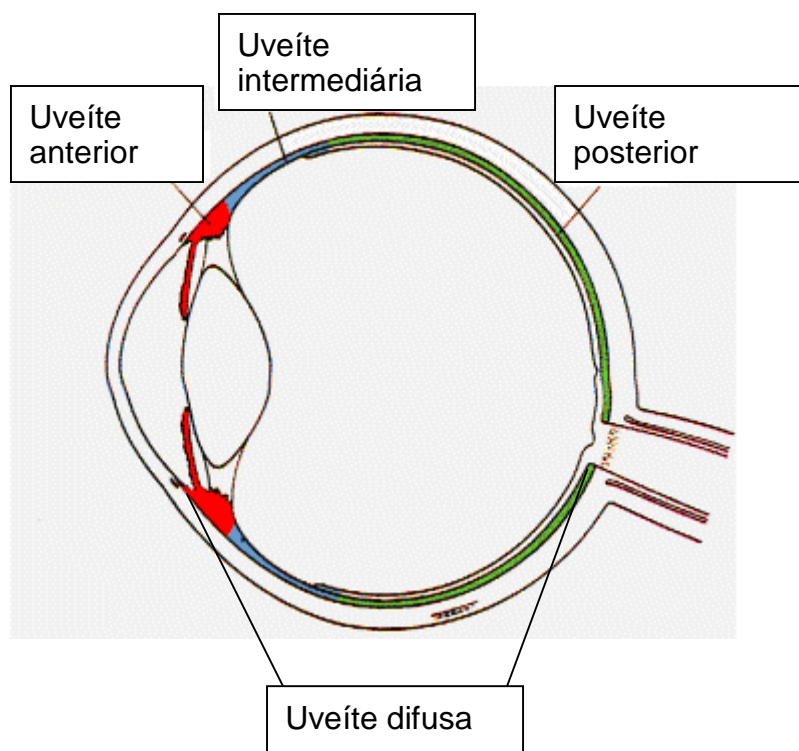


FIGURA 4: Classificação anatômica da uveíte.
 Fonte: Adaptação de Perret Opticiens (2005)

A uveíte anterior, também denominada irite ou iriociclite, atinge os tecidos anteriores do bulbo do olho e compromete a íris e o corpo ciliar. A sua forma de manifestação aguda é caracterizada pela congestão do olho seguida de um halo vermelho de sensação dolorosa, fotofobia, diminuição da visão e lacrimejamento (Kanski, 1994). A congestão está relacionada ao depósito de células na córnea. Na inflamação mais grave, surgem precipitados ceratolíticos, agregados celulares no dorso da córnea. Quando crônica, a inflamação é denominada irite granulomatosa e está associada algumas vezes às doenças sistêmicas (Bennet; Cecil, 1997).

A uveíte intermediária compromete a região posterior do corpo ciliar e a retina periférica e é caracterizada pela infiltração de células originadas do corpo vítreo, quando inflamado. A uveíte posterior atinge a retina, coróide e corpo vítreo, também chamada de retinites, coroidites e vasculites (Kanski, 1994; Bennet; Cecil, 1997). Geralmente apresentam exsudação na porção do corpo vítreo, podendo, pela turvação do humor corpo vítreo, ocasionar a baixa acuidade visual (Souza, 1997).

No caso da uveíte posterior, a inflamação presente desencadeia a formação de novos vasos sanguíneos e a migração de células. Desta forma, o meio ocular

transparente se torna opaco, prejudicando a passagem da luz e a acuidade visual do indivíduo (Boyd et al., 2001; Kanski, 1994). Alguns indivíduos também podem apresentar a uveíte de forma difusa, também denominada panuveíte, uma vez que esta compromete o bulbo do olho como um todo (Fialho, 2003a).

Quanto às causas, a uveíte pode ser desencadeada por agentes virais, parasitários, bacterianos e por mecanismos intrínsecos ao organismo, sendo alguns deles exemplificados no Quadro 1:

QUADRO 1
Doenças associadas à uveíte.

	Infeciosas	Outras
Anterior (iridociclite)	Herpes zoster	Espondilite anquilosante
	Herpes simplex	
	Doença de Hansen	Artrite reumatóide Síndrome de Reiter
Posterior (corioretinite)	Toxoplasmose	
	Toxocariose	
	Histoplasmose	
	Sarampo	
	Sífilis	Sarcoide
	Coccidioidomicose	Síndrome de Behçet
	Oncocercose	Síndrome de Vogt-Koyanagi – Harada
	Brucelose	Doença inflamatória intestinal

Fonte: Bennet; Cecil (1997, p. 2404).

Considerando a alta vascularização do trato uveal e sua função de fornecer aos tecidos oculares nutrientes e células de defesa, torna-se explicável a possibilidade da existência de manifestações inflamatórias no local. Baseando-se no princípio de que a inflamação é desencadeada pela ativação de células linfocitárias por partículas estranhas, tanto endógenas (distúrbios auto-imunes) como exógenas (vírus ou bactérias), acredita-se que as uveítes são originadas pelo mesmo processo. Segundo Pras e colaboradores (2004), o principal responsável pela ativação da resposta inflamatória são os linfócitos auxiliares (linfócitos T), células

ativadoras de todo o sistema imune celular, junto com a apresentação de antígenos via complexo de compatibilidade principal (CMP) (Boyd et al., 2001).

Partículas estranhas ao organismo são apresentadas aos linfócitos T pelas células apresentadoras de antígeno na forma de fragmentos peptídicos via complexo de histocompatibilidade de classe I (MHC I) para agentes endógenos e classe II (MHC II), como descrito na Figura 5.

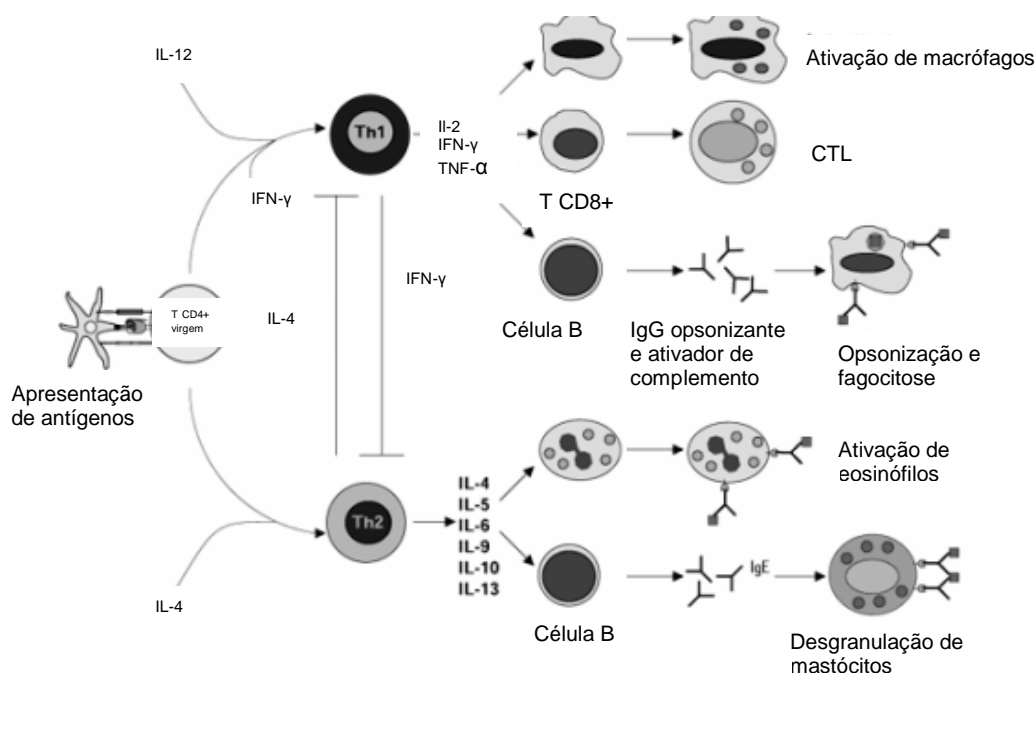


FIGURA 5: Esquema das funções efetoras e dos linfócitos auxiliares diferenciados
Fonte: Adaptação de Abbas et al. (1996, p.276).

O complexo formado entre MHC e TCR (ligante das células T) desencadeia sinais que irão produzir e liberar citocinas que, em conjunto, irão ativar toda a resposta imune protetora do organismo, tanto celular quanto pela atuação de anticorpos específicos (resposta humoral, via ativação de linfócito B). A apresentação de antígenos APCs por meio da expressão de MCH I ativa um tipo de linfócito T, chamado de citotóxico (Linfócito T CD8+; CTL) levando à apoptose celular, exposição das partículas estranhas fagocitadas e continuidade do ciclo. A expressão de MHC II os linfócitos T chamados de auxiliares (Linfócito T CD4+) que

podem se diferenciar em Th1 e Th2 e liberar diversas citocinas ativadoras na resposta inflamatória. Os linfócitos Th2 liberam as citocinas IL-2, fator de necrose tumoral (TNF) e interferon gama (IFN γ) que ativam os macrófagos. Os linfócitos Th1 ativam as células B e os eosinófilos pela liberação das interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-11 (Figura 5). As citocinas inflamatórias TNF, IFN γ , IL-6 e IL-8 são aquelas encontradas no humor aquoso de pacientes que apresentavam a uveíte (Sakaguchi et al., 1998; Bertelmann; Pleyer, 2004; Dick et al., 2004).

2.3.1. Medicamentos para o tratamento da uveíte

O tratamento da uveíte está relacionado à utilização de medicamentos capazes de prevenir ou tratar complicações visuais, aliviar o desconforto dos pacientes e controlar a manifestação inflamatória (Kanski, 1994). Entre as diversas classes de fármacos, encontram-se descritos na literatura a utilização de midriáticos, antiinflamatórios corticóides, agentes citotóxicos, antivirais e imunossupressores (Kanski, 1994; Fialho, 2003a). Estes fármacos podem ser administrados pelas vias oral (tratamento sistêmico), tópica e por meio de injeções perioculares (Kanski, 1994; Jabs et al., 2000). A escolha do fármaco ocorre devido à frequência e à via de administração, da natureza, da gravidade e da localização da doença (Fialho, 2003a).

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

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

A substituição terapêutica baseia-se na administração de fármacos imunossupressores, capazes de inibir a resposta imune inflamatória (Hesselink et al.,

2004). Entre os imunossupressores encontram-se os fármacos citotóxicos como o metrotexato, 6-mercaptopurina, azatioprina, ciclofosfamida, clorambucil e os fármacos que inibem as células T, como *Ciclosporina A* e tacrolimus (Jabs et al., 2000).

A *Ciclosporina A* (CsA), em substituição à terapia baseada em corticóides, torna-se uma alternativa para o tratamento da uveíte posterior (UP). Segundo Jabs e colaboradores (2000), é utilizada na concentração diária de 2 a 10 mg de fármaco por quilo (mg/kg/dia) e outros trabalhos também mostram sua eficácia no tratamento de UP em adultos e crianças (Walton et al.,1998; Lallemand et al.,2003; Hesselink et al.,2004).

2.4. A Ciclosporina A

A *Ciclosporina A* (CsA) é um polipeptídeo isolado do fungo *Tolypocladium inflatum gams*, identificado, inicialmente, em 1976, por Borel e colaboradores (apud Rezzani et al., 2004, p. 88), como uma nova molécula antibiótica com propriedades antifúngicas, antiparasitárias e antiinflamatórias. O primeiro trabalho sobre a utilização da CsA na clínica médica foi publicado, em 1978, por Calne e White (apud Graeb et al., 2004, p.125) que constataram a potente propriedade imunossupressiva ao observar diminuição de rejeições em pacientes com rins transplantados, sucesso terapêutico que despertou, durante os últimos vinte anos, o interesse de diversos pesquisadores pela CsA (Abendroth., 2004).

Desde então, a CsA apresenta grande impacto na medicina de transplantes, também sendo utilizada para o tratamento de doenças de origem infecciosas - ceratoconjutivite por adenovírus, herpes, ceratite, imunológicas - ceratoconjutivite atópica, conjutivite, úlcera corneal reumatóide, doença do olho seco, lúpus eritematoso, psoríase, artrite reumática, entre outras, e manifestações pós-operatórias - ceratoplastia (Jabs et al.,2000; Rezzani et al.,2004; Bertelmann et al.,2004; Hesselink et al.,2004).

A primeira formulação registrada contendo a CsA (Sandimmune®, Novartis, Suíça) foi desenvolvida na forma de emulsão concentrada. Posteriormente foi

lançada a microemulsão (Neoral®, Novartis, Suíça), formulação que apresentou melhor biodisponibilidade e eficácia, quando comparado com a primeira (Jabs et al., 2000; Andrysek et al., 2003; Pollard et al., 2003). Encontra-se também no mercado, o fármaco disponibilizado em cápsulas gelatinosas (Sandimmune®), Sandimmune Neoral® suspensão (Italia et al., 2007) e soluções oleosas de administração parenteral (Sandimmune® IV), conforme AHFS Drug information (2000) e Jabs e colaboradores (2000).

A disponibilização do fármaco no sítio ativo é dependente de suas propriedades farmacocinéticas e de distribuição. Segundo Rezzani e colaboradores (2004), o fármaco é absorvido no intestino, posteriormente se liga às lipoproteínas presentes no sangue, é metabolizado pelo fígado e finalmente eliminado pelas fezes. Abendroth (2004) constatou que apenas 30% do fármaco presente na formulação Neoral® administrado oralmente é biodisponibilizado e que, em poucos minutos, 60% a 70% do fármaco absorvido são distribuídos nas células sanguíneas. Destes, 34% se ligam a proteínas transportadoras e são eliminados em um tempo de meia vida de, aproximadamente, dezenove horas. A metabolização observada foi explicada como sendo dependente da regulação, expressão e interação do fármaco pelas enzimas do citocromo P 450 e diretamente dependente da idade do paciente.

No momento em que o fármaco é disponibilizado na circulação sanguínea e distribuído em todos os compartimentos do organismo, observa-se que ele agirá indiretamente em outros mecanismos celulares, desencadeando efeitos colaterais. Nos rins promove mudanças estruturais e funcionais das células do túbulo proximal e arteríola aferente, aumenta níveis de tromboxano A₂ e causa a vasoconstrição renal (Abendroth et al., 2004). Os efeitos refletem na hipertensão, como disfunção cardiovascular e nefrotoxicidade (aumento do nível sérico de creatinina, retenção de fluido, edema, hiperclóremia, acidose metabólica e hipercalcemia). Observam-se, também, efeitos no sistema nervoso central (tremor, confusão, rubor, efeitos dermatológicos como hirsutismo e hiperplasia gengival), hepatotoxicidade (hiperbilirrubinemia), efeitos no sistema trato gastrointestinal (TGI) (diarréia, náuseas, vômitos, anorexia, desconforto abdominal, gastrite, úlcera péptica ou hemorragia retal), complicações infecciosas (pneumonia, septicemia, abscessos), infecções sistêmicas por vírus e fungos, efeitos hematológicos (leucopenia, anemia e trombocitopenia) e possíveis reações anafiláticas (AHFS Drug Information, 2000, p. 3378- 3381).

A ação desejada ocorrerá quando a molécula for capaz de regular as respostas imunes por meio da diminuição da liberação da IL-2 liberada pelos linfócitos T - células T (AHFS Drug Information, 2000; Jabs et al., 2000; Gilger et al., 2000; Rezzani et al., 2004). A Figura 6 descreve, esquematicamente, o mecanismo de ativação das células T e o mecanismo de ação da CsA.

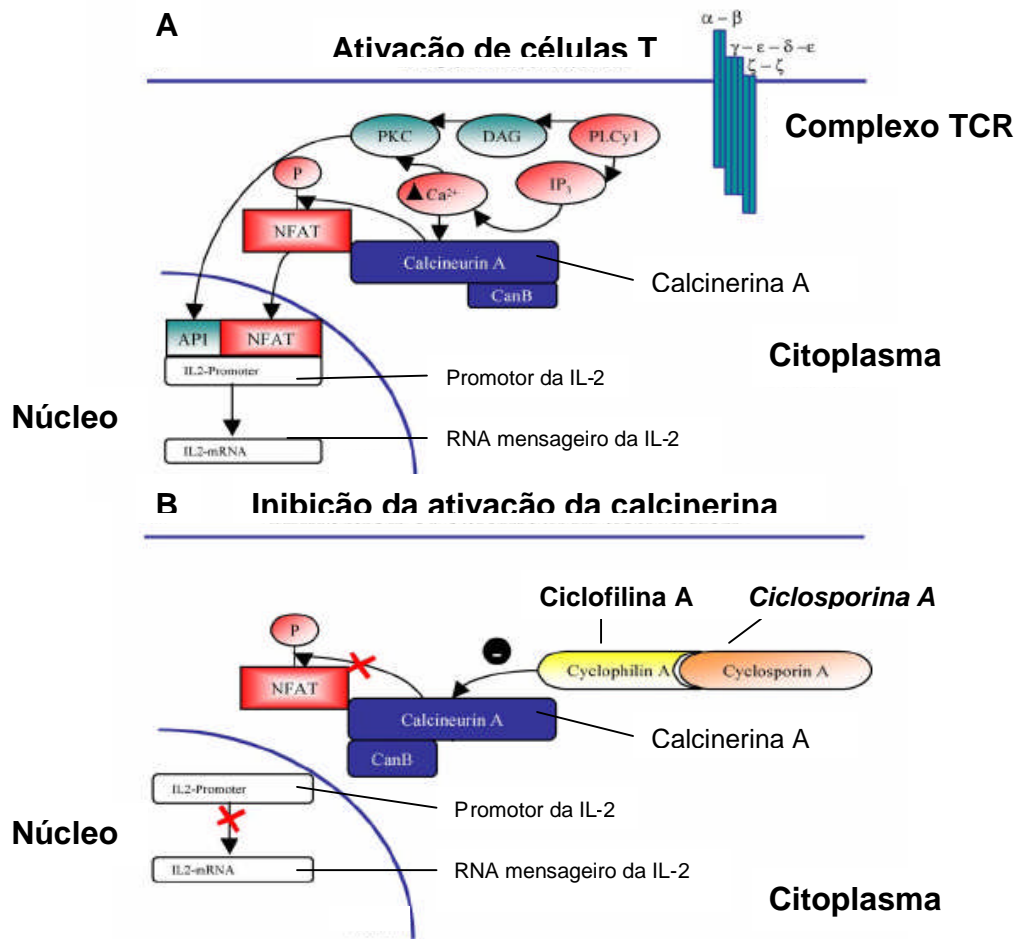


FIGURA 6: Representação: (a) da ativação de linfócitos T e (b) do mecanismo de ação da CsA. Fonte: Adaptação de Rezzani et al. (2004, p.90)

Quando o organismo é exposto a um agente patológico, o sistema imune é ativado a fim de eliminá-lo. As células apresentadoras de antígenos fagocitam os patógenos e os metabolizam de forma a expor, por intermédio do receptor celular chamado complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II) o antígeno em fragmentos peptídicos. Segundo Rezzani e colaboradores (2004), o mecanismo

natural de ativação de células T acontece quando o complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II) de células apresentadoras se liga, especificamente, no receptor de células T (TCR). A ligação MHC II-TCR originará sinais intracelulares que ativarão a enzima tirosina quinase por meio da desfosforilação. Essa enzima promoverá a quebra da fosfolipase C (PLC γ 1) em diacilglicerol (DAG) e 1,4,5 trifosfato de inositol (IP $_3$). O PLC γ 1, na presença de cálcio intracelular, ativa a fosfoquinase C (PKC), que é responsável pela ativação da chamada AP1, região promotora de genes responsável da IL-2. Já o IP $_3$ estimula a liberação de cálcio armazenado no retículo endoplasmático. O cálcio intracelular se liga à calmodulina formando o complexo cálcio-calmodulina, como sendo um segundo mensageiro. Este, ao se ligar a *calcinerina A* formará um complexo capaz de desfosforilar e ativar o fator de transcrição de células T (NFAT), a outra região promotora de genes de IL-2 e conseqüentemente a produção da proteína IL-2. Depois de formada, a citosina é então exteriorizada (Figura 6a).

A inibição da produção de IL-2 é realizada pela CsA (Figura 6b). No citoplasma ela se liga a uma proteína intracelular nomeada ciclofilina (Cl; ciclofilina A). O complexo fármaco-imunofilina (ciclosporina-Cl) se liga à calcinerina bloqueando o sistema a fosforilação mediada pelo sistema calcinerina-calmodulina. Assim, não há ativação de NFAT, não ocorrendo a ativação de células T e, conseqüentemente, a liberação de Interleucina 2 (Bertelmann; Pleyer, 2004; AHFS Drug Information, 2000; Rezzani et al., 2004).

Posteriormente à descrição da farmacodinâmica, da farmacocinética e do mecanismo de ação da CsA, direciona-se a discussão à utilização do fármaco no tratamento da uveíte posterior.

A administração das formulações descritas acima destinada para o tratamento da doença apresenta várias desvantagens quando se analisa a sua capacidade de disponibilizar a CsA nas porções posteriores do bulbo do olho na dose efetiva e sem ocasionar efeitos colaterais. O fármaco, devido a sua baixa solubilidade em água (40 μ g de fármaco por mL de água), baixo coeficiente de partição óleo/água e elevada massa molecular (AHFS Drug Information 2000; Bertelmann; Pleyer., 2004), não atravessa, de forma satisfatória, as barreiras teciduais e a barreira hematorretiniana do bulbo do olho, apresentando baixa penetrabilidade. Além disso, a administração sistêmica da CsA desencadeia uma série de efeitos indesejáveis ao

organismo, fatores que, muitas vezes, são os responsáveis pelo abandono da farmacoterapia e falha no tratamento (Fialho et al., 2003b).

Visto os inconvenientes da administração da CsA por vias convencionais para o tratamento da uveíte posterior, é de interesse científico a busca de novos sistemas de liberação que possibilitem a sua disponibilização de forma efetiva e segura. Esses novos sistemas podem ser definidos como sistemas de liberação modificada (SLM), segundo definido por Kaur e colaboradores (2004), podendo-se destacar os implantes intra-oculares.

2.5. Sistemas de liberação modificada

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

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

Os SLM possuem a vantagem de atingir a dose terapêutica desejada em menores doses, diminuir os efeitos sistêmicos indesejáveis e prolongar o tempo de ação do fármaco (Athanasίου et al., 1996; Kaur et al., 2004). Os SLM na forma de formulações coloidais, tais como as vesículas lipossomais, micelas, nanopartículas e micropartículas poliméricas, têm sido utilizados como alternativas para melhorar a disponibilidade de fármacos por via tópica ocular (Ding, 1998; Kaur et al., 2004; Peyman; Ganiban, 1995), ou até mesmo por meio de injeções subconjuntivais objetivando tratamento de doenças oculares do segmento posterior (Ding, 1998; Peyman; Ganiban, 1995).

A literatura relata diversos trabalhos que propõem alternativas para administração oral da CsA, objetivando melhorar o comportamento farmacocinético, a biodisponibilidade, a solubilidade e o perfil de liberação do fármaco.

Al-Meshal e colaboradores (1998) observaram uma melhora na biodisponibilidade do fármaco em vesículas lipossomais composta por dipalmitoilfosfaditilcolina (DPPC) e colesterol (Chol), quando comparado com a formulação comercial Sandimmune®.

Jaiswal e colaboradores (2004) mostraram que nanopartículas poliméricas de polímeros biodegradáveis de (PLGA) e polietilenoglicol (PEG) são capazes de promover uma liberação controlada do fármaco, quando em presença do fluido natural intestinal.

Aliabadi e colaboradores (2005b) também mostraram vantagens dos SLM ao investigarem a possibilidade da utilização de micelas compostas pelo copolímero metoxipoli (óxido de etileno)- b- poli (ϵ -caprolactona) (POE-b-PCL) em diferentes proporções de PCL como veículo para melhorar a solubilidade e liberação da CsA. Comparando-se com a fórmula comercial contendo o Cremophor EL, o autor observou que a micela polimérica, além de apresentar um perfil de liberação sustentada, foi capaz de promover maior solubilidade do fármaco.

Dando continuidade ao trabalho, Aliabadi e colaboradores (2005a) verificaram o potencial das mesmas micelas solúveis contendo (POE-b-PCL) de modificar a farmacocinética e distribuição da CsA nos tecidos, em comparação com a fórmula para aplicação intravenosa (Sadimmune). Em ratos, o sistema micelar proporcionou uma melhor biodisponibilidade do medicamento, já que o aumento da solubilidade proporcionou a alteração da sua biodistribuição nos rins e fígado, diminuindo sua metabolização hepática e seus efeitos tóxicos nos referidos órgãos.

A encapsulação da CsA em microesferas poliméricas e a avaliação do seu perfil de liberação, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, foram realizadas por Li e colaboradores (2005), comparando com suspensões de CsA, observaram um perfil de liberação controlada em ambos os estudos.

Italia e colaboradores (2007) observaram, em teste *in vitro*, boa biodisponibilidade de nanopartículas poliméricas do copolímero PLGA contendo CsA quando comparados com os resultados obtidos do medicamento comercial Neoral® e de suspensões de CsA.

Observa-se, também, a aplicação tópica da CsA para o tratamento de doenças dérmicas auto-imunes, como por exemplo a psoríase, e a necessidade de promover maior permeação do fármaco. Liu e colaboradores (2006) investigaram a capacidade de vesículas lipídicas melhorarem a permeabilidade do fármaco na superfície da pele. Já Boinpally e colaboradores (2004), referem-se à aplicação da iontoforese como uma técnica capaz aumentar a penetrabilidade da molécula.

Para a utilização oftálmica, o desenvolvimento de SLM descritos na literatura objetiva aumentar a penetrabilidade da CsA, aumentar sua estabilidade e minimizar seus efeitos tóxicos.

Kanai e colaboradores (1989) testaram combinações diferentes de α -ciclodextrina (α -CD) e CsA e observaram que o colírio contendo o complexo de CsA- α -CD resultou em uma menor toxicidade corneal e uma penetração na córnea 5 a 10 vezes maior que o fármaco no veículo lipofílico.

Pleyer e colaboradores (1994) investigaram a habilidade de lipossomas transportarem CsA para os tecidos oculares. A formulação foi aplicada topicamente em gotas oleosas (controle) e em uma forma encapsulada em lipossoma. O estudo mostrou claramente a superioridade dos lipossomas sobre o veículo oleoso.

Alonso e colaboradores (1995) mostraram que nanocápsulas e nanoesferas de poli- ϵ -caprolactona, e nanoemulsões promoveram absorção corneal de fármacos lipofílicos (*Ciclosporina* e indometacina). Eles mostraram que a absorção corneal da ciclosporina foi cinco vezes superior com nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona quando comparada à solução oleosa da droga.

Com o intuito de melhorar a tolerância e estabilidade da CsA nos tecidos corneais, Lallemand e colaboradores (2005) realizaram a síntese de um pró-fármaco, originado da molécula de CsA, apresentando-se mais estáveis no fluido lacrimal e menos irritantes para superfície ocular, quando comparado com formas de veiculação oleosas.

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

2.6 Os implantes poliméricos biodegradáveis da aplicação intra-ocular

Alguns polímeros são classificados como biomateriais, termo que vem sendo utilizado para descrever aqueles materiais derivados de fontes biológicas ou aqueles usados em terapias no corpo humano. Estes são largamente utilizados na medicina como material cirúrgico, próteses odontológicas, próteses ortopédicas, ou mesmo como forma de veiculação de fármacos em sistemas de liberação (Griffth, 2000).

Entre as aplicações dos polímeros na medicina, encontra-se sua extensa utilização no campo de engenharia de tecidos onde são empregados como auxiliares na regeneração de tecidos e órgãos. Griffth (2000) descreve-os como sendo possíveis adjuvantes capazes de estimular mecanismos naturais celulares relacionados com o crescimento, metabolismo, diferenciação e migração celular. A síntese dos polímeros pode ser realizada de forma que este contenha, em sua constituição, transmissores extracelulares como fatores de crescimento ou componentes da matriz extracelular como proteínas, poliglicanos e polissacarídeos, fibronectina, integrinas, entre outros.

Como a aplicação na engenharia de tecidos, o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (SLF) torna-se um campo inovador quando se trata de utilização de polímeros que permitem a liberação sustentada (dias, semanas, meses ou anos) e direcionada (a um tumor, um tecido local ou até mesmo a um local específico da circulação sanguínea). O interesse surgiu na década de 80 objetivando o direcionamento da terapia protéica como forma de substituição dos métodos que empregavam injeções protéicas locais. Griffth (2000) comentam a aplicabilidade futura destes sistemas para diversas terapias, colocação também reforçada por Pillai e Panchagnula (2001), ao considerarem os polímeros como materiais promissores para o desenvolvimento de diversos SLF.

Encontra-se também descrita, a utilização de polímeros no campo da oftalmologia, seja como substituintes de tecidos naturais ou em SLF.

Historicamente, Michelson e colaboradores (1979), citados por Peyman e Ganiban (1995, p. 114), desenvolveram o primeiro sistema de liberação sustentada para via ocular contendo o fármaco gentamicina, como sendo uma minibomba osmótica para implantação subconjuntival para o tratamento de endoftalmites. Este

sistema foi implantado em ratos por meio de incisão do bulbo do olho e a liberação de 0,01 mg de fármaco por mL de corpo vítreo em um período de quatro dias e meio foi determinada. Posteriormente, outros implantes foram sendo desenvolvidos objetivando o tratamento de retinite causada por citomegalovírus (CMV), endoftalmite, vitreoretinopatia proliferativa, reinites virais e uveítes, apresentando resultados satisfatórios quanto ao perfil de liberação controlada de fármacos (Peyman; Ganiban, 1995; Colhurst et al., 2000).

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

Os sistemas compostos por polímeros não-biodegradáveis precisam ser removidos posteriormente por processos cirúrgicos enquanto os biodegradáveis são totalmente absorvidos pelo organismo, não necessitando a remoção, e proporcionando, desta forma, uma maior adesão e aceitação do paciente ao tratamento (Yasukawa et al., 2001).

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

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

Copolímero ácido lático / ácido glicólico foram utilizados para o desenvolvimento de alguns implantes intra-oculares. Kunou e colaboradores (1995) avaliaram o perfil de liberação de implantes a partir dos polímeros poli (DL- lático) (PLA) e poli (DL-lático-co-glicólico) (PLGA) contendo diferentes concentrações de ganciclovir (GCV). Os autores observaram que o implante de PLA contendo 10% p/p de GCV apresentou um período de liberação, *in vitro*, de 6 meses. O implante de PLGA contendo 25% p/p de GCV, testado por meio da administração em coelhos, apresentou um período de permanência no corpo vítreo de três meses e na retina e

coróide de cinco meses. A concentração do fármaco encontrada na retina e coróide foi superior à encontrada no corpo vítreo.

Jaffe e colaboradores (1998) mostraram a eficácia da CsA no tratamento de uveíte induzida em ratos quando administrada por meio de um sistema de liberação intra-ocular. Os autores observaram que o implante presente na cavidade vítrea era capaz de inibir a manifestação da uveíte e a liberação do fármaco foi detectada por um período superior a nove anos.

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

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

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

A vantagem da utilização de implantes poliméricos biodegradáveis frente às demais formas de tratamento da uveíte posterior foi observada, por exemplo, por Jaffe e colaboradores (2000) ao verificar uma melhora no quadro da doença em pacientes portadores ao administrar implante intra-ocular de fluocinolona. Dong e colaboradores (2006) mostraram a possibilidade de tratamento da uveíte posterior em coelhos a partir de implantes intra-oculares constituídos do polímero sintético ácido láctico-co-glicólico-co-policaprolactona contendo CsA. Outro trabalho com objetivo semelhante foi realizado por Gilger e colaboradores (2000), no qual a aplicação intra-vítrea de implantes de acetato de vinilileno contendo CsA mostrou-se eficaz para o tratamento da doença.

Jaffe e colaboradores (2006) avaliaram a eficácia e segurança do implante intra-ocular de acetato de fluocinolona (Retisert) para o tratamento de uveítes posteriores não infecciosas. Os efeitos indesejáveis como catarata e aumento da pressão intra-ocular observados apresentaram-se inferiores quando comparado com a administração sistêmica de formulação contendo o fármaco.

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

2.7 Avaliação físico-química dos constituintes de sistemas de liberação de fármacos (SLF)

A seleção adequada dos componentes de um sistema de liberação de fármacos torna-se uma tarefa desafiadora, já que as características de seus constituintes são os principais determinantes da forma de disponibilização do fármaco.

O perfil de liberação de um determinado fármaco está relacionado com modificações do sistema como um todo, quando este se encontra em contato com um determinado meio externo, seja este o meio fisiológico ou um meio laboratorial que simule as condições fisiológicas. Essas modificações são determinadas pelas

características físico-químicas do material polimérico empregado e do fármaco presente no sistema. Cabe então ressaltar a importância da avaliação físico-química de seus constituintes neste trabalho, uma vez que essas propriedades irão definir o perfil de liberação do fármaco CsA a partir do implante polimérico desenvolvido.

2.7.1 Características físico-químicas da CsA

As ciclosporinas, em geral, são definidas por Loor e colaboradores (2002) como decapeptídeos cíclicos constituídos por 4 grupos amidas não metilados nos resíduos 2, 5, 7 e 8 e as demais amidas metiladas nos resíduos 1, 3, 4, 6, 9, 10 e 11, sendo consideradas as clássicas ciclosporinas. Com o intuito de justificar a relação estrutura-atividade das diversas ciclosporinas como ativadores da expressão imunomodulatória, o autor descreve sucintamente as características químicas e estruturais da CsA que serve como a molécula de referência para comparação da atividade das demais ciclosporinas.

A *Ciclosporina A* é então descrita como um polipeptídeo hidrofóbico constituído por 11 peptídeos arranjados em uma cadeia rígida composta por ligações peptídicas. É definida como ciclo-[MeBmt¹-Abu²-MeGli³-MeLeu⁴-Val⁵-MeLeu⁶-Ala⁷-D-Ala⁸-MeLeu⁹-MeLeu¹⁰-MeVal¹¹] (Figura 7).

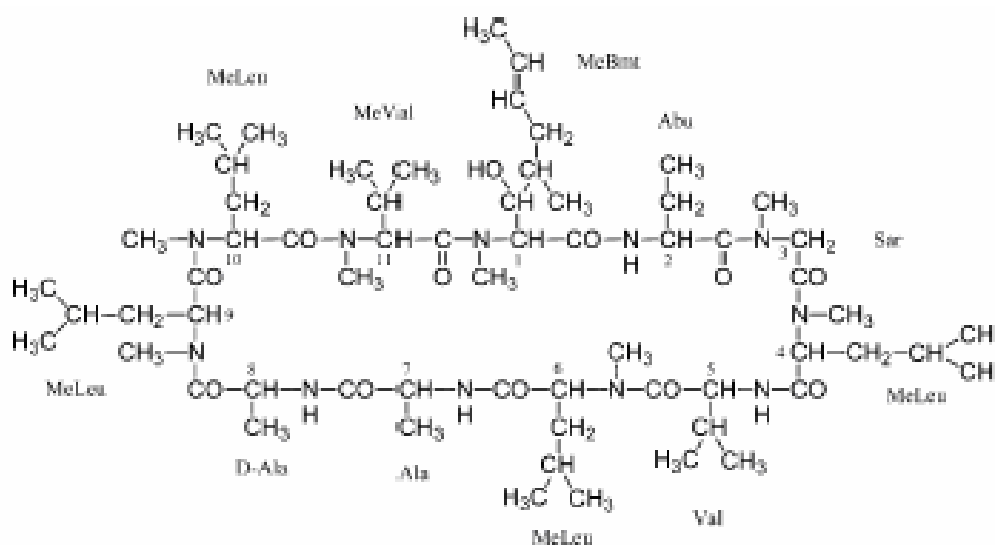


FIGURA 7: Estrutura da CsA
Fonte: Jegorov et al. (2003, p.441).

A estrutura é também elucidada por Loor e colaboradores (2002) objetivando o conhecimento conformacional da molécula e distribuição dos grupos químicos.

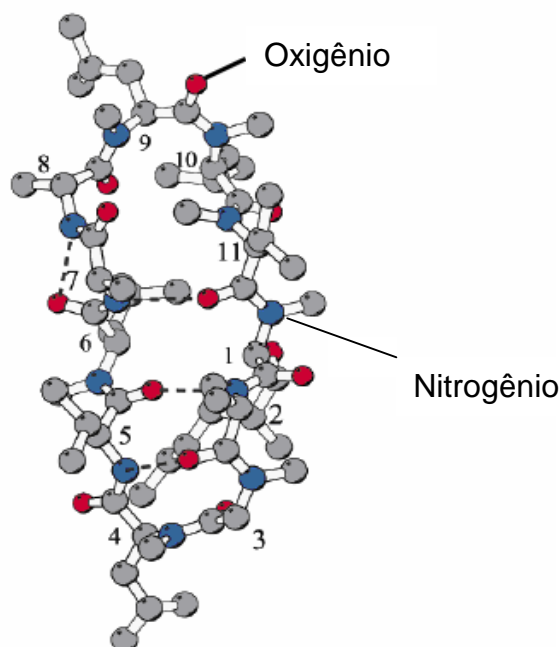


FIGURA 8: Estrutura tridimensional da CsA determinada por Difração de Raios X
Fonte: Adaptação de Loor et al. (2002, p.4605).

Em conseqüência da rigidez da configuração estrutural (Figura 8), as cadeias de aminoácidos são direcionadas em ângulos para a direita em relação ao plano formando dois sítios hidrofóbicos, um contendo os peptídeos Abu², Val⁵, MeVal¹¹, projetados em um lado da cadeia, e os peptídeos MeBmt¹, MeLeu⁴, MeLeu⁶ e MeLeu¹⁰ para o lado oposto. As ligações intermoleculares beta-folhas envolvem tripeptídeos antiparalelos [Meval¹¹-MeBmt¹-Abu²] e [Val⁵-MeLeu⁶-Ala⁷]. MeGly³ e MeLeu⁴ participam em um tipo de torção beta e torções nas cadeias na forma de loop são formadas pelo pentapeptídeo [Ala⁷-D-Ala⁸-MeLeu⁹-MeLeu¹⁰-MeLeu¹¹]. Contêm ligações cis de amidas entre os resíduos de aminoácidos adjacentes MeLeu⁹ e MeLeu¹⁰. A estrutura é mantida por quatro ligações de hidrogênio envolvendo os 4 grupos amida não metilado (amidas secundárias) dos resíduos 2, 5, 7 e 8. As ligações de hidrogênios definem a estrutura secundária sendo uma do tipo torção gama entre [N²-O⁵] e [N⁷-O¹¹], duas beta-folhas entre [N²-O⁵] e [N⁷-O¹¹] e uma não usual definida por torção gama entre [N⁸-O⁶] dos aminoácidos D-Ala⁸ e MeLeu⁶ em volta da Ala⁷ (Loor et al., 2002).

A existência de diversas estruturas tridimensionais define o esqueleto da molécula, sua estabilidade conformacional e conseqüentemente sua atividade como imunossupressora. Estudos extensivos da estrutura-atividade da CsA tem mostrado que a cadeia MeBmt em sua devida conformação é essencial, porem não suficiente, para a atividade biológica (Lazarova et al, 2003). A dependência de outros sítios hidrófobicos também é demonstrada no trabalho de Loor e colaboradores (2002) ao definir a importância conformacional dos sítios hidrofóbicos na capacidade de ligarem aos segundos mensageiros calcinerina e glicoproteína P.

Vale ressaltar que a estrutura não só determina estabilidade e atividade, mas também define o aspecto morfológico do fármaco e seu aspecto cristalino. Este comportamento é explicado por Stevenson e colaboradores (2003) ao avaliar picos de FTIR característicos de estruturas secundárias e associar suas variações aos diferentes estados do material e a existência de polimorfismo da CsA, característica atribuída pelo autor, ao processo de obtenção e do meio de diluição.

2.7.2 Características gerais dos polímeros

Polímeros, em geral, são macro-estruturas compostas por unidades de repetição, chamadas meros, ligadas por ligações covalentes e intramoleculares, formando uma cadeia polimérica. As cadeias lineares podem apresentar ramificações ou braços, copolímeros ou ligações cruzadas ou em rede, como mostrado na Figura 9 (Hasirci et al., 2001; Canevarolo et al, 2002).

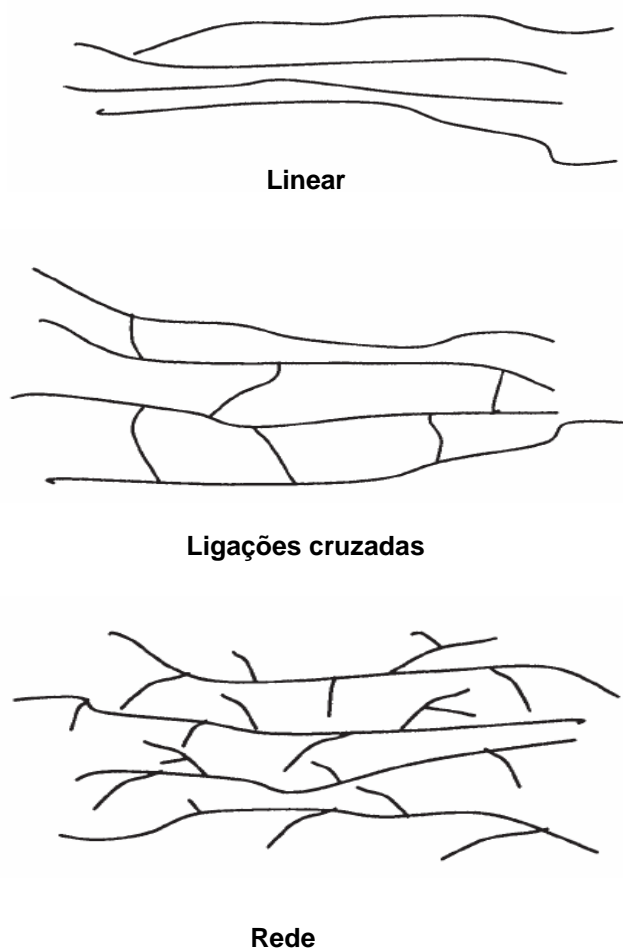


FIGURA 9: Organização de cadeias poliméricas.
Fonte: Adaptação de Standard(2004, p. 116).

A estrutura e o tipo de ligação das cadeias é um dos fatores que define o comportamento térmico e mecânico dos polímeros, que variam sob exposição a diferentes tensões e temperaturas.

Polímeros que amolecem quando submetidos ao aquecimento são chamados de termoplásticos, matérias ricas por ligações fracas intermoleculares do tipo Van der Waals. Aqueles que não amolecem, são denominados termorígidos, materiais difíceis de serem processados por possuírem ligações cruzadas entre cadeias. No estado sólido possuem vários graus de cristalinidade podendo ser cristalino, definido por ordenadas e repetitivas cadeias; semicristalino ou amorfo. Este último estado ocorre devido à pequena mobilidade das macromoléculas na estrutura, acarretando dificuldades de adaptação no espaço. A temperatura que possibilita uma movimentação das moléculas de forma que a estrutura se encontre mais organizada

e com menor energia é chamada de transição vítrea (T_g). Esse valor é uma forma de determinar possíveis alterações na estrutura do polímero após utilizá-lo em outros sistemas, ou submetê-lo às variações de temperatura e pressão (Oréfice et al., 2006).

Outra característica importante inerente aos polímeros está relacionada com a capacidade de serem alterados estruturalmente e morfologicamente frente à ação do meio em que se encontram. Göpferich (1996) enquadra os polímeros em duas classes: os biodegradáveis e os não biodegradáveis. Os biodegradáveis são aqueles que sofrem degradações imediatamente ou após o período de aplicação. A sua aplicabilidade na medicina vem sendo estudada desde a década de 60, utilizados como fios de sutura e como materiais fixadores de fraturas em lugar dos pinos de metais (Athanasίου et al., 1996).

Já os não biodegradáveis são definidos como sendo aqueles que requerem um tempo maior para serem degradados, este, bem além do estimado para sua aplicação. Isso significa que, polímeros biodegradáveis são totalmente clivados de forma a serem eliminados do organismo, característica que não se aplica aos polímeros não biodegradáveis.

Athanasίου e colaboradores (1996) ainda afirmam que os polímeros biodegradáveis são desintegrados frente a um meio externo tamponado e dependem dos processos de degradação e erosão. A degradação é definida como um processo que leva ao rompimento de cadeias oriundas da sua clivagem, formando oligômeros e, posteriormente, monômeros. A erosão já é conceituada como sendo a saída da porção clivada para o meio externo, levando a desestruturação da matriz. Fica claro pelo autor que estes fatores são interdependentes e responsáveis pela desintegração do material polimérico no meio biológico, onde a erosão acontece após o processo de degradação (Göpferich, 1996).

Segundo Fialho (2003a), a velocidade de degradação e conseqüentemente o perfil de erosão dos polímeros biodegradáveis são dependentes de diversas características tais como: a estrutura química e composição do sistema, a distribuição da massa molecular dos polímeros, a presença de monômeros e oligômeros, tamanho e forma da superfície do sistema, morfologia dos componentes do sistema (amorfo, semicristalino, cristalino), local de implantação do sistema, mecanismo de hidrólise e a temperatura de transição vítrea de cada polímero.

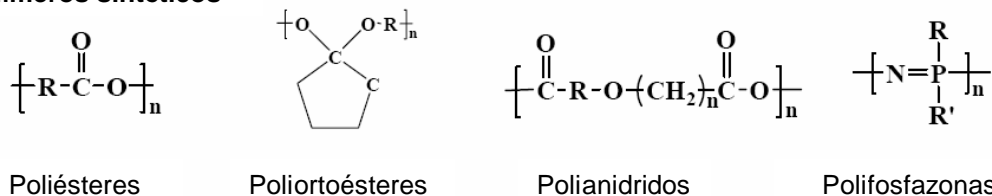
A hidrólise é o principal fator que leva a clivagem e degradação das cadeias poliméricas. Ela ocorre de forma dependente à variação de pH, temperatura, composição química, presença de solventes e enzimas catalíticas (Hasirci et al., 2001).

As variações de pH também podem tornar o polímero mais susceptível à hidrólise, como acontece com os poliésteres que apresentam maior susceptibilidade em meios ácidos e alcalinos. A proporção de oligômeros e monômeros pode alterar a cristalinidade e a temperatura de transição vítrea do material, facilitando sua clivagem.

Grupos químicos também influenciam na hidrólise do polímero. A clivagem ocorre quando se tem presentes os grupos ésteres, ortoésteres, anidrido, carbonatos, uréia e uretano (Pillai; Panchagnula, 2001), podendo sofrer clivagem a partir da porção final ou por meio de rompimentos internos na cadeia (Hasirci et al., 2001).

A Figura 10 ilustra a estrutura química de alguns polímeros biodegradáveis.

Polímeros sintéticos



Polímeros naturais

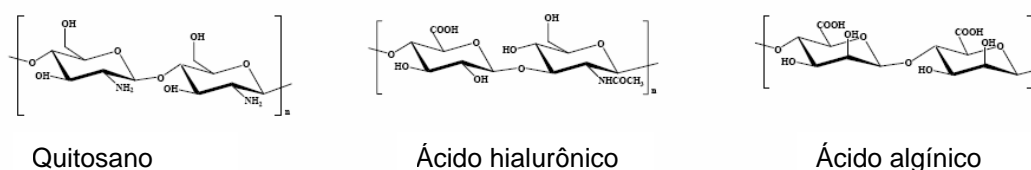


FIGURA 10: Estrutura química de alguns polímeros biodegradáveis
Fonte: Adaptação de Park et al. (2005, p. 147).

A degradação química das cadeias poliméricas é determinada pela energia requerida para ocorrer a quebra das ligações e pela localização dos grupos a serem hidrolisados. Polímeros com ligações covalentes fortes entre ligação C-C requerem

um maior tempo para sofrerem a total degradação e os grupos C-O-C e C-N-C são degradados com maior velocidade (Hasirci et al., 2001).

Merkli e colaboradores (1998) propuseram mecanismos de erosão que estão diretamente relacionados com o processo de hidrólise. As três formas de erosão das cadeias poliméricas propostas estão esquematizadas na Figura 11.

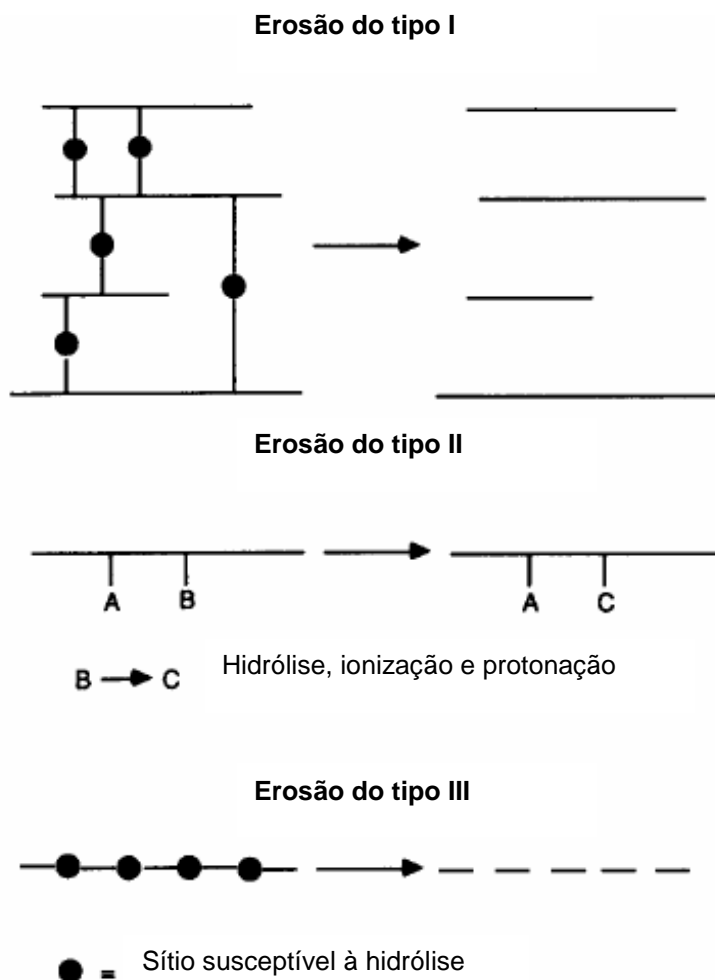


FIGURA 11: Esquema dos tipos de erosão polimérica
Fonte: Adaptação de Merkli et al. (1998, p.564).

A erosão do tipo 1 acontece, primeiramente, pela hidrólise das partes hidrofílicas e posteriormente da parte insolúvel em água hidroliticamente instável originada da formação de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. Ocorrem em polímeros hidrossolúveis como, gelatinas, colágenos, poliacrilamidas, álcool

polivinílico e poli (N-vinilpirrolidona). Já a erosão do tipo 2 acontece em polímeros cuja solubilidade em água é dependente da faixa de pH. Como exemplo, Merkli e colaboradores (1998) citam a utilização de ésteres de copolímero poli (vinil éter) e anidrido maléico (PVM/MA). A erosão ocorre pela ionização do ácido carboxílico que libera íons hidrogênios no meio. A acidificação é, na verdade, a forma de controle da erosão deste material. Quanto mais ácido, menor sua erosão. Como o meio externo é formado por um sistema tamponado, ele é capaz de regularizar o pH que permite a contínua erosão do material.

O tipo de erosão 3 trata-se da clivagem das cadeias poliméricas e formação de moléculas pequenas, solúveis em água e não tóxicos. Como exemplo, pode-se citar os poliésteres derivados do ácido láctico e glicólico, comumente utilizados na preparação de SLF (Merkli et al., 1998).

A radiação e a temperatura são outros fatores que levam a degradação. Os raios gama (raios γ) podem alterar a cadeia polimérica, a viscosidade, a velocidade de degradação e o tempo de liberação. A temperatura pode levar a desestruturação e rompimento das cadeias poliméricas (Athanasίου et al., 1996).

A erosão depende de fatores como intumescimento, dissolução e difusão de oligômeros e monômeros (Göpferich et al., 1996). O mesmo autor enquadra os polímeros biodegradáveis em diferentes tipos de mecanismos de erosão, onde alguns podem sofrer-na de forma superficial e ou matricial (Figura 12).

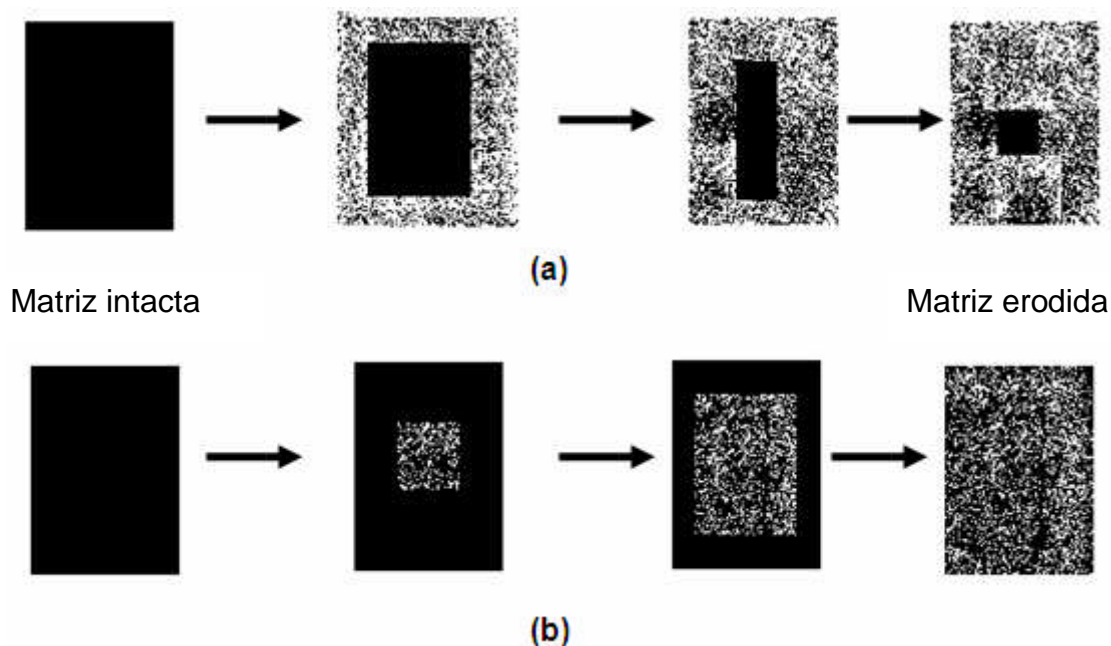


FIGURA 12: Ilustração esquemática: (a) erosão superficial e (b) erosão matricial

Os mecanismos de desintegração propostos na Figura 12 descrevem as etapas que envolvem o processo de erosão polimérica. Em ambos, a água presente no meio externo penetra na matriz polimérica levando ao intumescimento do polímero. O contato da água com os grupos hidrolisáveis do polímero leva à clivagem química e formação de oligômeros e monômeros, caracterizando o processo de degradação. O processo de erosão acontece quando se observa a formação de poros e alteração microestrutural da matriz polimérica devido à saída das porções hidrolisadas (oligômeros e monômeros) originadas pela degradação progressiva.

Os polímeros podem sofrer erosão de forma superficial (Figura 12a) ou de forma matricial (Figura 12b). Os polímeros que sofrem erosão superficial perdem materiais apenas na superfície, tornando-se menores e com o mesmo formato original. Já nos polímeros que sofrem erosão de forma matricial, o tamanho do polímero permanece constante em um período de tempo prolongado, sem apresentar perda de massa. A vantagem da erosão de superfície está na possibilidade de prever o comportamento de desintegração, previsão que não pode ser feita para os polímeros que sofrem erosão matricial.

Embora a degradação seja o principal processo das etapas de desintegração, outros parâmetros também podem interferir no processo de erosão. Mudanças na morfologia dos polímeros ocorrem imediatamente após o contato com o meio externo levando à formação de poros na superfície ou na matriz polimérica. Esses poros facilitam a entrada de água, desencadeando reações de hidrólise e consequentemente erosão das porções ainda intactas. Além disso, a ocorrência do rompimento de cadeias poliméricas origina produtos de degradação sob a forma de oligômeros e monômeros, os quais apresentam grupos químicos capazes de alterar o pH do meio e potencializar as reações de hidrólise (Göpferich et al., 1996).

Da mesma forma, a cristalinidade interfere no perfil de erosão do polímero. Devido à rápida erosão das porções amorfas frente às cristalinas, a proporção de porções cristalinas no polímero aumenta ao longo do processo de erosão, reduzindo a taxa de liberação (Göpferich, 1996; Hasirci et al., 2001).

O tamanho da cadeia e a massa molecular dos polímeros também interferem no perfil de erosão e de liberação de substâncias incorporadas, como mostrado por Kunou e colaboradores (2000) ao avaliar a variação no perfil de liberação do fármaco ganciclovir a partir de sistemas a base do polímero poli (D,L-ácido lático) (PLA) com diferentes massas moleculares.

Frente às informações descritas, entende-se que a desintegração de uma matriz polimérica é o resultado da associação de diversos fatores e depende diretamente das propriedades inerentes ao material e do meio externo em que este se encontra. Os polímeros biodegradáveis, quando constituintes da matriz de SLF, irão apresentar distintos perfis de liberação, comportamento definido pelo tipo de material, método de processamento e características do próprio fármaco. No trabalho desenvolvido, os mecanismos propostos de desintegração servirão como base para o entendimento dos perfis de liberação da CsA a partir dos implantes biodegradáveis intra-oculares obtidos.

2.7.3. O copolímero ácido lático / ácido glicólico (PLGA)

O copolímero ácido lático / ácido glicólico são poliésteres cuja principal característica é a ligação éster presente entre os meros (Figura 13). Segundo Merkli

e colaboradores (1998), estes copolímeros apresentam cadeias lineares, saturadas e comportamento termoplástico. Eles possuem um centro assimétrico, apresentando pelo ácido láctico (PLA) em uma mistura racêmica (D,L-PLA) ou por uma das suas formas levógira (L-PLA) e dextrógira (D-PLA), ligados de forma alternada ao polímero ácido glicólico (PGA). Segundo o mesmo autor, o copolímero encontra-se no estado amorfo, quando é constituído apenas da forma racêmica D,L-PLA.

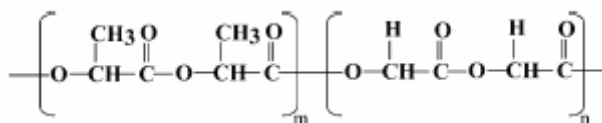
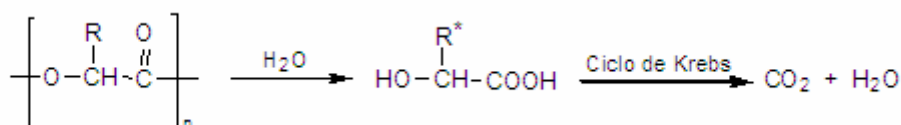
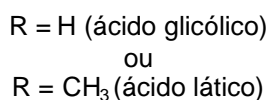


FIGURA 13: Estrutura química do copolímero ácido láctico / ácido glicólico
Fonte: Loo et al. (2004, p.260).

A biodegradação desses polímeros ocorre por erosão superficial, por meio da clivagem da cadeia polimérica por hidrólise, liberando o ácido láctico e glicólico (Figura 14). Esses ácidos, por serem metabólitos naturais do organismo são eliminados pelo ciclo de Krebs na forma de gás carbônico e água.



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

FIGURA 14: Mecanismo de hidrólise do PLA, PGA ou PLGA.
Fonte: Merkli et al. (1998, p. 569).

A hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade dos polímeros são determinadas pela proporção de ácidos lácticos e glicólicos na sua constituição. O ácido láctico possui

maior hidrofobicidade devido à presença do grupo metila na sua estrutura e o PGA é bastante susceptível a hidrólises. Assim, quanto maior a proporção de ácido láctico, maior será a hidrofobicidade do copolímero e menor será o tempo de degradação (Fialho et al., 2003b).

Quanto aos grupos químicos encontrados na molécula, tem-se a presença de carbonila de ésteres, porção molecular que apresenta absorção no infravermelho na região de 1725-1750 cm^{-1} (Coates et al., 2000).

O comportamento *in vitro* e *in vivo* dos diferentes copolímeros são influenciados pelas proporções de ácido láctico e glicólico no material, dados listados no Quadro 2.

QUADRO 2

Propriedades de copolímero ácido láctico / ácido glicólico

Polímero ou copolímero	Temperatura de transição vítrea ($^{\circ}\text{C}$)	Temperatura de Fusão ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de degradação aproximado (meses) *
PLGA 50:50	45-50	Amorfo	2
PLGA 75:25	60	Amorfo	2-4
PLGA 85:15	45	Amorfo	5
D,L-PLA	57-59	Amorfo	12-16
L-PLA	60-67	172-174	18-24
PGA	36	230	2-4

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

Fonte: Lewis et al. (1990)

O polímero PLGA na proporção 75:25 (PLGA 75:25), constituído por 75% PGA e 25% de D,L PLA apresenta transição vítrea na temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$ (Quadro 2), estado amorfo e degradação em um período de dois meses. Diferentes valores nas transições vítreas e degradabilidade podem ser observados, uma vez que dependem da forma de processamento dos materiais e do tamanho da cadeia polimérica. Por exemplo, um estudo desenvolvido por Fialho (2003a) mostrou a transição vítrea para o PLGA 75:25 em aproximadamente 50 $^{\circ}\text{C}$ e o tempo de degradação deste copolímero acima de dois meses. Este material foi o polímero

escolhido para o desenvolvimento do trabalho aqui descrito, uma vez que suas características validam sua aplicação em SLF.

2.8 Técnicas de caracterização empregadas

Neste trabalho, técnicas de caracterização foram empregadas com o intuito de descrever a estabilidade, os aspectos de composição, conformação e da estrutura existentes na interface entre o polímero e o fármaco. A investigação da estabilidade térmica dos constituintes nos permite avaliar a estabilidade dos constituintes durante o preparo dos implantes intra-oculares. Adicionalmente, a análise de possíveis interações entre os constituintes e de seus estados morfológicos possibilita justificar o perfil preliminar de liberação e degradação dos implantes durante os testes de liberação *in vitro*.

Dentre as diversas técnicas descritas na literatura para caracterização de compostos, foram selecionadas aquelas que caracterizariam o sistema desenvolvido como um todo, desde o comportamento térmico (Termogravimétrica e Calorimetria Exploratória Diferencial), os aspectos morfológicos (Microscopia Eletrônica de Varredura), conformacionais (Difração de Raios X) e composicionais (Espectroscopia no infravermelho).

Uma descrição resumida do fundamento de cada técnica de caracterização empregada neste trabalho será apresentada a seguir.

2.8.1 Termogravimetria

A termogravimetria (TG) é uma técnica largamente empregada na caracterização de sistemas contendo polímeros, uma vez que fornece informações sobre a estabilidade dos materiais e esclarece comportamentos térmicos distintos. O princípio instrumental da técnica consiste na mudança da massa de uma substância em função da temperatura aplicada (Figura 15).

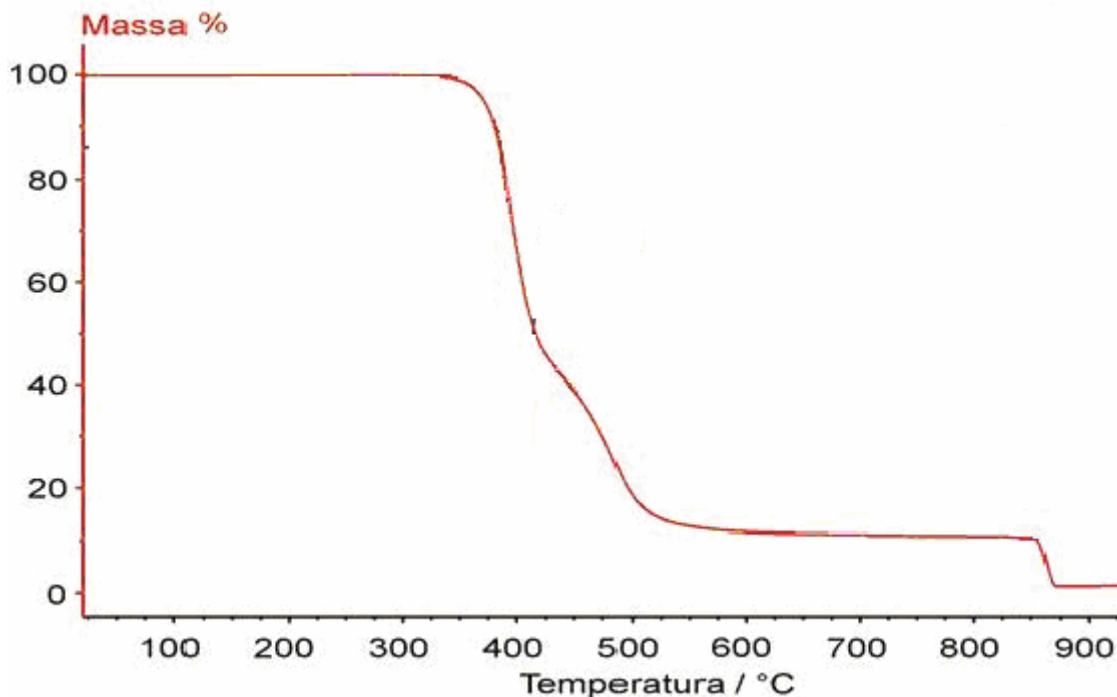


FIGURA 15: Exemplo de curva termogravimétrica.
Fonte: Adaptação de Rodrigues; Marchetto (2007).

Entre as diversas aplicações desta técnica, destaca-se a possibilidade de se verificar até qual temperatura é possível trabalhar com o material sem que este degrade (Lucas et al., 2001).

2.8.2. Calorimetria Exploratória Diferencial

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é usada extensivamente em laboratórios tanto para a caracterização quanto para o monitoramento e controle de qualidade de produtos (Fialho et al., 2003a). É uma técnica empregada há várias décadas e que fornece informações relativas às transformações térmicas de um determinado material.

Nesta técnica, a amostra a ser investigada e um material de referência são colocados em dois cadinhos dispostos sobre uma base de um metal altamente condutor, geralmente platina, e sob temperatura controlada, são aquecidos concomitantemente (Figura 16).



FIGURA 16: Ilustração dos termopares utilizados na técnica. A: amostra e R: referência.
 Fonte: Fonte: Adaptação de Rodrigues; Marchetto (2007).

A curva de DSC, obtida pela troca de calor que ocorre entre a amostra e a referência, expressa picos referentes a eventos físico-químicos do material, tais como a fusão, a cristalização, a transição vítrea, e a transição de fases, estes esquematizados na Figura 17.

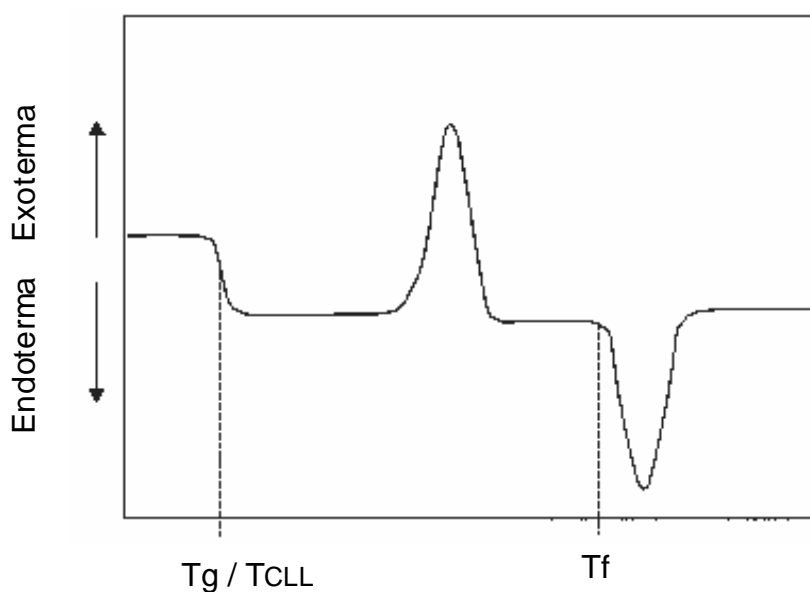


FIGURA 17: Esquema das transições térmicas. Tg: temperatura de transição vítrea, Tc: temperatura de recristalização e Tf: temperatura de fusão.
 Fonte: Adaptação de Standard ... (2004, p.119).

O sistema, ao ser aquecido e resfriado sob taxa controlada, é exposto a uma variação de energia na forma de calor. O primeiro aquecimento e resfriamento são

realizados para apagar a história térmica do material. A energia é absorvida pela amostra para organizar espacialmente as suas cadeias em um estado mais desorganizado e mais energético, como o estado amorfo. A amostra, ao ser resfriada, perde energia para o meio e assume uma conformação mais organizada de menor energia, que é a cristalina ou a semi-cristalina.

No segundo aquecimento e resfriamento, as transições do material são determinadas. A energia calorífica fornecida será, a princípio, utilizada para alterar o estado cristallino do material sinalizando na curva a mudança da linha de fase da transição vítrea (T_g) para polímeros e da transição de fases para o fármaco. Com o contínuo aquecimento, a porção amorfa termodinamicamente instável irá tornar-se novamente cristalina (estado termodinamicamente estável). Esse comportamento dará a origem a um pico exotérmico de recristalização (Figura 17). A uma determinada temperatura, característica de cada material ocorrerá a mudança do estado físico e sinais endotérmicos de fusão do material serão observados (T_f).

2.8.3. Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho (IV) é uma técnica empregada para a identificação de grupos funcionais de moléculas que são expostos a uma radiação no infravermelho, na faixa de 10.000 a 100 cm^{-1} (Coates et al., 2000).

A radiação infravermelha, quando absorvida por uma molécula orgânica, promove a rotação e vibrações moleculares, originando um espectro de onda com as posições específicas de cada banda, que podem ser representadas por cm^{-1} ou ν . As vibrações moleculares de alguns grupos químicos podem causar oscilações axiais e angulares, a primeira caracterizada pelo estiramento ao longo do eixo da ligação química que faz com que a distância interatômica aumente ou diminua e a segunda correspondente ao movimento de um grupo de átomos em relação ao resto da molécula, sem alterar as posições relativas dos átomos do grupo (Figura 18), segundo Silverstein e Webster (2000).

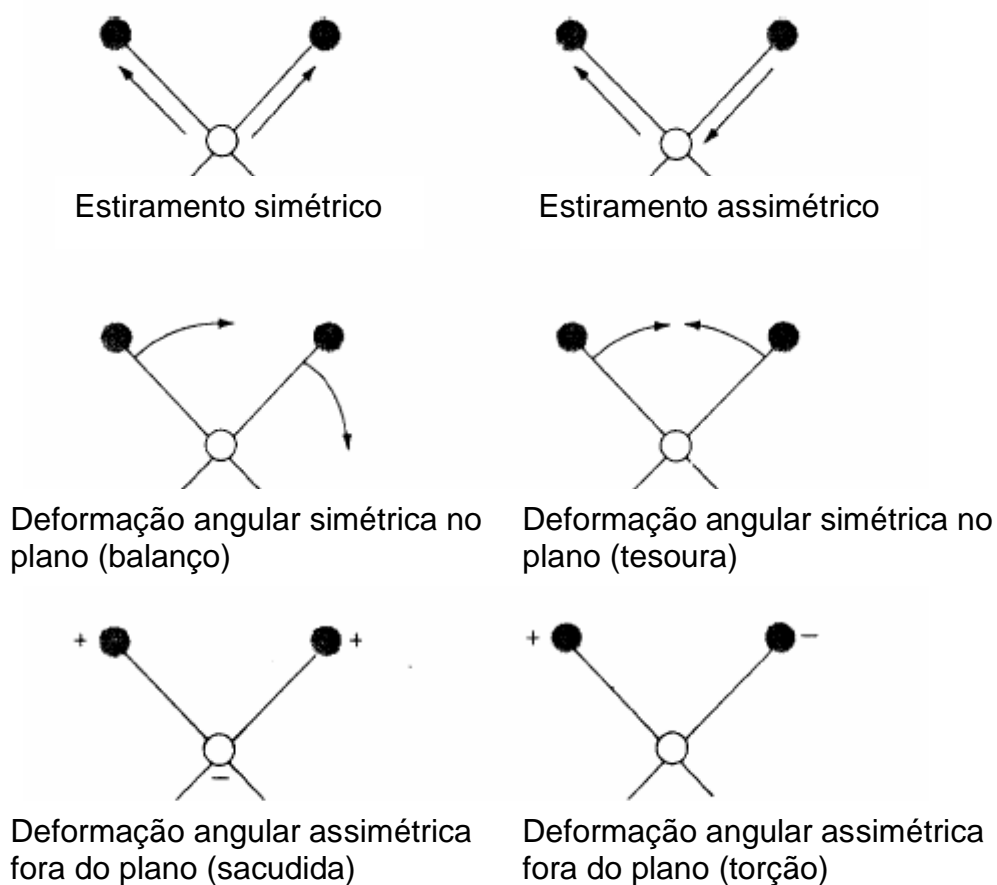


FIGURA 18: Tipos de vibrações moleculares (Nota: + indica um movimento se aproximando do leitor; - indica um movimento se afastando do leitor).

Fonte: Adaptação de Mansur (2001).

A interpretação dos espectros obtidos está relacionada com a identificação das bandas características de cada grupo químico. Algumas regiões de absorção de diversas ligações químicas estão ilustradas na Figura 19.

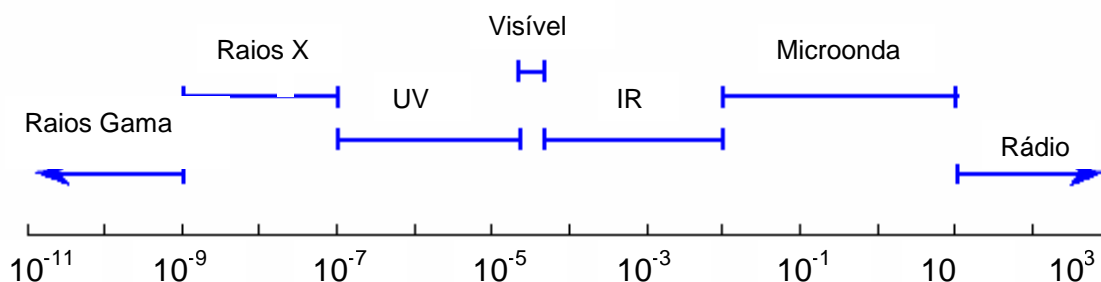


FIGURA 19: Espectro eletromagnético indicando a região do infravermelho.

Fonte: Adaptação de Mansur (2001).

2.8.4 Microscopia eletrônica de varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica de obtenção de uma imagem ampliada e tridimensional de sistemas microparticulados por meio da interação de um feixe de elétrons que colide com a amostra (Mansur, 2001)

O princípio da técnica consiste na emissão de um feixe de elétrons que incide sobre a amostra. A interação entre o feixe de elétrons e amostra origina diversos sinais sob a forma de elétrons (secundários, retroespalhados, transmitidos, entre outros) ou sob a forma de fóton (fotoluminescentes e Raios X), os quais são captados por detectores e, conseqüentemente, ampliados e analisados. A imagem é assim construída (Figura 20).

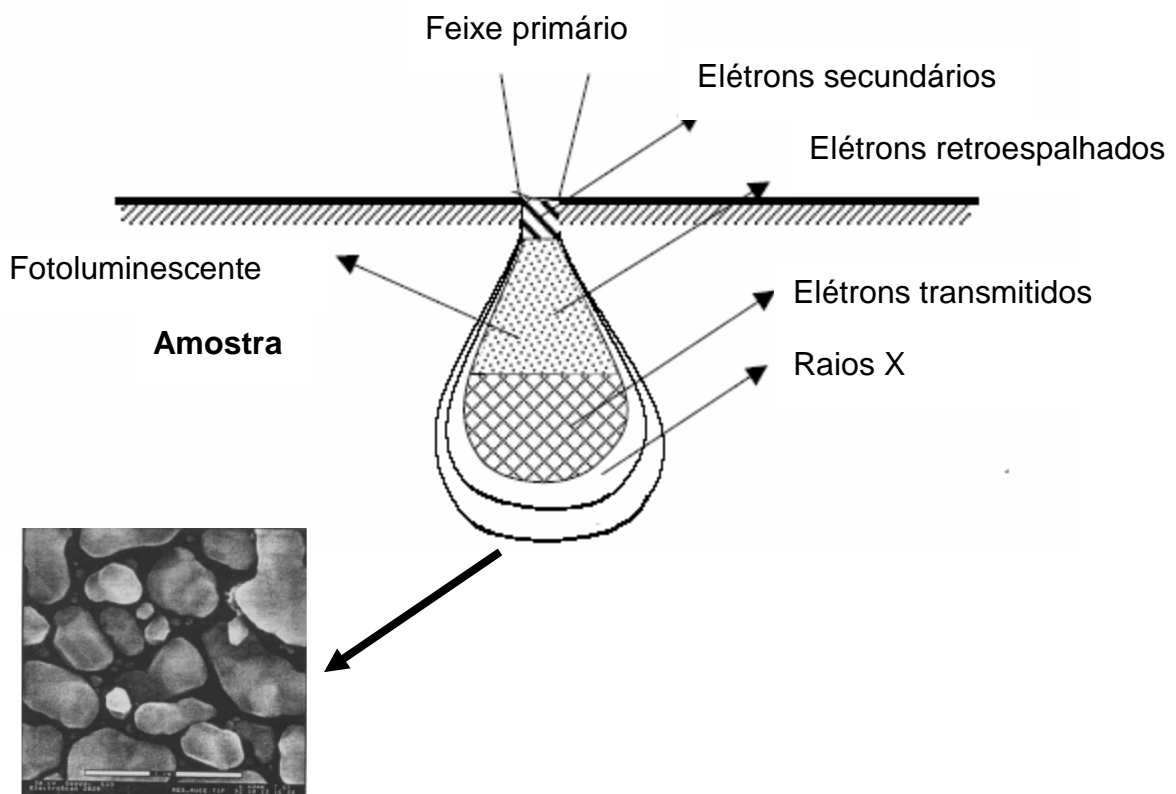


FIGURA 20: Diagrama esquemático de alguns sinais resultantes da interação do feixe de elétron primário com a amostra.

Fonte: Adaptação de Mansur. (2001).

2.8.5. Difração de Raios X

A difração de Raios X é uma técnica que avalia a cristalinidade dos materiais. Na técnica, o Raios X é emitido sobre um material cristalino, cujos átomos estão dispostos em uma rede tridimensional organizada e as distâncias entre eles é semelhante ao comprimento de onda da luz incidente. Assim, observa-se a difração do raio incidido, cujo ângulo de incidência é representado por θ (Figura 21).

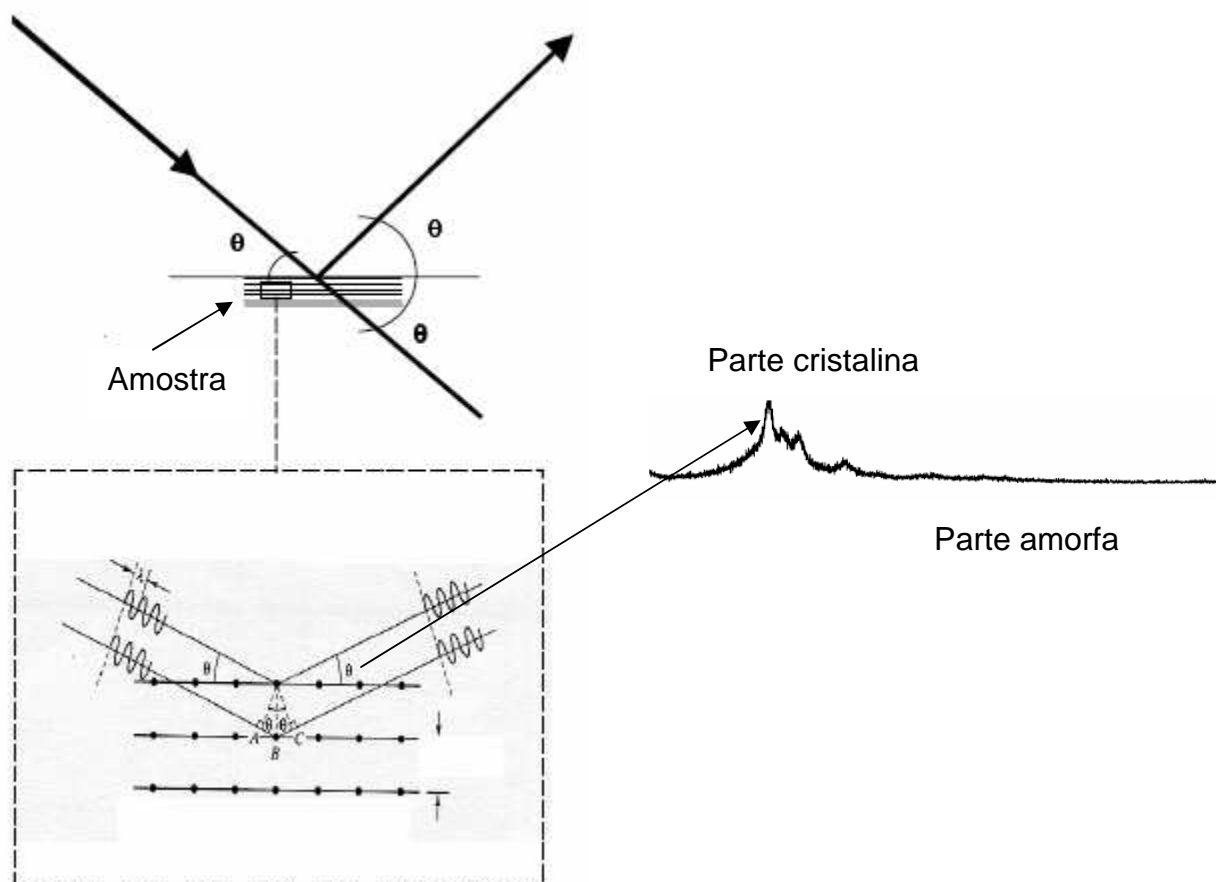


FIGURA 21: Esquema da difração do Raios X. No detalhe a interação do feixe com a amostra de forma construtiva (Lei de Bragg).

Fonte: Mansur. (2001). Adaptada.

Os feixes refletidos por dois planos apresentarão o fenômeno de difração, caracterizando a parte cristalina do material. Caso a difração não ocorra, significa que o material apresenta suas cadeias ou parte delas de forma desorganizada, caracterizando o estado amorfo (Mansur, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar sistemas de natureza sólida, obtidos a partir do copolímero ácido láctico / ácido glicólico (PLGA 75:25), destinados à administração intra-ocular da *Ciclosporina A* (CsA) e visando o tratamento da uveíte posterior

3.2 Objetivos específicos

- a) Validar as metodologias analíticas;
- b) Desenvolver os sistemas sólidos à base do copolímero ácido láctico / ácido glicólico contendo *Ciclosporina A*;
- c) Caracterizar a *Ciclosporina A* e o polímero utilizado para o desenvolvimento dos sistemas por meio de técnicas de análise térmica, constitucional, conformacional e morfológica;
- d) Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos sistemas obtidos.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Materiais

- *Ciclosporina A*: peso molecular de 1202 g/mol, teor de pureza de 98% - Sigma Pharma, Brasil.
- Poli (ácido D,L láctico-co-glicólico) na proporção de 75:25: i.v (viscosidade intrínseca) aproximada de 0,8 – Resomer RG 756, Boehring Inselheim, Alemanha.
- Cloreto de sódio – Synth, Brasil.
- Cloreto de potássio – Synth, Brasil.
- Cloreto de cálcio – Synth, Brasil.
- Acetato de sódio – Synth, Brasil.
- Citrato de sódio – Synth, Brasil.
- Acetonitrila – T.J.Baker, USA.
- Álcool polivinílico, massa molar 72000 – Fluka, Sigma-Aldrich, USA.
- Nitrogênio (Ultrapuro-SP)
- Sulfato de sódio anidro - Synth, Brasil.
- Água destilada.

4.1.2 Métodos

4.1.2.1. Validação do método de análise da *Ciclosporina A* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

A eficiente determinação da *Ciclosporina A* envolve a utilização de técnicas de quantificação de alta sensibilidade já que o fármaco apresenta baixa solubilidade aquosa (40 µg/mL) e alto peso molecular (1.202 g/mol), características físico-químicas que dificultam a sua quantificação quando presente em meios fisiológicos ou laboratoriais. A limitação da quantificação da CsA é descrita por Yang e colaboradores 2005 que afirmam sobre as vantagens da utilização do imunoensaio frente às técnicas de cromatografia de alta eficiência (CLAE) que, apesar de apresentar possíveis reações cruzadas entre o fármaco intacto e seus metabólitos, apresenta maior sensibilidade. Ainda, citam que o método CLAE acoplado ao detector espectroscopia de massa (MS) apresenta maior sensibilidade quando comparado ao CLAE acoplado ao detector UV, já que possui, como principal limitante, a determinação da CsA em baixas concentrações.

Dentre as diferentes técnicas de quantificação da CsA, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ao detector de ultravioleta (UV) foi a técnica escolhida para quantificação da *Ciclosporina A* presente nos implantes intra-oculares e durante o teste de liberação *in vitro*, técnica disponível para realização deste trabalho. A necessidade de validação do método utilizado torna-se, além de necessário, um desafio deste trabalho, uma vez ausente, na literatura, condições cromatográficas de fácil reprodução laboratorial que determinam o fármaco em meio aquosos contendo tampão salina pH 7,4 (TS) e que possibilitam a sua quantificação em concentrações na ordem de microgramas.

Para validação da metodologia analítica e quantificação da CsA, foi utilizado o equipamento utilizado foi o cromatógrafo líquido Waters ® , equipado com bomba modelo 515, injetor automático modelo 717 plus, detector de ultravioleta modelo 2487, programa Millenium ® versão 2.15.01 (Waters, EUA). A coluna empregada foi a Chromolith Performance ® RP-18e de 4,6 mm de diâmetro e 150 mm de comprimento, com partículas de 5 µm. Visando assegurar a confiabilidade dos resultados, o método desenvolvido foi devidamente validado segundo os parâmetros de especificidade, seletividade, linearidade e precisão, preconizadas pela (de acordo com) a resolução 899 de 29/05/2003 do Ministério da saúde (Brasil, 2003).

Todo método analítico deve apresentar seletividade e especificidade que consistem na possibilidade de quantificação exata de um analito em presença de outros tais como componentes da matriz e impurezas ou produtos de degradação, respectivamente. Os parâmetros foram analisados ao comparar os picos obtidos do

fármaco, dos produtos de degradação do polímero *PLGA 75:25* e do meio diluente 2% de acetonitrila (ACN) e TS e, este último descrito no Quadro 3.

QUADRO 3
Composição da solução salina balanceada

Componentes	Concentração (% p/v)
NaCl	0,64%
KCl	0,075%
CaCl ₂	0,048%
MgCl ₂	0,03%
Acetato de sódio	0,39%
Citrato de sódio	0,17%

Fonte: Reynalda 1989. p.1023.

Para determinação da especificidade, 10 mg do polímero *PLGA 75:25* foram incubados em um meio contendo TS a 37°C sob agitação mecânica. Após 7 dias, o tampão foi coletado e os produtos de degradação do polímero foram analisados. Já para a determinação da seletividade, foram avaliados os picos obtidos para o TS e para o fármaco.

A linearidade de um método analítico é a capacidade deste em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A linearidade foi avaliada por meio da criação de uma curva de calibração contendo cinco diferentes pontos em triplicata seguida do tratamento estatístico dos dados para determinação da equação da reta e determinação dos coeficientes de correlação (r) e (r^2). A curva de calibração foi construída a partir dos valores de área dos picos obtidos na ordenada e valores de concentração do analito na abscissa. A equação da reta foi determinada pelo método dos mínimos quadrados.

A precisão da metodologia é determinada uma vez que fornece uma medida de dispersão que determina o erro casual do método e reflete a proximidade dos resultados obtidos em diferentes medidas de uma mesma amostra. É estabelecida

por meio do desvio padrão relativo (DPR %) ou coeficiente de variação (CV%) que indica a relação percentual entre o desvio padrão absoluto e as médias dos dados, ferramenta estatística utilizada para a comparação entre duas ou mais corridas analíticas diferentes. Para o seu cálculo, foi utilizada a equação 1:

$$\% \text{ DPR} = \frac{\text{Sd}}{Y} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

Sd: desvio padrão absoluto, calculado segundo a equação
$$\text{Sd} = \sqrt{\frac{\sum (X-Y)^2}{n-1}}$$

X = área medida

Y = área média

n = número de amostras

A precisão foi obtida por meio da aplicação da metodologia em uma única corrida (precisão intracorrída ou repetibilidade) e em duas corridas em dias diferentes (precisão inter-corrída ou intermediária). A repetibilidade avalia a semelhança de vários doseamentos de uma amostra em uma mesma corrida. A precisão intermediária consiste na semelhança dos valores obtidos em dias diferentes e avalia a influência de fatores tempo, analista e condições do método. A precisão foi determinada avaliando-se as áreas dos picos obtidos de nove determinações (triplicata de três concentrações diferentes do analito: 2, 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por meio do cálculo do desvio padrão relativo (DPR%), de acordo com a fórmula apresentada anteriormente.

A exatidão avalia a proximidade dos resultados obtidos pela metodologia em estudo. O parâmetro engloba a análise do fármaco, da forma farmacêutica e de impurezas. Para análise do fármaco foi realizado a comparação com uma substância de concentração conhecida (padrão de referência) presente no meio contendo o implante *PLGA 75:25* apenas em meio TS pH 7,4. Foi realizada 3 determinações e o resultado foi expresso pela equação 2:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

O Limite de Detecção e de quantificação mostram a sensibilidade do método e o menor valor de concentração possível de ser detectado e quantificado. O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado. Já o limite de quantificação determina a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. O limite de quantificação foi definido pela concentração da amostra que apresentou a menor área encontrada sob o pico possível de ser quantificada. O limite de detecção foi estabelecido pelo menor área do pico apresentado no cromatograma, este não quantificável.

4.1.2.1.1 Condições cromatográficas adotadas

As condições cromatográficas adotadas estão listadas no Quadro 4.

QUADRO 4
Condições cromatográficas adotadas

Fase móvel	Fluxo da fase Móvel (mL/minuto)	Modo do fluxo	Comprimento de onda no UV (nm)	Temperatura Da coluna
ACN: água (70:30 %v/v)	1,0	Isocrático	210	80° C

A fase móvel foi adaptada do descrito por Jaiswal e colaboradores (2004) e preparada a partir da mistura de ACN e água na proporção 70:30. A mistura foi filtrada em membrana de 0,45 µm e degaseificada por 20 minutos. O comprimento de onda utilizado foi de 210 nm e o fluxo de 1,0 mL por minuto, segundo descrito na USP, 2000 para a quantificação do fármaco. A coluna foi aquecida à 80° C, objetivando a obtenção de um pico cromatográfico quantificável quando analisadas pequenas concentrações.

4.1.2.1.2 Preparo da amostra

O preparo das amostras para a validação da metodologia analítica foi realizado por meio da solubilização do fármaco em 2% de ACN seguido da diluição em tampão salina (TS) obtendo-se as concentrações de: 406 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As amostras foram injetadas diretamente no CLAE e foram quantificadas pela determinação da área sob o pico obtida no cromatograma.

4.1.2.2 Preparo dos implantes intra-oculares

Os implantes intra-oculares foram produzidos a partir de dois sistemas: mistura liofilizada e microesferas. O primeiro sistema apresenta-se como uma massa homogênea composto por 75% de *PLGA 75:25* e 25% de CsA. O segundo sistema é constituído da presença de CsA na matriz polimérica esférica.

Para o preparo dos implantes a partir da mistura liofilizada, a CsA e o polímero *PLGA 75:25* foram solubilizados em quantidade suficiente de ACN, obtendo uma solução com uma proporção entre CsA e polímeros de 1:3. A solução foi congelada a -70°C por, no mínimo 24 horas e posteriormente liofilizada (Liofilizador E-C MODULYO, E-C Apparatus Inc. EUA). As microesferas contendo CsA foram obtidas a partir da adaptação do método da emulsão simples óleo em água (O/A) seguido da evaporação do solvente. Para o preparo, 100 mg de PLGA e 10 mg de CsA foram dissolvidos em 10,0 mL de ACN (fase orgânica) a temperatura ambiente. A fase orgânica foi então adicionado lentamente a 100 mL de solução de poli (álcool vinílico) (PVA) 0,5% v/v e agitada a 1000 rpm por três minutos. Após a completa evaporação do solvente sob agitação magnética por seis horas à temperatura ambiente, as microesferas foram coletadas e lavadas com água destilada por centrifugação em três ciclos de 15000 G por vinte minutos.

As formulações obtidas foram moldadas na forma de implante sobre uma placa aquecida na temperatura entre 100 e 120°C , erro em torno de $0,5^{\circ}\text{C}$.

O fluxograma apresentado na Figura 22 esquematiza as etapas do processo de obtenção dos implantes intra-oculares.

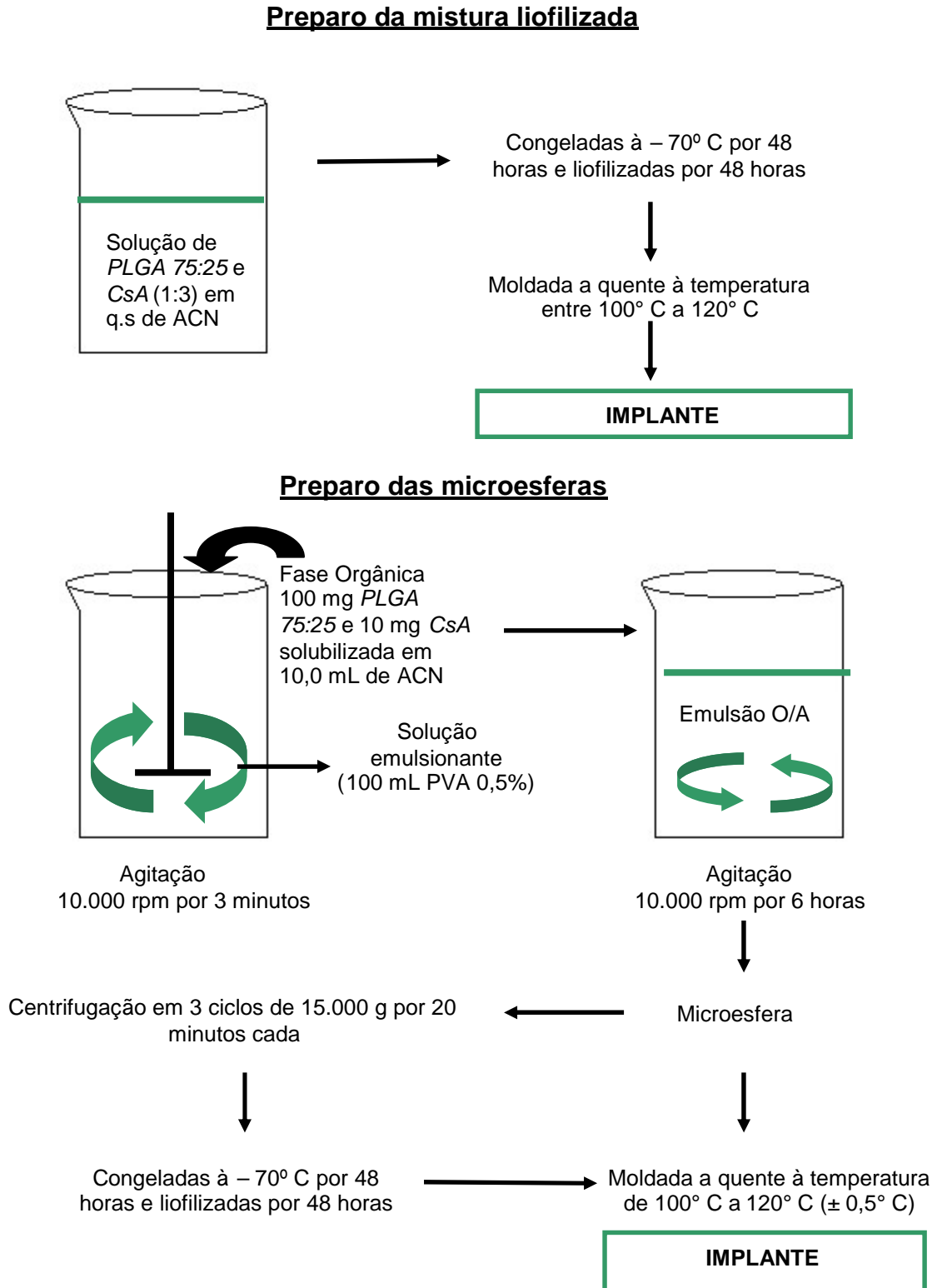


Figura 22: Fluxograma do preparo dos implantes intra-oculares.

4.1.2.3 Determinação do peso médio dos implantes

O peso médio dos implantes intra-oculares obtidos foi calculado pela média entre os valores dos pesos de 10 implantes produzidos a partir de cada sistema. O desvio da média foi estabelecido pelo desvio padrão absoluto (DP).

4.1.2.4 Determinação da quantidade de CsA presente nos implantes

O teor total de CsA presente nos implantes foi determinada ao analisar o sobrenadante obtido durante o preparo das microesferas e pela solubilização dos implantes obtidos a partir da mistura liofilizada em 10 mL de ACN, empregando-se o método cromatográfico CLAE descrito em 3.2.1. Para a determinação do teor de CsA presente nas microesferas, as análises foram realizadas em triplicata, a fim de se determinar a taxa porcentual de encapsulação da CsA nas microesferas obtidas. A partir dos valores encontrados referente à taxa de encapsulação, calculou-se a porcentagem de massa de CsA presentes em cada implante, segundo as equações 3 e 4:

$$ME_{CsA} = \frac{\% CsA \times M_{CsA}}{100} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\% CsA \text{ implante} = \frac{ME_{CsA}}{MT_{ME}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

ME_{CsA} = massa em mg de CsA no implante

% CsA = porcentagem de CsA incorporada na microesfera

M_{CsA} = massa de CsA utilizada para o preparo da microesfera

% CsA implante = porcentagem de CsA no implante ME

MT_{ME} = massa em mg de microesfera preparada

Para os implantes obtidos a partir da mistura liofilizada, a porcentagem foi determinada pelo cálculo da quantidade de fármaco presente nos 10 mL de solução preparada em acetonitrila (equação 4). Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão absoluto determinados entre as amostras pela equação 5.

$$\% \text{ ML CsA} = [\text{CsA}] \times 10 \text{ mL} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde:

% ML CsA = porcentagem de CsA presente no implante intra-ocular.

[CsA] = concentração $\mu\text{g/mL}$ de CsA obtida por CLAE

4.1.2.5 Caracterização dos sistemas contendo PLGA e CsA

A caracterização dos sistemas contendo polímero e fármaco foi realizada a partir das amostras liofilizadas de *PLGA 75:25*, CsA, mistura liofilizada (ML), microesfera contendo CsA (ME) e microesfera branca (MEB) por meio da aplicação de técnicas de caracterização que analisam o comportamento térmico e estrutural dos sistemas. O aspecto morfológico foi observado nos implantes antes e após o estudo de liberação *in vitro*.

4.1.2.5.1 Termogravimetria

As curvas foram obtidas e as amostras liofilizadas *PLGA 75:25* e CsA foram analisadas na termobalança TGA 50H da Shimadzu. As amostras foram colocadas em cadinhos de alumina (Al_2O_3) e executadas em atmosfera dinâmica de nitrogênio como gás de arraste (fluxo de $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). O aquecimento foi realizado da temperatura ambiente à 750°C na razão de aquecimento de 10°C por minuto.

4.1.2.5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

O comportamento térmico foi verificado utilizando o calorímetro modelo DSC50 (Shimadzu), de acordo com a norma ASTM D3418 que regulariza os procedimentos de análise por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). As amostras liofilizadas *PLGA 75:25* e *CsA*, mistura liofilizada, microesfera contendo *CsA* e microesfera não encapsulada foram cortadas em tamanho apropriado e após a pesagem foram seladas em um cadinho de alumínio semi-hermético. Para a determinação da transição vítrea do polímero e da transição de fase cristal-líquido – líquido do fármaco, as amostras foram submetidas a um aquecimento, sob atmosfera dinâmica de Hélio a $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, resfriadas até uma temperatura de -100°C e novamente aquecida a $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 180°C .

4.1.2.5.3 Espectroscopia no Infravermelho

A análise estrutural das amostras foi realizada pela obtenção de espectros abrangendo a região de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ utilizando a técnica FTIR e o equipamento da Perkin-Elmer, modelo Paragon 1000, Spectrum One. As amostras de *CsA* e de *PLGA 75:25* foram dispersas com pó de KBr e as amostras ML, ME e MEB foram analisadas diretamente.

4.1.2.5.4 Microscopia eletrônica de Varredura

Os implantes obtidos a partir de ambos os processos antes e após sete dias de incubação (método descrito no item 3.3) foram metalizadas com ouro e diretamente analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, modelo JSM-6360LV) operado a 15 kV.

4.1.2.5.5 Difração de Raios X

Os difratogramas de Raios X das amostras liofilizadas: CsA, PLGA 75:25, ML e ME, foram obtidos pelo equipamento Rigaku Geirgerflex. Utilizou-se um tubo de cobre e uma radiação $CuK_{\alpha} = 1,54051 \text{ \AA}$, em ângulos de 2θ variando de 4 a 60° . A velocidade de varredura foi de $4^{\circ} \cdot \text{min}^{-1}$.

4.1.2.5.6 Estudo de liberação *in vitro* dos implantes intra-oculares

Para a realização do estudo de liberação *in vitro*, os implantes foram colocados em frascos de penicilina contendo $2,00 \text{ mL}$ do TS e incubados à temperatura de 37°C sob agitação de 30 rpm no incubador (Tecnal, modelo TE - 424). Em intervalos pré-determinados, todo o meio foi coletado, os implantes foram retirados, pesados e novamente colocados em cada frasco junto a outros $2,0\text{mL}$ de TS. O perfil de liberação foi avaliado como porcentagem acumulada de fármaco liberado empregando-se o método descrito em 4.1.2.1.

As amostras analisadas foram preparadas por meio da concentração do meio coletado sob aquecimento até total evaporação do solvente, solubilizados em $200 \mu\text{L}$ de ACN e em seguida, as amostras foram filtradas em uma membrana de filtração de $20 \mu\text{m}$ para posterior injeção no cromatógrafo. O cálculo da quantidade em microgramas de CsA em cada amostra, foi encontrada pela fórmula a seguir:

$$M_{\text{CsA}} = C_{\text{CsA}} \times V_{\text{total}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde:

M_{CsA} : massa de CsA liberada no meio de incubação

C_{CsA} : concentração de CsA presente na amostra

V_{total} : volume de TS utilizado para incubação das amostras (2 mL)

Os valores foram expressos pela média e desvio padrão de 3 determinações dos implantes obtidos por ambos os métodos desenvolvidos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação do método de análise da *Ciclosporina A* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Conforme descrito anteriormente, a viabilidade de aplicação da metodologia desenvolvida para este trabalho foi validada segundo os parâmetros de especificidade, seletividade, linearidade, precisão intermediária e repetibilidade (Brasil, 2003).

5.1.1. Seletividade e especificidade

Foram comparados os cromatogramas obtidos nas seguintes condições: fármaco diluído em TS contendo 2% de ACN (TS/ACN) e em ACN (Figura 23), TS/ACN e 0,5% de PVA solubilizado em água destilada (Figura 24) e produtos de degradação do polímero *PLGA 75:25* (Figura 25).

A Seletividade foi avaliada a partir da análise dos cromatogramas obtidos para o TS/ACN, PVA e para o fármaco, mostrados nas Figuras 23 e 24. Já a especificidade foi demonstrada pela comparação dos picos obtidos do fármaco (Figura 23a) e dos produtos de degradação do *PLGA 75:25* (Figura 24).

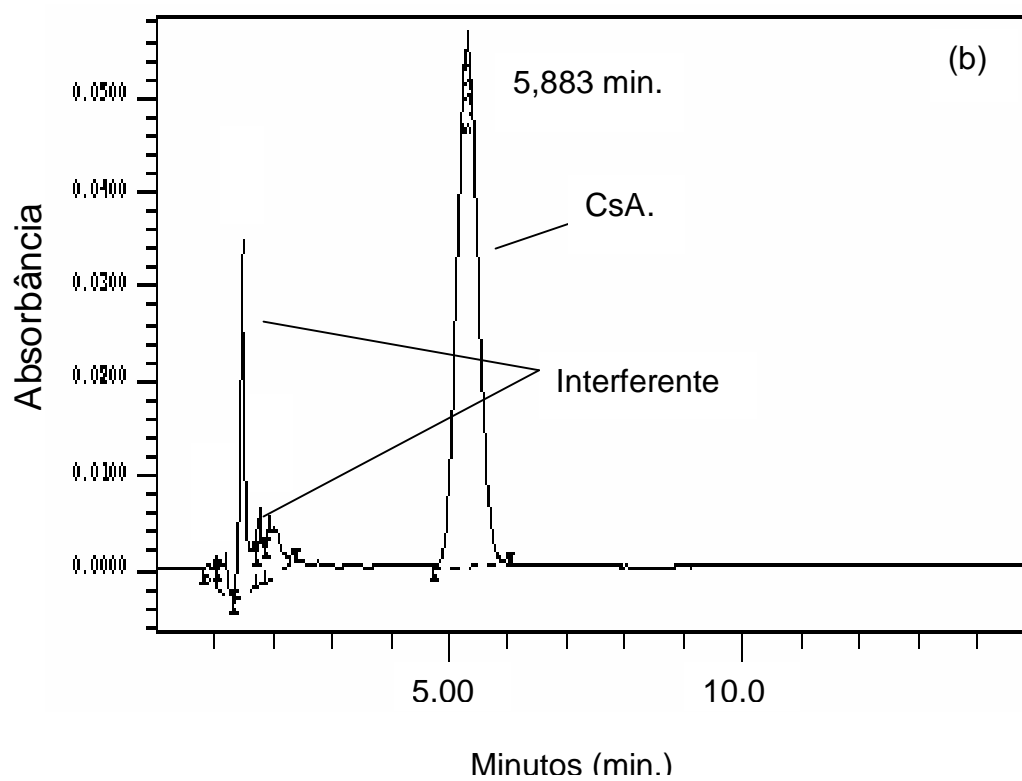
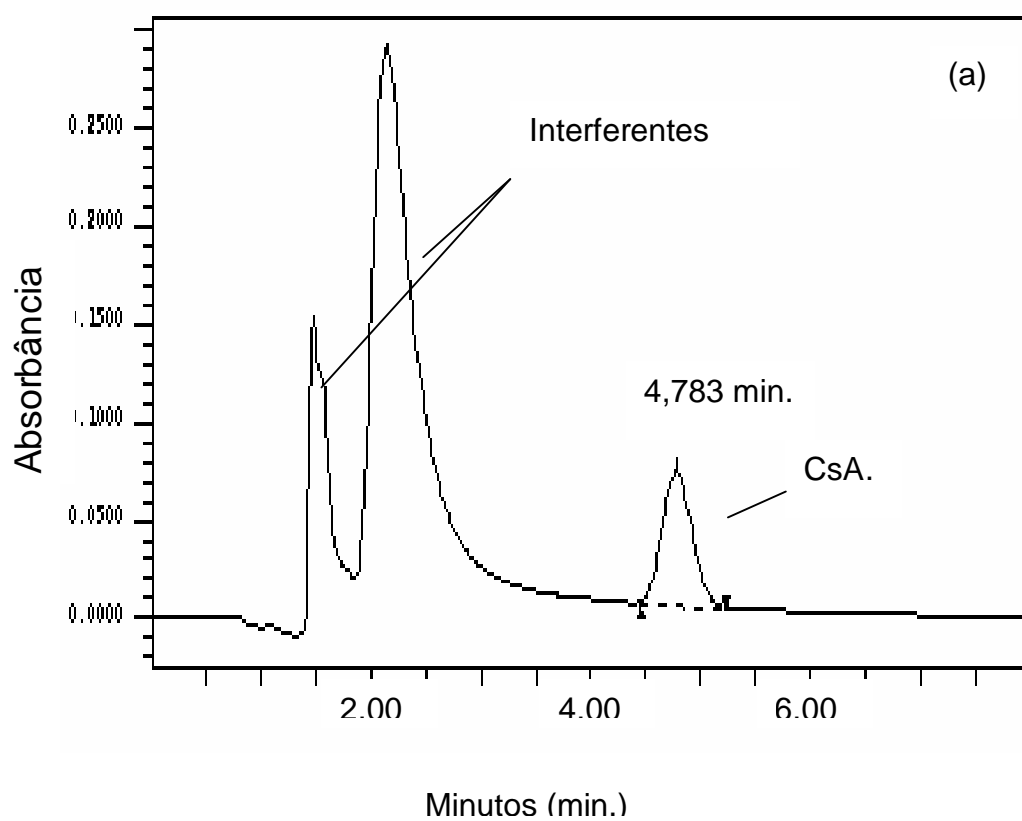


FIGURA 23: Cromatograma obtido para: (a) CsA (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluída em TS/ACN e (b) CsA (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluída em ACN.

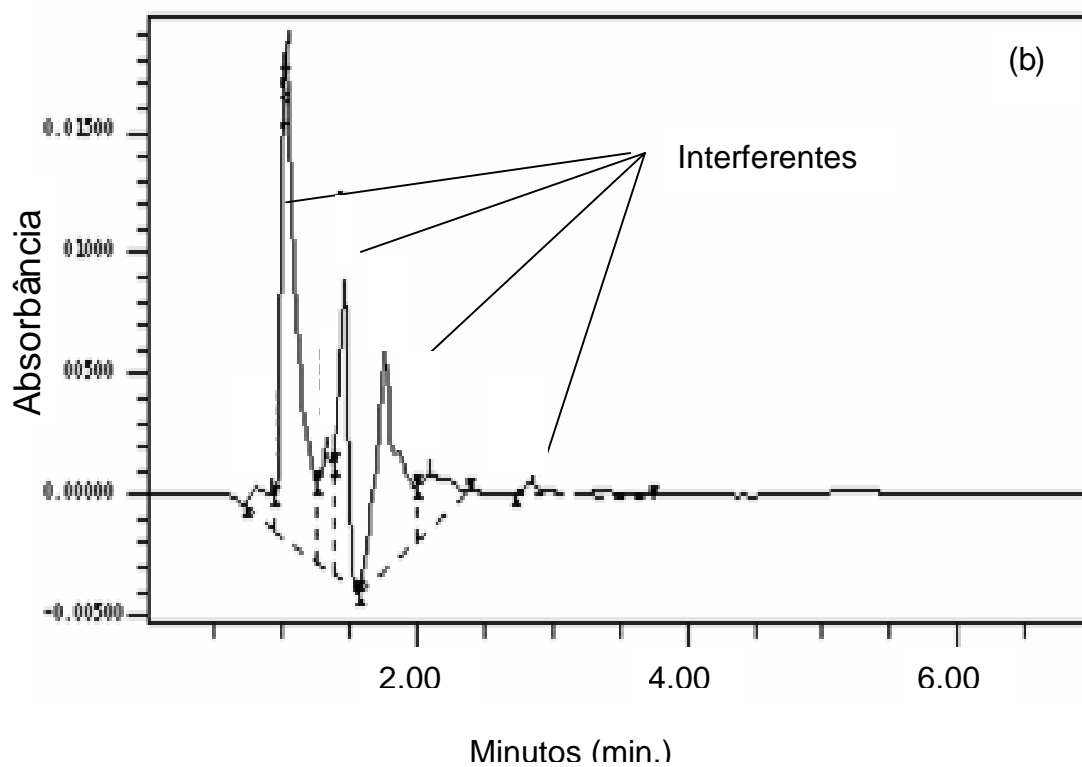
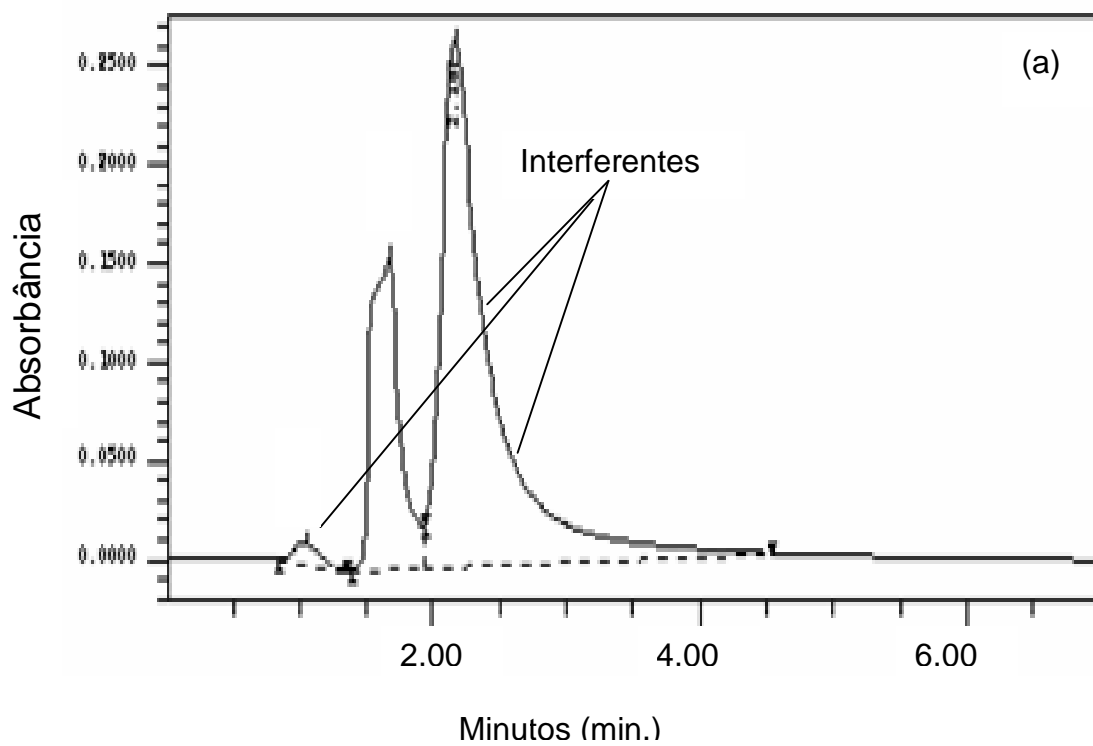


FIGURA 24: Cromatograma obtido para: (a) TS/ACN e (b) PVA.

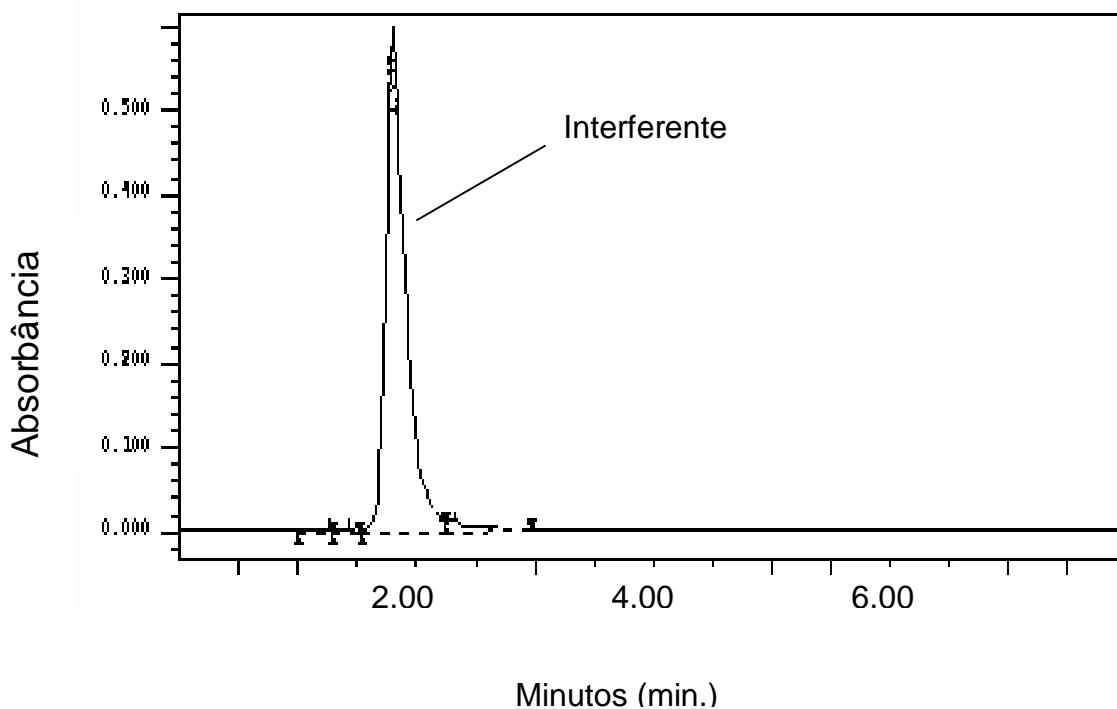


FIGURA 25: Cromatograma obtido para o polímero *PLGA* 75:25 em TS após uma semana de degradação.

O estudo dos cromatogramas indica uma boa separação do fármaco, do TS e da ACN (Figuras 22 e 23), comprovando a seletividade do método. A especificidade é confirmada ao se comparar os cromatogramas mostrados nas figuras 22 e 24, uma vez que os picos presentes no meio contendo tampão TS, ACN e dos produtos de degradação do ácido láctico e glicólico (Figura 24) não interferem no pico obtido para quantificação do fármaco (Figura 22).

5.1.2 Linearidade

A curva de calibração da CsA em TS construída a partir das médias das áreas das concentrações de 2,5, 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ juntamente com o coeficiente de correlação linear (R^2) e equação da reta está representada na Figura 26.

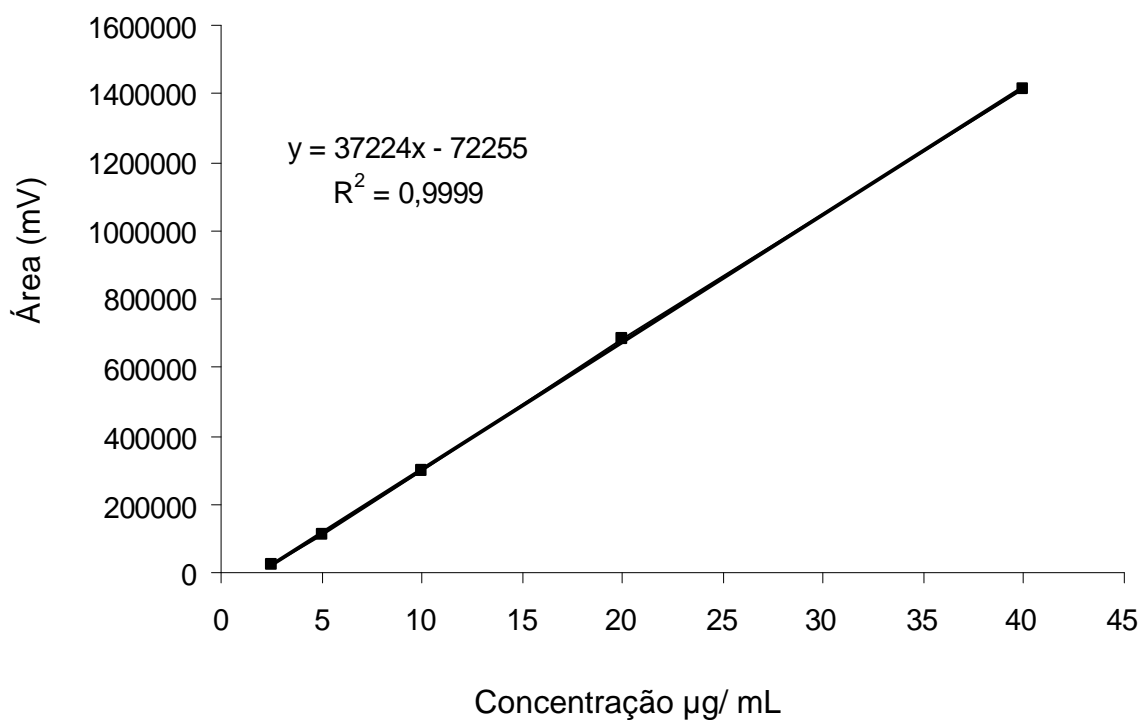


FIGURA 26: Curva de calibração, equação da reta e R^2 para a CsA em TS/ACN nas concentrações de 2,5, 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A curva construída apresentou linearidade, uma vez que a média dos resultados de concentração das amostras, no intervalo de 2,5 a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram-se proporcionais. O valor de R^2 apresentou-se superior a 0,99.

5.1.3 Precisão intracorridas (repetibilidade)

Na tabela 1 encontra-se os valores da média das áreas dos picos obtidos em triplicata das cinco concentrações diferentes do analito: 2,5, 5, 20, 10 e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e seus respectivos valores de desvio padrão relativo (DPR%).

TABELA 1
Repetibilidade do método de quantificação da CsA

CsA $\mu\text{g}/\text{mL}$	Área média obtida por CLAE	% DPR
40,0	1413287	3,2
20,0	681365	0,2
10,0	297215	2,7
5,0	109094	4,2
2,5	22586	1,1

Os valores de desvio padrão relativos encontrados foram inferiores a 5%, estando de acordo com o especificado na Resolução 899 da ANVISA de 29/05/2003, comprovando a repetibilidade do método analítico.

5.1.4 Precisão inter-corrida (intermediária)

A precisão intermediária foi avaliada pela análise dos desvios padrões relativos (DPR%) das áreas de quatro concentrações diferentes do analito: 2, 5, 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ avaliadas em dias diferentes (tabela 2).

TABELA 2
Precisão intermediária do método de quantificação da CsA

CsA $\mu\text{g}/\text{mL}$	Área média obtida por CLAE	% DPR
40,0	1409781	0,4
20,0	667968	2,9
10,0	297193	0,0
2,5	23159	3,5

A reprodutibilidade do método analítico foi demonstrado ao analisar os desvio padrões encontrados, todos inferiores à 5%, estando de acordo com o preconizado pela ANVISA (Brasil, 2003).

5.1.5 Exatidão do método

A exatidão do método foi demonstrada por meio da análise dos cromatogramas obtidos do fármaco na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ após 40, 90 e 120 dias de incubação em TS (Figura 27).

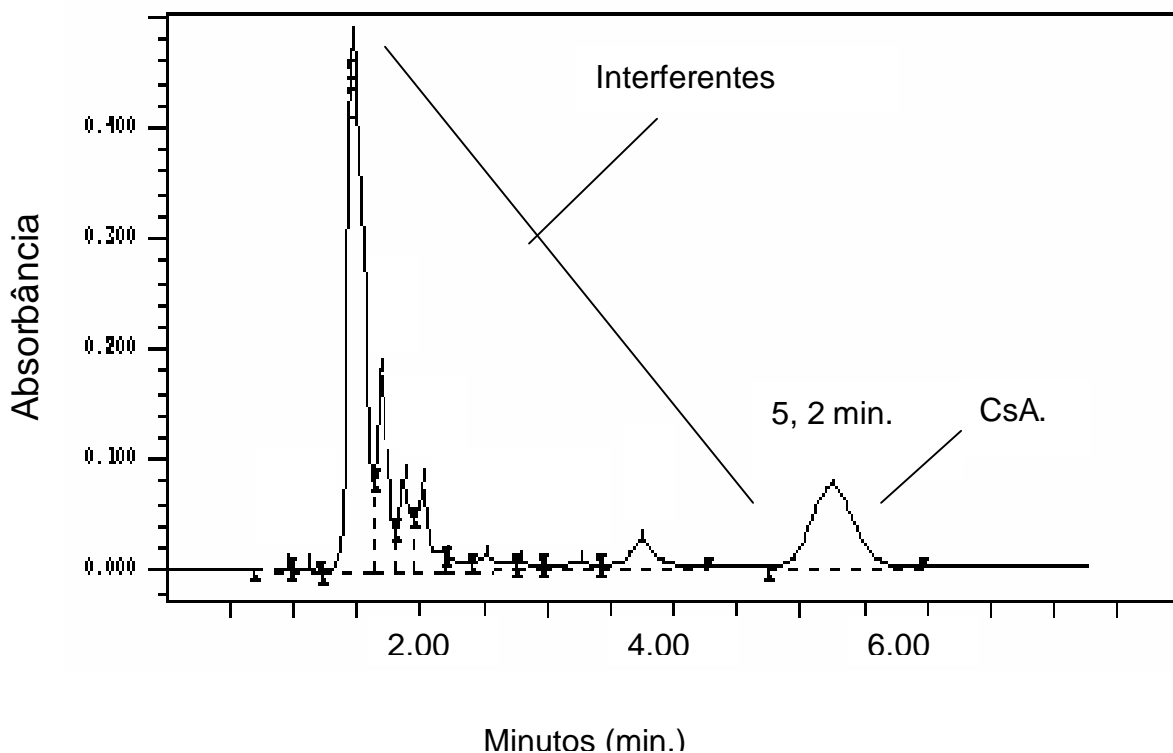


FIGURA 27: Cromatograma obtido do implante contendo apenas *PLGA 75:25* e o padrão de *CsA* na concentração de $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ após 40 dias de degradação.

A partir da área do pico encontrado para o fármaco foi realizada a quantificação deste presente no meio de incubação. A concentração média encontrada foi de $52 \mu\text{g}/\text{mL}$ o qual apresentou um valor de exatidão de 104%. A porcentagem é válida uma vez que se apresentou dentro da faixa de variação estabelecida pela ANVISA (Brasil, 2003).

5.1.6 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação encontrados foram de $0,8 \mu\text{g}/\text{mL}$ e $1,2 \mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Esses valores mostram a detectibilidade adequada do método, uma vez que é possível quantificar o fármaco quando apresenta valores de concentração superiores ou iguais a $1,2 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Pode-se concluir que a validação do método desenvolvido comprovou a validade dos parâmetros e a possibilidade de sua aplicação para quantificação do fármaco CsA durante os estudos de liberação *in vitro*.

5.2 Preparo dos implantes biodegradáveis intra-oculares

Os implantes contendo CsA foram desenvolvidos a partir de dois métodos de preparo: 1) moldagem a quente de uma mistura liofilizada (ML) e 2) de uma massa contendo microesferas (ME).

Os implantes desenvolvidos a partir da ML foram preparados a partir de uma massa obtida após a liofilização do polímero e do fármaco, de acordo com o método descrito em trabalhos que objetivaram o desenvolvimento e avaliação do perfil de liberação de implantes intra-oculares contendo diferentes fármacos.

A viabilidade do método pela moldagem a quente da massa liofilizada é mostrada por Kunou e colaboradores (1995) e Yasukawa e colaboradores (2001) que obtiveram satisfatórios implantes intra-esclerais de PLA e ganciclovir ao aquecer a massa liofilizada a uma temperatura dentro da faixa de estabilidade do fármaco (80 a 100°C). Cada implante apresentou a massa de 8,5 mg que viabilizou a sua aplicação pela via intra-escleral.

O preparo de implantes destinados à aplicação intra-vítrea também foi obtido, com sucesso, no trabalho de Fialho e colaboradores (2005), que desenvolveram sistemas cilíndricos contendo o copolímero PLGA 50:50 e dexametasona pelo método de moldagem a quente de mistura liofilizada. Além da obtenção de uma metodologia reprodutiva, os implantes apresentaram aspectos homogêneos, compactos, com um comprimento e uma espessura favoráveis para a segura implantação na cavidade vítrea. Não foi encontrado na literatura disponível trabalhos que utilizaram esse método para o preparo de implantes intra-oculares contendo CsA e PLGA 75:25, como os desenvolvidos neste trabalho.

O método de preparo a partir da ME foi proposto como alternativa ao método de preparo convencional. O método difere-se apenas na moldagem de uma massa contendo o fármaco veiculado em microesferas ao invés de se utilizar uma massa liofilizada.

Os implantes desenvolvidos no trabalho aqui descrito apresentaram-se como um sistema compacto. As fotografias dos implantes obtidos estão reproduzidas na Figura 28.

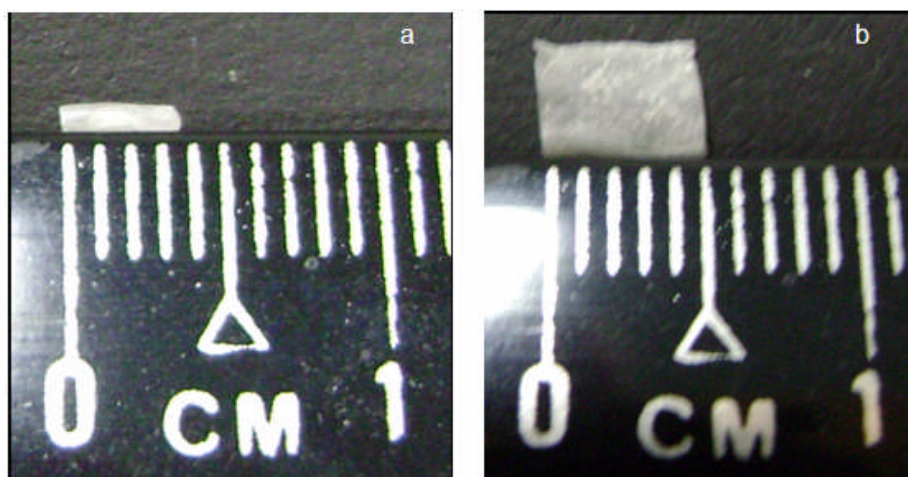


FIGURA 28: Fotografia dos implantes a partir: (a) da ML (b) da ME

Os implantes obtidos a partir da ML apresentaram-se na forma de um cilindro com aproximadamente 4 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro. Os implantes intra-oculares preparados a partir da ME apresentaram a forma plana, com uma área de 5 mm² e espessura de, aproximadamente, 0,1 mm. A média e desvio padrão da média são apresentados na tabela 3.

TABELA 3

Massas dos implantes biodegradáveis obtidas (n = 10)

Implantes	Massa dos implantes (mg) (média ± DP)
Mistura liofilizada PLGA: CsA (ML)	5,9 ± 0,1
<i>Microesfera liofilizada</i> <i>contendo CsA (ME)</i>	9,8 ± 0,1

Os resultados encontrados mostram que foi possível obter implantes intra-oculares constituídos por PLGA 75:25 e CsA por meio da utilização da metodologia de moldagem a quente de uma massa liofilizada, confirmando os dados descritos na literatura sobre a reprodutibilidade do método e a viabilidade de sua utilização no preparo dos implantes intra-oculares.

A reprodutibilidade e a viabilidade do método de preparo por meio da moldagem de microesferas também foram observadas e resultados obtidos permitem considerá-lo como uma nova forma de obtenção de implantes intra-oculares.

5.3 Quantificação da quantidade de CsA presente nos implantes intra-oculares

A determinação da quantidade de CsA presente nos implantes foi realizada empregando-se o método validado para CLAE, descrito no item 3.2.1, onde se injetou no cromatógrafo os sobrenadantes das microesferas e das soluções obtidas após solubilização dos implantes ML em acetonitrila. A porcentagem de CsA presente nas amostras analisadas foram 31,6% para os implantes ML e 57,5% para os implante ME, resultados descritos na tabela 4.

TABELA 4
Porcentagem de CsA presente nos implantes (n = 3)

Implantes	% de CsA nas amostras analisadas	% de CsA nos implantes
Mistura liofilizada PLGA: CsA (ML)	*31,6 ± 0,1	31,6
<i>Microesfera liofilizada</i> <i>contendo CsA (ME)</i>	**57,5 ± 3,0	5,2

* Porcentagem de CsA presente na solução de ACN.

** Porcentagem de CsA incorporada.

A porcentagem de CsA presente nos implantes intra-oculares obtidos a partir de ML foi de 31,6% (Tabela 4), ocorrendo um aumento da proporção de fármaco em relação ao total esperado (25% p/p). É possível que, durante a coleta da massa obtida após a liofilização, certa quantidade de polímero tenha ficado aderida na parede do frasco sendo este disponibilizado no sistema em menor quantidade. Como foi observado repetibilidade dos valores percentuais de CsA durante as diversas quantificações, padronizamos a quantidade de fármaco presente no ML como sendo 31,6% p/p, quantidade utilizada para realização dos cálculos durante o teste de liberação *in vitro*, descrito no item 8.1.

Quanto a quantidade de CsA presente nos implantes intra-oculares ME, foi observado um valor médio de 5,2% de fármaco presente nos implantes, que reflete a taxa de incorporação, e/ou a presença também de fármaco adsorvido na superfície das microesferas.

Freiberg e Zhu (2004) citam a temperatura e a concentração do polímero como fatores que influenciam na taxa de incorporação de fármacos em microesferas. Outros fatores também podem estar relacionados, tais como: quantidade de água, quantidade e tipo de solvente, quantidade de PVA e velocidade de agitação. Além disso, Li e colaboradores (2005) obtiveram microesferas a base de PLGA 80:20 contendo CsA utilizando o diclorometano como solvente, com valores de encapsulação de 97% e relacionaram a eficiente taxa de Incorporação à baixa solubilidade da CsA em meio aquoso (40 µg/ mL). Afirmam que sua lipofilicidade favorece altas taxas de encapsulação em microesferas poliméricas, uma vez que é mais provável que a CsA se distribua na matriz formada por polímeros hidrofóbicos do que na porção externa aquosa.

A discordância na taxa de incorporação entre o dado da literatura e o método desenvolvido para o preparo das microesferas pode estar relacionada com a utilização da acetonitrila e não do diclorometano como descrito por Li e colaboradores (2005).

A utilização da ACN foi a alternativa encontrada para reverter a inadequada solubilização do fármaco no diclorometano que foi o solvente utilizado no preparo das microesferas desenvolvidas por Li e colaboradores (2005). No trabalho aqui descrito, observou-se, experimentalmente, que o fármaco não foi totalmente solubilizado em diclorometano na concentração desejada. A alternativa encontrada foi a tentativa de solubilizar o fármaco em um outro solvente orgânico, como a

acetonitrila, cuja solubilidade foi adequadamente observada. A menor taxa de incorporação obtida pode estar relacionada com a rápida evaporação da ACN que dificultou a deposição do polímero no núcleo sólido (CsA), e conseqüentemente, a incorporação do fármaco pelas esferas formadas de copolímero.

Assim, com o intuito de melhorar a taxa de incorporação da CsA, propõe-se a melhor padronização das condições metodológicas adotadas, tais como o melhor controle da temperatura, do tempo e da velocidade de agitação e a avaliação da taxa de incorporação em diferentes quantidades de água, de solvente e de PVA.

Quanto ao desenvolvimento das formulações propostas, foi possível observar reprodutibilidade e viabilidade das metodologias utilizadas para obtenção de implantes intra-oculares, uma vez que foram obtidos sistemas compactos e possíveis de serem utilizados nos testes preliminares de liberação *in vitro*. As características dos implantes obtidos a partir da ML apresentaram-se de acordo com os dados da literatura (Kunou et al., 1995; Jaffe et al., 1998; Kunou et al., 2000; Yasukawa et al., 2001; Fialho et al., 2005). As características daqueles desenvolvidos pela ME viabilizam o emprego do método como um processo alternativo de obtenção de implantes intra-oculares moldados a quente.

5.4 Análise da cristalinidade dos constituintes presentes nos implantes

A análise da cristalinidade dos materiais presentes nos implantes foi realizada por meio da utilização das técnicas: Espectroscopia no Infravermelho e Difração de Raios X.

Neste trabalho, a cristalinidade da CsA foi estimada pela Espectroscopia no Infravermelho, de acordo com o descrito no trabalho de Bertacche e colaboradores (2006). Os autores relatam sobre a determinação quantitativa da cristalinidade da CsA ao comparar os picos característicos de FTIR do material cristalino e do material liofilizado (Figura 29) e comprovam que a região entre 2800 e 3000 cm^{-1} , característica do estiramento $\nu(\text{C} - \text{H})$, é um indicativo do estado cristalino e amorfo do fármaco (Tabela 5).

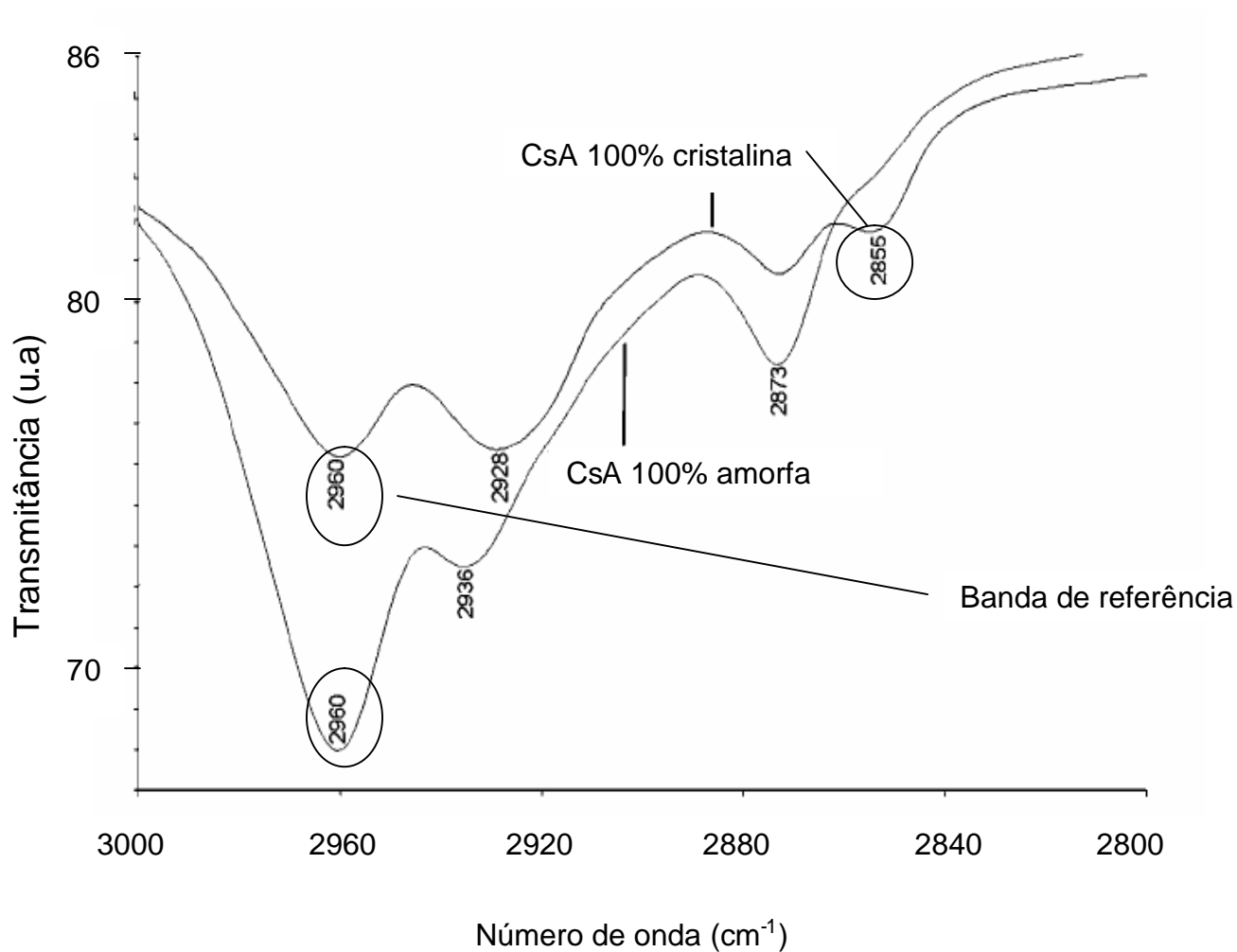


FIGURA 29: Espectros no infravermelho na região de 3000 a 2800 cm^{-1} das amostras (a) CsA cristalina e (b) CsA amorfa.

Fonte: Bertacche et al., 2006. Adaptada.

TABELA 5

Bandas no FTIR características do estado cristalino e amorfo

Bandas de referência (cm^{-1})	Estado do material
2855	100% cristalino
2928	100% amorfo
2960	Referência

(Bertacche et al., 2006)

Segundo Bertacche e colaboradores (2006), a banda em 2855 cm^{-1} é detectada apenas na forma cristalina. A banda em 2928 cm^{-1} caracteriza o fármaco no estado amorfo e a banda em 2960 cm^{-1} é encontrada nos estados cristalino e amorfo, independente da porcentagem de cristalinidade presente. Baseando-se nas informações apresentadas, foi proposto, neste trabalho, calcular a porcentagem cristalina das amostras CsA antes (CsA P) e após (CsA L) à liofilização quanto à medida intensidade relativa das alturas das bandas 2855 cm^{-1} e 2960 cm^{-1} em relação ao eixo das abscissas, utilizando as seguintes equações 7 e 8:

1) índice de porcentagem cristalina

$$\% C = \frac{I_{<2855>}}{I_{<2960>}} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde:

$I_{<2855>}$ = altura do pico na região de 2855 cm^{-1} (estiramento do grupo metila)

$I_{<2960>}$ = altura do pico de referência na região de 2960 cm^{-1} (estiramento do grupo metila)

2) índice de porcentagem amorfa

$$\% A = \frac{\Delta W}{I_{<2960>}} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde:

ΔW = altura em 2960 cm^{-1} – altura em 2855 cm^{-1} para amostra pó

$I_{<2960>}$ = altura do pico de referência na região de 2960 cm^{-1} (estiramento do grupo metila)

Os espectros no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) observados para as amostras Csa P e CsA L e as alturas encontradas estão apresentadas na Figura 30.

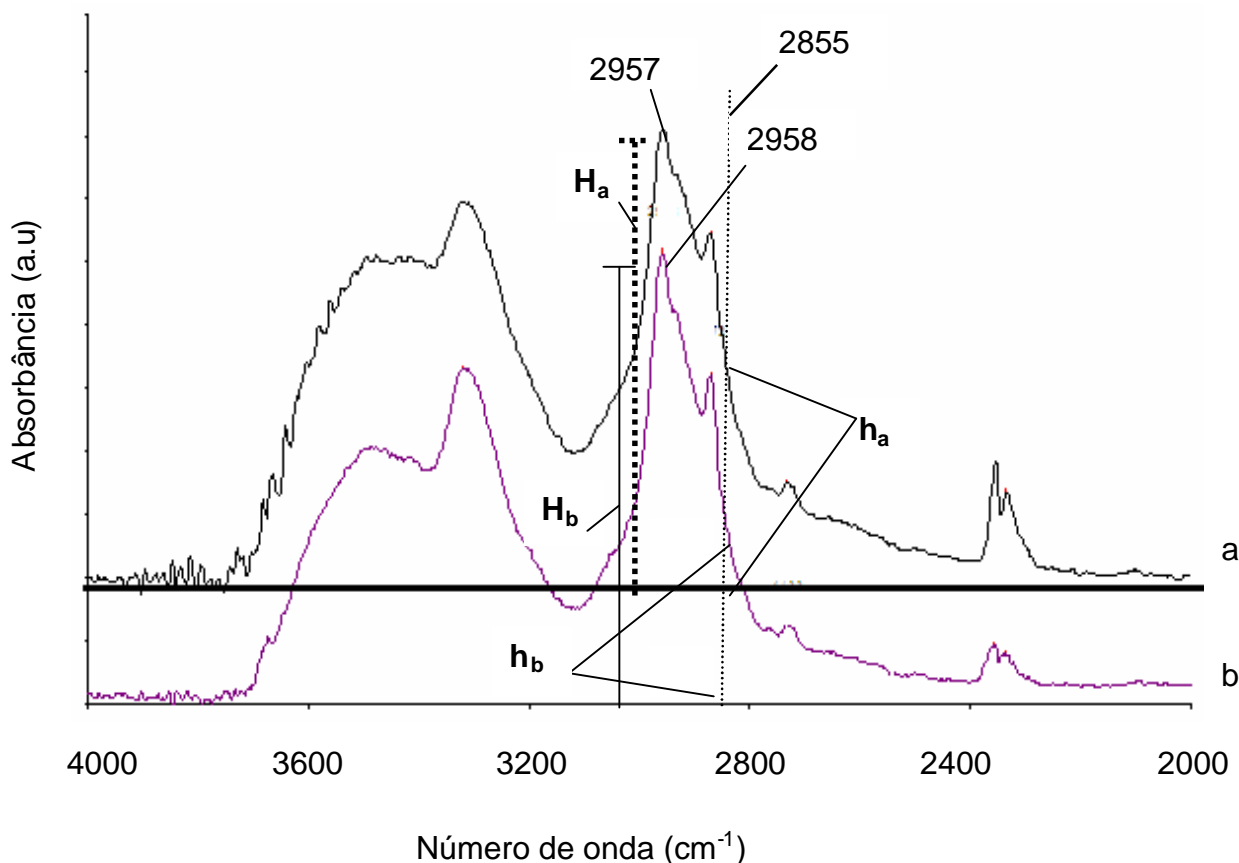


FIGURA 30: Espectroscopia no Infravermelho na região de 4000 a 2000 cm^{-1} das amostras (a) CsA P e (b) CsA L: H = altura do pico 2957 cm^{-1} para CsA P (a) e CsA L (b) e h = altura do pico 2855 cm^{-1} para CsA P (a) e CsA L (b).

A banda de estiramento $\nu(\text{C} - \text{H})$ em 2957 cm^{-1} (Figura 30a) e 2958 cm^{-1} (Figura 30b) encontra-se presente nos espectros no infravermelho, valor próximo à banda de referência em 2960 cm^{-1} , descrito por Bertacche e colaboradores (2006). Os valores percentuais estimados das regiões cristalinas e amorfas presente nas amostras CsA P e CsA L estão apresentados na tabela 6. Estes valores são estimativas e não devem ser considerados como absolutos.

TABELA 6

Valores percentuais encontrados das partes cristalinas e amorfas

Intensidade (Normalizada)				
Amostra	I <2960>	I <2855>	% cristalina	% amorfa
CsA P	Ha = 5,7	ha = 2,0	± 35	± 65
CsA L	Hb = 5,6	hb = 1,5	± 27	± 73

A partir da análise das porcentagens de cristalinidade encontrada para as amostras, observou-se a porcentagem de cristalinidade em valores próximos de 35% para a CsA P e 27% para a CsA L. Pode-se classificar o fármaco como um sólido semi-cristalino que apresenta uma organização estrutural tanto na forma mais ordenada, a cristalina, como na menos ordenada, amorfa.

A menor cristalinidade do fármaco na forma liofilizada pode ser atribuída ao processo de liofilização. Propõe-se que a mudança de cristalinidade está relacionada com a restrita mobilidade da molécula de CsA durante a liofilização. Acredita-se que este processo reduz a chance de conformação da molécula na forma tridimensional e mais estável, originando uma maior região amorfa quando comparado com o estado não liofilizado.

Mesmo observando diferenças na cristalinidade, foram encontrados diferentes valores percentuais de cristalinidade, indício de que o processo de liofilização pouco altera o estado do fármaco. Estes resultados podem ser quantitativamente melhor avaliados utilizando a deconvolução.

A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que o fármaco trata-se de um material parcialmente amorfo. Essa informação torna-se essencial para a compreensão da associação entre o fármaco e o polímero como constituintes dos implantes poliméricos desenvolvidos neste trabalho.

Uma vez definido o estado semi-cristalino do fármaco, a análise de cristalinidade foi novamente realizada objetivando conhecer o estado dos materiais

CsA e PLGA 75:25 quando associados. Para tal, foi aplicado a técnica de Difração de Raios X (Figura 31)

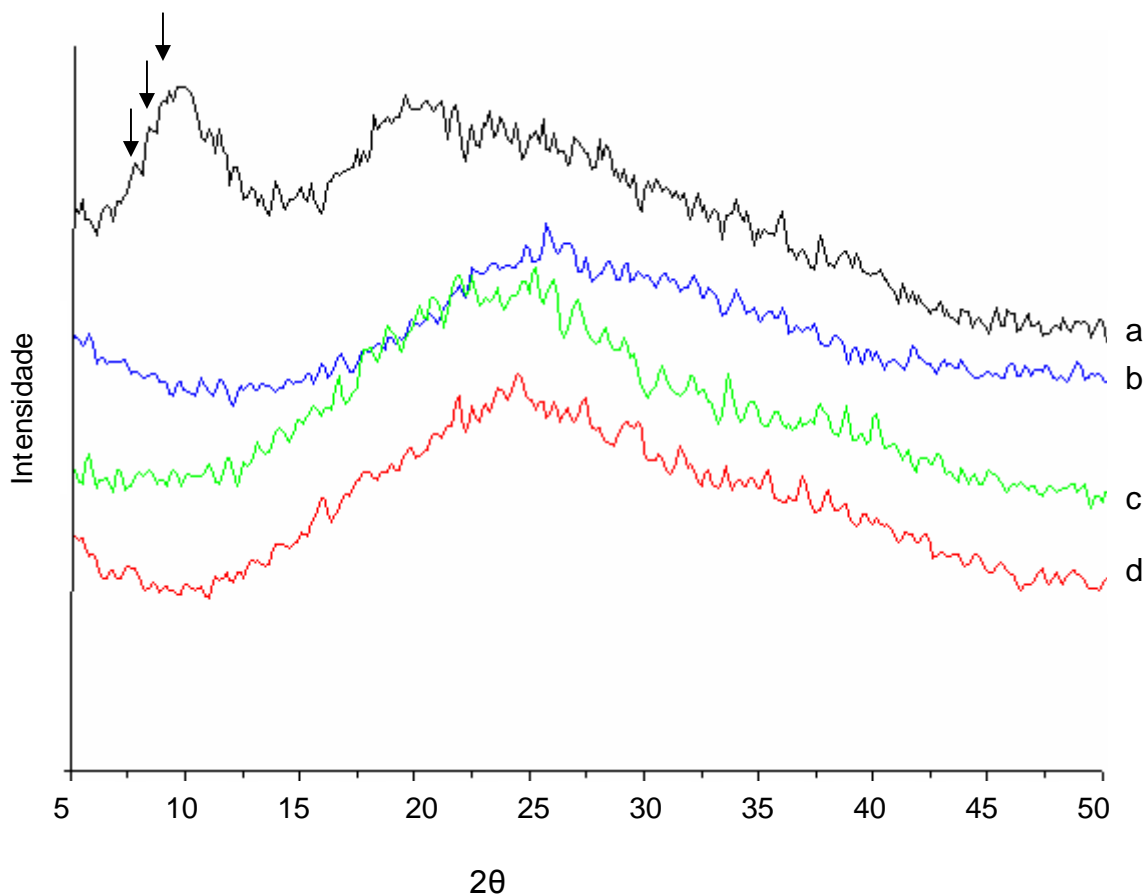


FIGURA 31: Difratograma das amostras: CsA L (a), PLGA 75:25 L (b), ME (c) e ML (d).

Os difratogramas obtidos apresentaram-se características de carácter amorpho. No perfil de difração de raios X para a CsA, foram encontrados diferentes picos de intensidade em 8,3, 9,4 e 11,6° 2θ. Os valores observados experimentalmente encontram-se similares aos picos de cristalinidade na região entre 7 e 17 2θ observados por Ballesteros et al. (2003). Os resultados confirmam o aspecto semi-cristalino da CsA anteriormente abordado pelos dados de FTIR quantitativos encontrados. O difratograma do PLGA 75:25 não apresentou regiões de cristalinidade, possibilitando classificá-lo como um sólido totalmente amorpho, conforme descrito por Oréfica e colaboradores (2006).

As amostras associadas ME e ML apresentaram um perfil distinto, que revelou mais amorpho quando comparado com a CsA L, uma vez ausentes os picos em 8,3,

9,4 e 11,6° 2 θ observados para a CsA L. É observado uma redução da banda característica da CsA em ambas as amostras entre 1 e 15 ° 2 θ . Desta forma, há indícios de alteração do estado semi-cristalino da CsA nas amostras associadas.

Acredita-se também que a menor cristalinidade apresentada para as amostras associadas pode estar relacionada com a forma de distribuição das moléculas da CsA entre os espaços das cadeias poliméricas do PLGA 75:25. Sugere-se que o fármaco se organiza de uma forma menos ordenada no interior da massa polimérica, comportamento responsável pelo aumento do estado amorfo.

O conhecimento da forma estrutural das moléculas do fármaco nos permite melhor compreender o comportamento deste material como constituinte do sistema polimérico aqui obtido e nos fornece informações que facilitam a melhor discussão dos resultados encontrados no momento da avaliação de possíveis interações entre o fármaco e o polímero e do perfil preliminar de liberação *in vitro*, resultados apresentados a seguir.

5.5 Caracterização físico-química dos sistemas constituídos por copolímero *PLGA 75:25* e CsA

5.5.1 Termogravimetria

A Termogravimetria (TG) foi utilizada para avaliar a estabilidade do *PLGA 75:25* e da CsA durante o processo de produção do implante, no qual ocorre um aquecimento a uma temperatura de 120°C.

A Figura 29 apresenta as curvas TG obtidas para as amostras liofilizadas *PLGA 75:25 L* e *CsA L*.

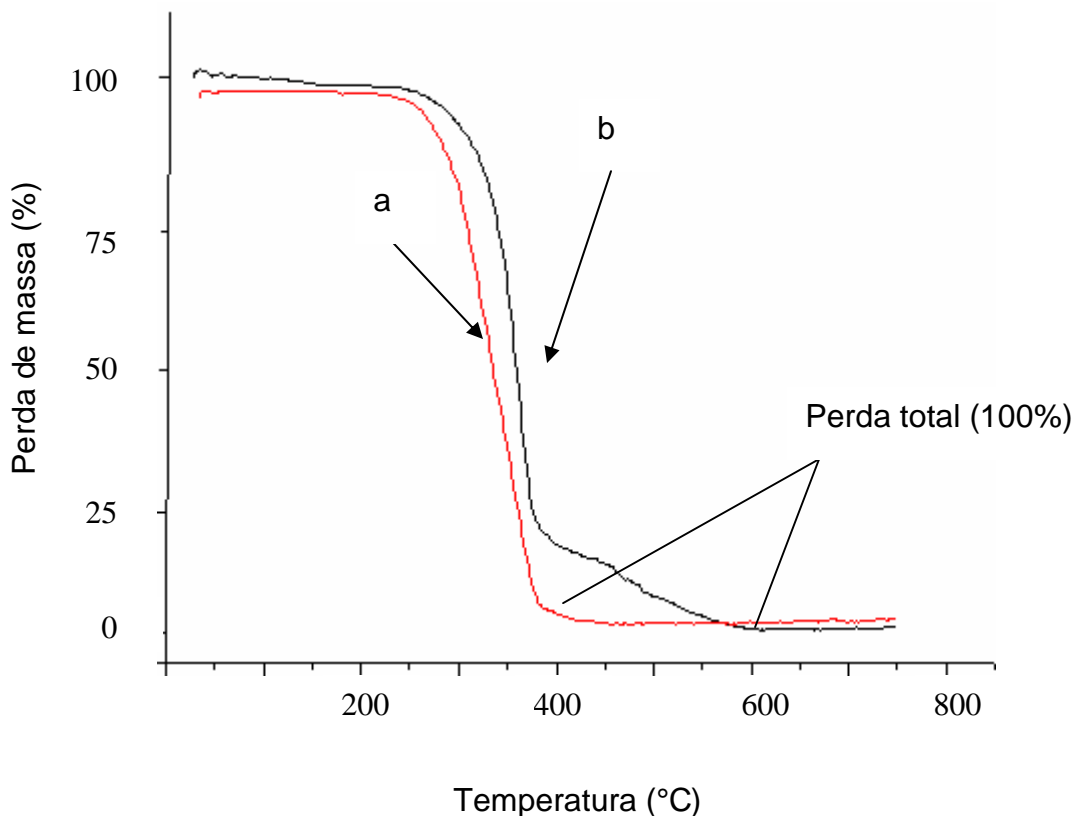


FIGURA 32: Curvas de TG das amostras: (a) CsA L e (b) PLGA 75:25 L.

Analisando as curvas de TG do PLGA 75:25 L (a) observa-se a decomposição térmica em apenas um evento térmico que ocorreu a partir de 247°C e perda total (100%) em 378°C. Já as curvas TG da CsA L (b) mostraram perda de massa inicial em 254°C e perda de 100% em 600°C.

As curvas apresentadas na Figura 32 mostram que o início da degradação de ambos os constituintes, polímero e fármaco, acontece em temperaturas superiores à aplicada para o preparo dos implantes, os quais começam a degradar apenas quando submetidos ao aquecimento acima de 250°C. Uma vez que foi utilizado gás inerte para a obtenção das curvas TG, o comportamento das amostras deve ser avaliado quanto à oxidação em presença de ar atmosférico.

Pode-se afirmar, por meio do emprego da TG, que o método de preparo dos implantes não interfere na estabilidade térmica do polímero e do fármaco.

5.5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

Com a finalidade de avaliar possíveis interações entre os componentes dos sistemas desenvolvidos, a análise em triplicata das transições endotérmicas características do *PLGA 75:25 L*, *CsA L*, das microesferas sem fármaco (MEB) e das formas associadas, ML e ME foi realizada (Figura 33).

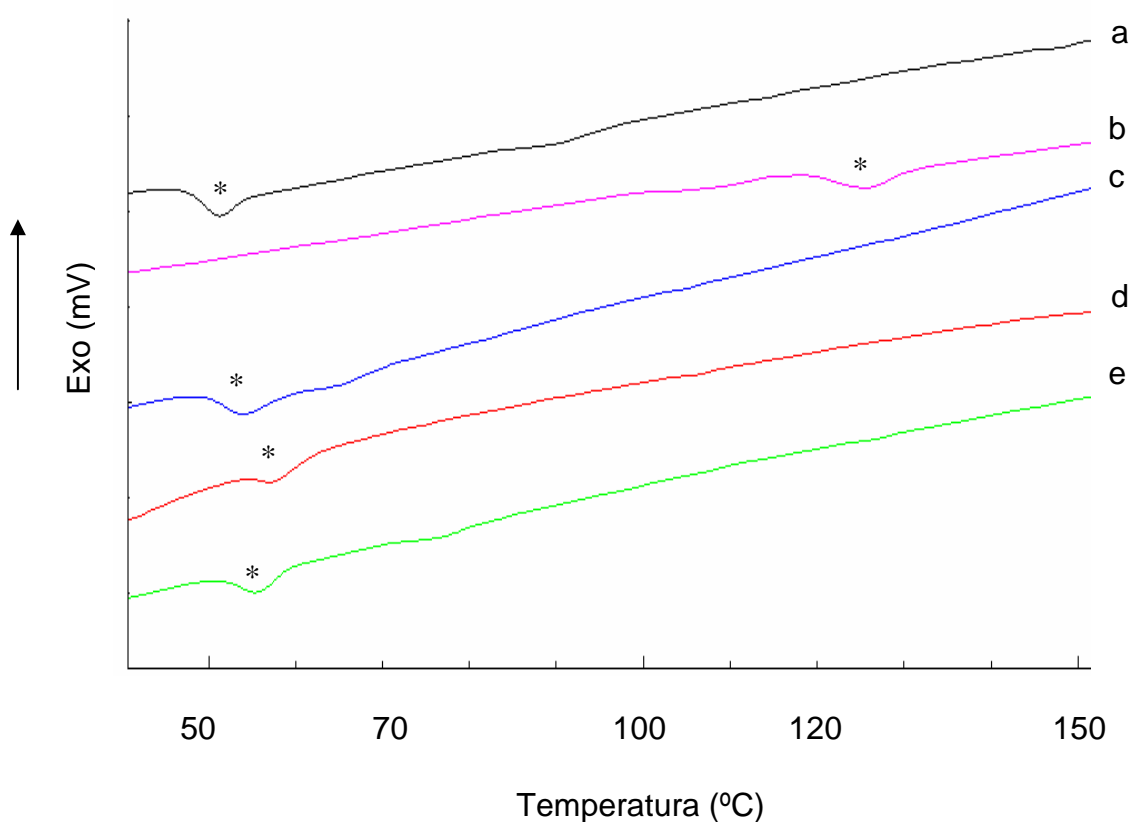


FIGURA 33: Curvas de DSC das amostras: (a) *PLGA L*, (b) *CsA L*, (c) *ML*, (d) *ME* e (e) *MEB*. (*) = transição vítrea do *PLGA 75:25 L* e transição de fase cristal/líquido-líquido da *CsA L*.

A partir das análises das curvas de DSC, observa-se a presença de picos endotérmicos característicos da transição vítrea do *PLGA 75:25* e da transição de fase cristal/líquido - líquido da *CsA*. Porém, não foram detectados picos exotérmicos e endotérmicos que caracterizam a recristalização e fusão dos materiais, respectivamente. Observa-se o desvio significativo de linha-base que se refere à

decomposição total das amostras, as quais apresentaram uma grande variação na sua capacidade calorífica.

A ausência de picos de recristalização nas curvas de DSC apresentadas pode ser justificada pelo estado estrutural parcialmente amorfo das amostras analisadas. Segundo Canevarolo e colaboradores (2002), materiais poliméricos amorfos não recristalizam quando submetidos a um resfriamento abaixo da sua temperatura de transição vítrea e a um aquecimento acima da mesma. Isso pode ser explicado uma vez que esses polímeros são estruturas estáveis na forma amorfa, onde as cadeias estão dispostas no espaço de forma desorganizada e com pequena mobilidade para se organizarem. Ao serem resfriados, mantêm a conformação estrutural amorfa. Quando aquecidos, não absorvem a energia fornecida para reorganizar suas cadeias. Assim, pode-se classificar o PLGA 75:25 como um material polimérico originalmente amorfo.

Semelhante aos polímeros, os fármacos também apresentam diferentes conformações de suas moléculas. Eles podem apresentar-se na forma de cristais (forma mais estável, organizada e de menor energia), na forma amorfa, caracterizada como a forma líquida (forma mais energética e menos organizada) e na forma intermediária semi-cristalina, o cristal-líquido (Stevenson et al., 2005). Acredita-se que, da mesma forma que os polímeros amorfos, fármacos que apresentam originalmente estruturas mais desorganizadas (líquido ou cristal-líquido) não apresentarão, em análises de DSC, picos exotérmicos de recristalização. Quanto à CsA, Stevenson e colaboradores (2005) afirmam que o fármaco liofilizado apresenta característica da forma intermediária cristal-líquido.

Frente ao descrito, pode-se sugerir que a ausência dos picos de recristalização está relacionada com o grande percentual amorfo da CsA e das características amorfas do PLGA 75:25, ambas as amostras obtidas pelo processo de liofilização. Sugere-se também a possibilidade da ocorrência da recristalização da parte cristalina da CsA, porém em quantidade não detectada pelas condições experimentais aplicadas.

Na análise das curvas de DSC obtidas (Figura 33) também foi observada a ausência de variação significativa da transição vítrea do polímero e não foi possível detectar a transição de fase cristal/líquido - líquido do fármaco, quando presente nas amostras ML e ME. Os valores das transições endotérmicas encontram-se apresentados no Quadro 5.

QUADRO 5

Valores das transições endotérmicas apresentadas nas curvas de DSC das amostras analisadas.

Amostras	Tg(°C)	TCLL (°C)
Ciclosporina liofilizada (CsA L)	Não apresenta	124
PLGA 75:25 liofilizado (PLGA 75:25 L)	51	Não apresenta
Mistura liofilizada PLGA: CsA (ML)	52	Não apresenta
Microesfera sem fármaco (MEB)	53	Não apresenta
Microesfera liofilizada contendo CsA (ME)	55	Não apresenta

Tg: transição vítrea para PLGA 75:25 L.

TCLL: transição de fase cristal/líquido - líquido para a CsA L.

A curva de DSC do PLGA L (a) indicou a transição vítrea do polímero na temperatura de 51°C. A mudança de fase endotérmica da transição de fase apontado pela curva de DSC da CsA L (c) foi de 124°C. Não foi observada nenhuma alteração entre a faixa de temperatura de 110°C a 190°C, embora a literatura a relate como sendo a faixa característica da fusão do fármaco (Ballesteros et al, 2003). Já as amostras ML (b), ME (d) e MEB (e), apresentaram a mudança de fase endotérmica característica da transição vítrea do polímero em 52°C, 53°C e 55°C, respectivamente.

Pode-se afirmar que os resultados apresentados estão de acordo com a literatura, uma vez que o copolímero PLGA L apresentou uma transição vítrea em aproximadamente 50°C, como citado por Lewis e colaboradores (1990) e a CsA L apresentou uma transição de fase cristal/líquido - líquido em 124°C, de acordo com a faixa de transição de fases entre 118°C a 125°C determinado para o fármaco na forma de cristal líquido (Stevenson et al., 2003).

A partir dos resultados obtidos, é possível sugerir que as amostras ML e ME, o polímero encontra-se num estado estrutural inalterado, sendo um indício da ausência de interação física entre os grupos carbonila do polímero e amida do fármaco. Além disso, como proposto pela Difração de Raios X, acredita-se que o fármaco encontra-se interiorizado entre as cadeias poliméricas de forma que não foi possível detectar sua transição de fase cristal/líquido – líquido. A ausência de detecção também pode ser devido à sensibilidade do método.

5.5.3 Espectroscopia no Infravermelho

A análise de possíveis interações químicas entre o copolímero e o fármaco pode ser viável por experimentos no infravermelho, já que cada material possui distintos grupos químicos que apresentam bandas específicas nos espectros do infravermelho. Estes grupos químicos são identificados como grupo éster para o *PLGA 75:25* e grupos amida para a *CsA*.

Segundo Stevenson e colaboradores (2003), a estrutura secundária do polipeptídeo *CsA* é identificada quando ocorrem bandas na região de 1614-1690 cm^{-1} e é característica de ligações intermoleculares beta-folhas que envolve os tripeptídeos antiparalelos [Meval^{11} - MeBmt^1 - Abu^2] e [Val^5 - MeLeu^6 - Ala^7]. Estes autores afirmam também que a região de 1614-1638 cm^{-1} define a estabilidade das ligações intermoleculares beta-folhas ocorridas no fármaco. Além disso, picos na região de 1725-1750 cm^{-1} são característicos do estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ de ligação éster e na região de 1680-1630 cm^{-1} é atribuído ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ de amidas primárias, como definido por Coates (2000).

Para identificação das bandas características do *PLGA 75:25* e da *CsA*, os espectros no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos a partir das amostras na forma de pó (*PLGA 75:25 P* e *CsA P*) (Figura 34).

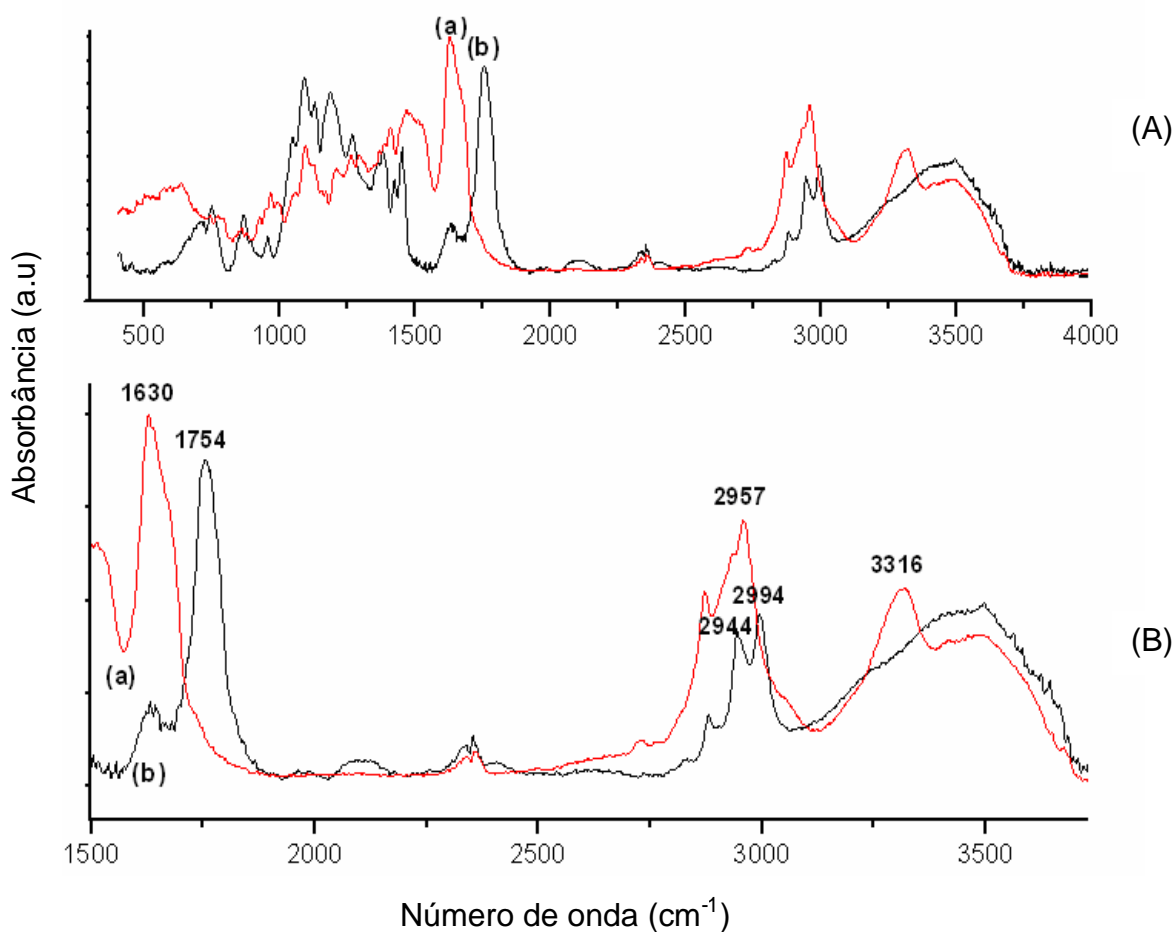


FIGURA 34: Espectroscopia no Infravermelho na região de 4000 a 650 cm^{-1} (A) e os principais picos na região de 1500 a 3500 cm^{-1} (B), das amostras (a) CsA P e (b) PLGA P.

As bandas encontradas nos espectros do copolímero e do fármaco na forma de pó e liofilizada apresentaram-se semelhantes. Estes resultados estão de acordo com os descritos na literatura (Coates, 2000). O copolímero *PLGA 75:25 P* (Figura 34b) apresenta uma banda em 1754 cm^{-1} atribuída à frequência de estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ de ésteres e as bandas em 2944 cm^{-1} e 2994 cm^{-1} atribuídas ao estiramento $\nu(\text{C}-\text{H})$ dos grupos metila presentes na molécula. O espectro da CsA P (Figura 31b) apresentou bandas em 1630 cm^{-1} atribuídas ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ de amida, resultado semelhante ao encontrado na literatura (Bertacche et al., 2006). Bandas em 2957 cm^{-1} atribuídas ao estiramento $\nu(\text{C}-\text{H})$ dos grupos metila presentes, e uma banda em 3316 cm^{-1} atribuída ao estiramento vibracional $\nu(\text{N}-\text{H})$ presente em amidas secundárias, também foram encontrados como descrito por Källkrot e colaboradores (2006).

A existência de interação química e física nos sistemas ML e ME foi avaliada por espectroscopia no infravermelho (IV) e comparada com os espectros obtidos para a mistura física de CsA e *PLGA* 75:25 na proporção de 1:10 (MF) (Figura 35).

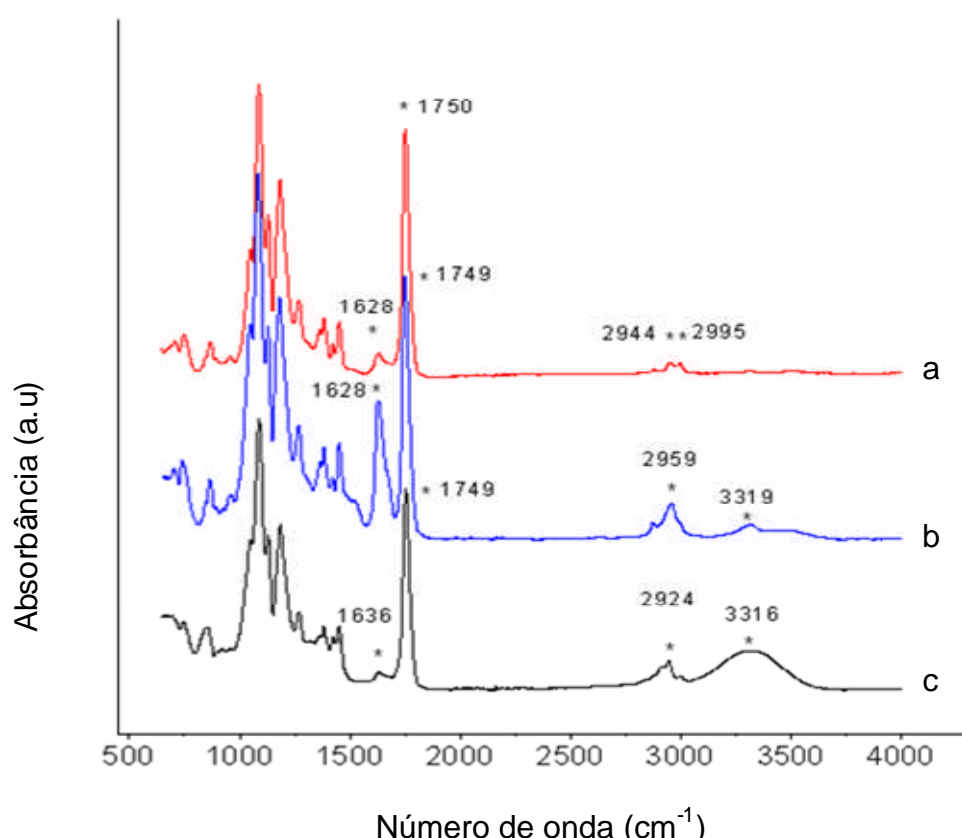


FIGURA 35: Espectroscopia no Infravermelho na região de 650 a 4000 cm^{-1} das amostras de (a) MF, (b) ML e (c) ME.

A amostra MF (a) apresentou bandas em 1628 cm^{-1} características de estriamento $\nu(\text{C}=\text{O})$ de grupo amida. As bandas encontradas em 1749 e 1750 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ de ligação éster, este último semelhante ao encontrado na literatura (Jayasuriya et al, 2006). Bandas em 2944 cm^{-1} e 2995 cm^{-1} também foram encontradas e são referentes ao estiramento $\nu(\text{C}-\text{H})$ de grupos metila. Estes resultados são semelhantes ao do espectro do copolímero *PLGA* 75:25 P (Figura 34). A inexistência de bandas na região entre 3600-3200 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{N}-\text{H})$ de amidas secundárias e a presença de bandas em 1628 cm^{-1} referentes ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ de amida, foi observada no espectro da CsA P

(Figura 34). Como a amostra é composta por pequena quantidade de fármaco, acredita-se que não foi possível detectar o sinal de estiramento de amidas secundárias.

Os espectros da amostra ML (b) e ME (c), além de apresentarem bandas típicas da CsA (1628 cm^{-1} e 1636 cm^{-1}) e do copolímero *PLGA 75:25* (1749 cm^{-1}), apresentaram também bandas do modo estiramento $\nu(\text{C-H})$ em 2959 cm^{-1} e em 2924 cm^{-1} , diferentemente da encontrada no *PLGA 75:25 P*. A intensificação do sinal do modo estiramento $\nu(\text{N-H})$ em 3319 cm^{-1} e em 3316 cm^{-1} foi observado ao comparar com as bandas obtidas no espectro da MF.

As bandas características dos grupos químicos descritas na literatura e as bandas observadas experimentalmente estão resumidas no Quadro 6 e 7, respectivamente.

QUADRO 6

Valores das bandas de absorção no IV dos grupos químicos segundo a literatura.

Grupo químico	Bandas (cm^{-1})	Referência da literatura
Estiramento $\nu(\text{C=O})$ de ligação éster	$1725\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$	Coates et al. (2000)
Estiramento $\nu(\text{C=O})$ de amida primária	1680-1630	Coates et al. (2000)
Estiramento $\nu(\text{C=O})$ de estrutura secundária por ligações intermoleculares do tipo beta-folhas	1690-1614	Stevenson et al. (2003)
Estiramento $\nu(\text{C-H})$	$2900\text{-}2880\text{ cm}^{-1}$	Coates et al. (2000)
Estiramento $\nu(\text{N-H})$ de amida secundária	$3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$	Källkrot et al. (2005)

QUADRO 7

Valores das bandas de absorção no IV observadas experimentalmente

Amostra	Banda (cm ⁻¹) observada	Resultados
MF	1628	Banda inalterada*
	2995 / 2944	Bandas inalteradas*
ML	1628	Bandas inalteradas**
	2959	Deslocamento de banda**
	3319	Intensificação ou existência da banda**
ME	1636	Bandas inalteradas*
	2924	Deslocamento de banda**
	3316	Intensificação da banda**

* Comparação com *PLGA 75:25 L* e ** Comparação com *ML*.

O aparecimento de bandas típicas inalteradas de estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ de éster e de $\nu(\text{N}-\text{H})$ de amida primária demonstra que os grupos ésteres e grupos amidas mantiveram sua estrutura conformacional e composicional inalterada, caracterizando a não ocorrência de interação química (Quadro 7). Além disso, as bandas inalteradas de estiramento $\nu(\text{C}-\text{H})$ de amida primária é um forte indício de integridade das ligações intermoleculares do tipo beta-folhas existente no fármaco, estas responsáveis pela estrutura tridimensional do fármaco e conseqüentemente por sua ação farmacológica (Stevenson et al., 2003). A ausência de detectável interação física e química entre os componentes da MF foi observada, resultado similar às amostras ML e ME.

Apesar da presença do deslocamento das bandas características de estiramento $\nu(\text{N}-\text{H})$ nas amostras ML e ME, este não foi atribuído como resultado de interações físicas entre os constituintes. Acredita-se que estes deslocamentos estão relacionados com uma provável alteração na conformação da molécula de CsA por meio de interações hidrofóbicas na interface polímero e fármaco, objetivando a obtenção de um sistema termodinamicamente estável.

5.6 Estudo de liberação *in vitro* e caracterização morfológica dos implantes intra-oculares contendo CsA

5.6.1 Análise do perfil preliminar de liberação do fármaco

O estudo de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos implantes obtidos pelos dois métodos, ML e ME, foram realizados para determinar a taxa de liberação do fármaco. A metodologia fundamenta-se na tentativa de simular, em ambiente laboratorial, o meio fisiológico em que os sistemas serão aplicados, para tanto foram adotadas as seguintes condições de experimento: 2,0 mL de TS, temperatura de 37°C e agitação equivalente a 30 rpm.

O perfil de liberação obtido neste estudo na forma de porcentagem acumulada de liberação do fármaco em relação ao tempo de incubação, encontra-se representado na Figura 36. Os valores médios da liberação de CsA obtidos nos diferentes tempos de incubação dos implantes estão apresentados na tabela 10.

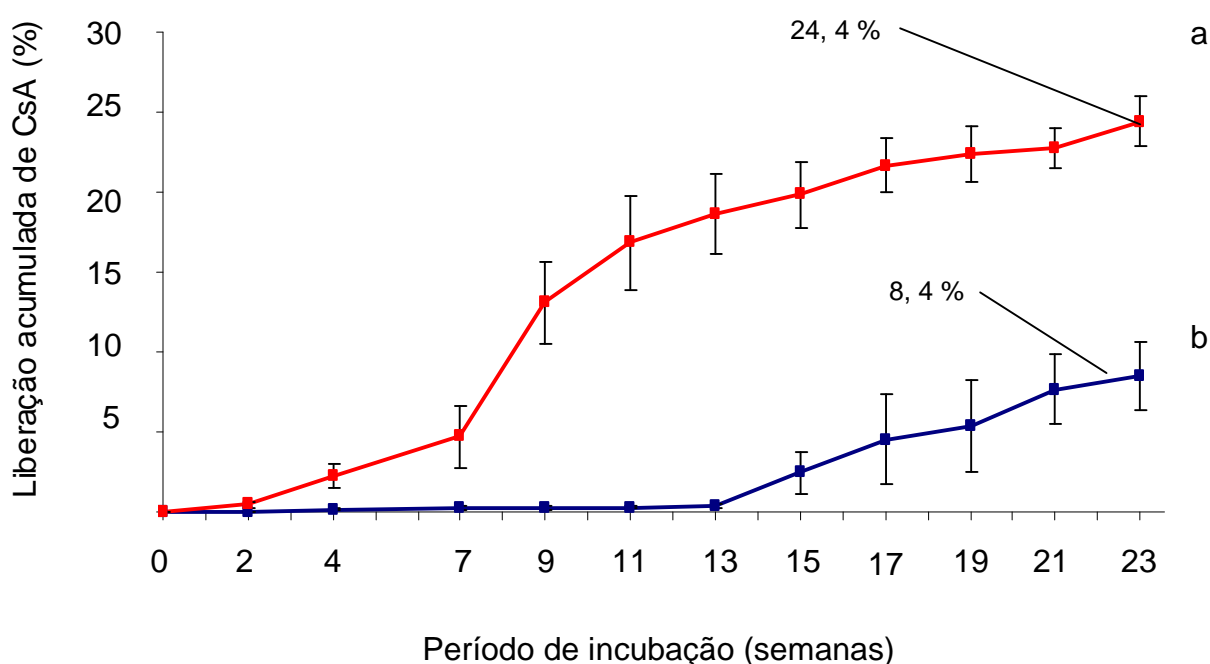


FIGURA 36: Perfis preliminares de liberação da CsA dos implantes ME (a) e ML (b).

TABELA 7

Valores médios da porcentagem de liberação acumulada de CsA obtidos nos diferentes tempos de incubação dos implantes

Semanas	Implante obtido por mistura liofilizada (ML)	Implante obtido por microesfera (ME)
	Média ± DP (%) (n=3)	Média ± DP (%) (n=3)
2	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,2
4	0,2 ± 0,1	2,3 ± 0,8
7	0,3 ± 0,3	4,7 ± 2,0
9	0,3 ± 0,1	13,1 ± 2,6
11	0,3 ± 0,2	16,9 ± 3,0
13	0,3 ± 0,1	18,7 ± 2,6
15	2,4 ± 1,4	19,8 ± 2,1
17	4,6 ± 2,8	21,7 ± 1,7
19	5,4 ± 2,9	22,4 ± 1,8
21	7,7 ± 2,2	22,7 ± 1,3
23	8,5 ± 2,6	24,4 ± 1,6

Nesta avaliação preliminar, a taxa de liberação acumulada de CsA foi de aproximadamente 8,5% e 24,4% durante 23 semanas de experimento para ML e ME, respectivamente.

O perfil de liberação da CsA a partir dos implantes ME apresentaram um perfil crescente em todo o período de incubação (Figura 36 a) com respectivos valores de desvio padrão (tabela 10). Nos primeiros 9 semanas, observou-se que a porcentagem de liberação acumulada da CsA quintuplicou entre 2-4 semanas (0,4% para 2,3%), duplicou entre 4-7 semanas (2,3% para 4,7%) e triplicou entre 7-9 semanas (4,7% para 13%). Entre 7 semanas e 21 semanas, observou-se um menor aumento da taxa de liberação acumulada que variou de aproximadamente 13,1% para 16,9% entre 9-11 semanas, 16,9% para 18,7% entre 11-13 semanas, 18,7% para 19,8% entre 13-15 semanas, de 19,8% para 21,7% entre 15-17 semanas, de 21,7% para 22,4% entre 17-19 semanas, de 22,4% para 22,7% entre 19-21

semanas e de 22,7% para 24,4% entre 21-23 semanas (tabela 5) e desvio padrão significativo entre 7 e 23 semanas (tabela 10).

Até os primeiros 13 semanas, observou-se a constante liberação de CsA a partir dos implantes ML (Figura 36 b) de aproximadamente 0,3%, com um aumento da taxa de 0,0% para 0,2% entre 2-4 semanas, de 0,2% para 0,3% de 4-7 semanas, entre 7-13 semanas ocorre a liberação constante de 0,3%, quintuplicou entre 13-15 semanas (0,3% para 2,4%), duplicou entre 15-17 semanas (2,4% para 4,6%). Entre 17 semanas e 23 semanas, a taxa porcentual de liberação acumulada variou de aproximadamente 4,6% para 5,4% entre 17-19 semanas, 5,4% para 7,7% entre 19-21 semanas e 7,7 para 8,5% entre 21-23 semanas (tabela 10). Um aumento da porcentagem de liberação acumulada do fármaco e desvio padrão significativo entre as amostras foi observado entre 15 e 23 semanas.

Observa-se que a liberação do fármaco está relacionada com a característica do próprio sistema e acontece devido às diversas alterações que ocorrem nos materiais (Kunou et al., 1995). Em geral, os perfis de liberação de diversos fármacos a partir de implantes poliméricos possuem três etapas de liberação (Kunou et al., 1995; Kunou et al., 2000; Yasukawa et al., 2001): a primeira etapa consiste de uma alta taxa de liberação do fármaco, conhecida como “burst” inicial, possivelmente devido à presença do fármaco na superfície do sistema (Yasukawa et al., 2001); a segunda etapa acontece por difusão do fármaco da matriz para o meio externo antes mesmo de ocorrer a erosão da matriz polimérica e está relacionada com o coeficiente de difusão, saturação do meio de incubação e à concentração de fármaco nos sistemas; a terceira fase corresponde a um repentino “burst” devido ao intumescimento e desintegração da matriz propriamente dita (Kunou et al., 1995).

Os perfis de liberação observados na Figura 36 a partir dos implantes ME (Figura 36 a) e ML (Figura 36 b) não apresentaram “burst” inicial como relatado na literatura. Este comportamento é devido provavelmente à ausência de fármaco adsorvida na superfície dos sistemas ou até mesmo à existência, porém em quantidade inferior à capacidade de quantificação do método adotado.

Os perfis preliminares de liberação acumulado do fármaco até as 23 semanas de ambos os implantes (figura 36 a e 36 b) apresentam apenas o perfil característico da etapa secundária definida por diversos autores.

A existência da etapa secundária pode ser confirmada quando se analisa a massa restante dos implantes intra-oculares e a quantidade de CsA presente em ambos os implantes durante os 23 semanas de incubação (Figuras 37 e 38).

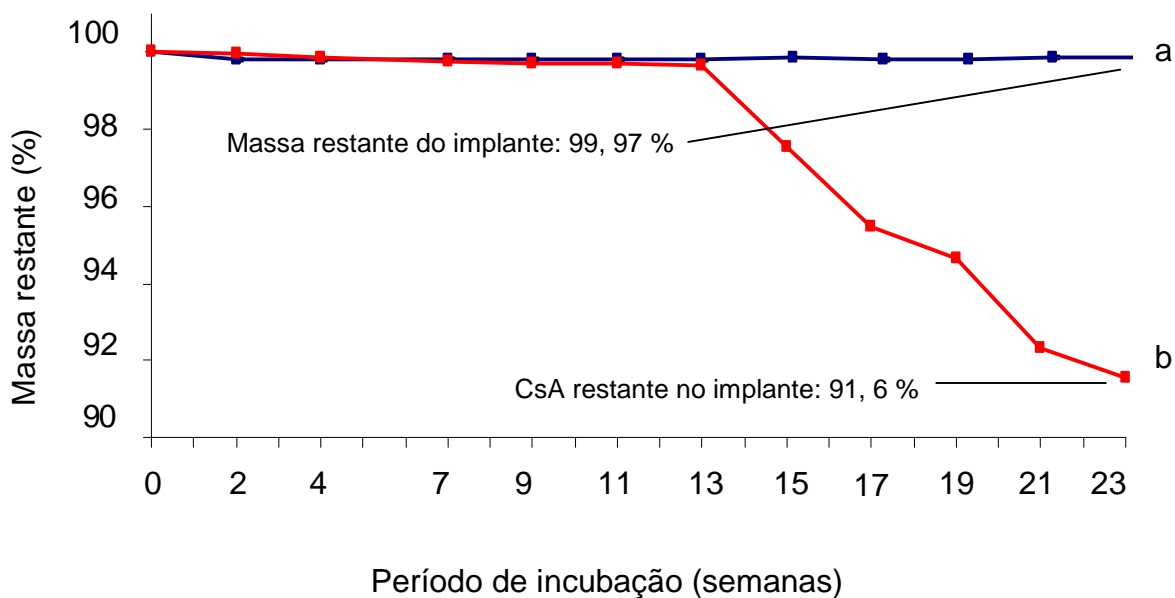


FIGURA 37: Massa restante dos implantes ML (a) e a quantidade de CsA presente no implante (b) durante os 23 semanas de incubação.

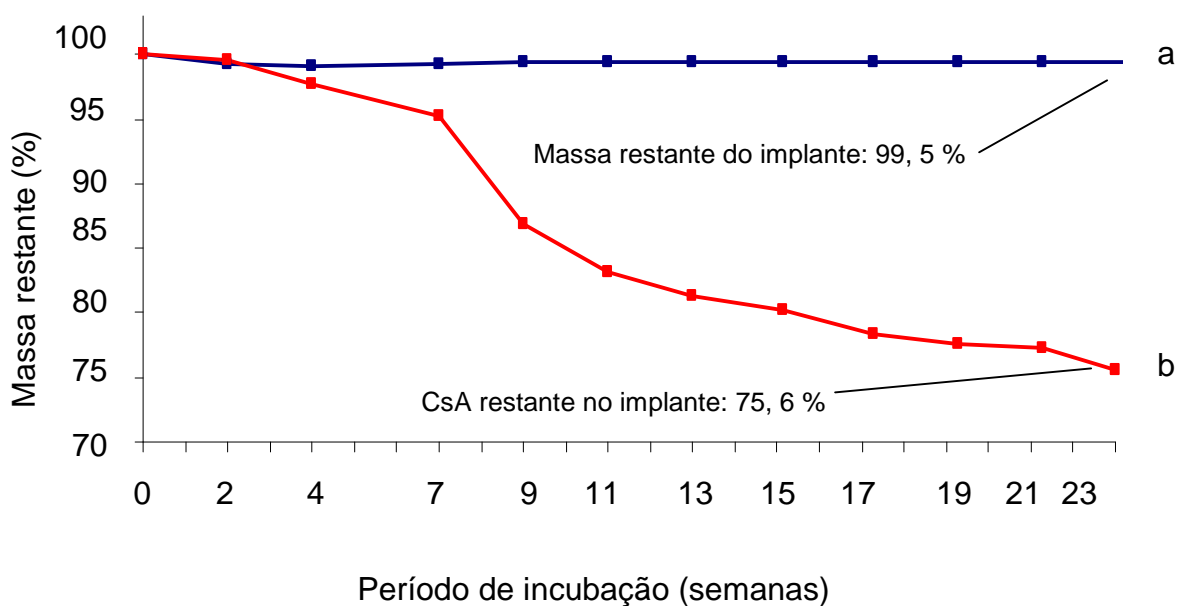


FIGURA 38: Massa restante dos implantes ME (a) e a quantidade de CsA presente no implante (b) durante os 23 semanas de incubação.

As figuras 37 e 38 mostram que a liberação do fármaco durante os 23 semanas ocorre sem perda significativa de massa dos implantes, valores obtidos de 0,13% para o implante obtido a partir da ML e de 0,5% para o implante obtido a partir do ME. Estes valores não estão de acordo com o teor de CsA liberado de 8,5% e 24,4%, respectivamente. Pode-se sugerir que a liberação esteja relacionada primeiramente com o intumescimento da matriz polimérica, seguido da difusão do fármaco pela matriz e do início da degradação do polímero. O intumescimento ou inchamento ocorre quando a água presente no meio de incubação penetra no sistema pela superfície da matriz polimérica hidrofílica, denominada hidrogel. Esse processo possibilita a difusão da CsA pelos espaços aquosos originados entre as cadeias poliméricas da matriz. O contato da água com a superfície da matriz também desencadeia pequenas hidrólises poliméricas, que até então não interferem de forma significativa na liberação do fármaco.

A liberação de CsA a partir do ML apresentou, como descrito por Kunou e colaboradores (1995), um perfil de liberação lento, regulada pela difusão do fármaco pela matriz compacta. Já para o ME, foi observado um aumento significativo na taxa acumulada de liberação da CsA. Supõe-se que o perfil de liberação apresentado para o implante ME é consequência da presença de CsA livre na matriz do implante, esta responsável pelo perfil bem diferente do esperado. Sugere-se que o processo de moldagem a quente pode ter desestruturado as microesferas formadas e disponibilizado, no meio matricial polimérico, o fármaco na forma livre ou não incorporado na matriz das microesferas.

Ainda na etapa secundária, observa-se um aumento significativo na liberação da CsA a partir dos 7 semanas para o implante ME e 13 semanas para o implante ML. Entre os intervalos determinados, a taxa percentual de liberação de ambos os implantes aumenta de forma semelhante, provavelmente devido ao homogêneo intumescimento de partes mais internas da matriz e consequente formação de maior quantidade de canais aquosos que facilitam a saída do fármaco. Quanto à maior taxa de liberação observada para os implantes ME, sugere-se que a obtenção de diferentes morfologias para cada implante pode ter influenciado na distinta taxa de liberação do fármaco observada.

Quanto ao desvio padrão apresentado entre os resultados de liberação das três diferentes amostras de implantes ME, acredita-se que os distintos desvios

padrões estão relacionados com diferentes aspectos morfológicos da superfície obtido ao preparar esses sistemas.

Resumidamente, é possível afirmar que os perfis preliminares de liberação acumulada do fármaco até as 23 semanas de ambos os implantes apresentaram o perfil de liberação característico de sistemas de liberação prolongada (SLP) e apenas a etapa secundária do perfil de liberação ocorreu e que, analisando os perfis preliminares obtidos, não foi possível detectar de forma significativa as etapas de hidrólise definida por Merkli e colaboradores (1998) e a erosão superficial descritas por Göpferich e colaboradores (1996).

A caracterização físico-química dos sistemas e a metodologia de quantificação adotada neste trabalho permitem compreender algumas características dos perfis preliminares de liberação obtidos. A ausência de detectável interação entre o polímero e o fármaco e a adequada quantificação da CsA por CLAE indicam a estabilidade da molécula de CsA tanto nos sistemas desenvolvidos quanto no meio de incubação avaliado, característica que valida os implantes como sendo sistemas possíveis de disponibilizar o fármaco na sua estrutura ativa. Quanto ao estado estrutural dos materiais presentes nos implantes, acredita-se que este pouco interfere na velocidade de liberação do fármaco durante os 161 dias, como descrito por Göpferich (1996) e Hasirci et al. (2001). Uma vez que a liberação é praticamente dependente da difusão do fármaco da matriz e não de processos erosivos, sugere-se que a matriz polimérica se encontra no estado amorfo praticamente inalterado, característica também responsável pelo aumento da porcentagem de liberação do fármaco no período avaliado. A fim de confirmar a relação entre o estado cristalino e o perfil de liberação, propõe-se ainda realizar análises da cristalinidade dos implantes ao longo do teste de liberação *in vitro*.

Neste trabalho, a realização dos testes preliminares de liberação *in vitro* objetivou reproduzir algumas condições encontradas no corpo vítreo, não sendo a preocupação atual do trabalho em satisfazer as condições SINK, já que a quantidade total liberada nos intervalos de coleta do meio de incubação apresentou concentrações abaixo da saturação do fármaco no meio aquoso que ocorre na concentração de 40 µg/mL.

Embora o estudo de liberação seja apenas completo quando a liberação do fármaco é totalizada, foi decidido apresentar os perfis preliminares obtidos nos teste de liberação *in vitro*, uma vez que é esperada a degradação total deste tipo de

polímero por um tempo além do permitido para um trabalho de mestrado. Uma vez que o estudo de liberação é considerado completo apenas quando a liberação do fármaco é totalizada, a liberação *in vitro* ainda continua a ser realizada objetivando a obtenção futura dos perfis de liberação, no sentido de se completar o estudo apresentado neste trabalho.

5.6.2 Análise morfológica dos implantes por Microscopia Eletrônica de Varredura

A realização da análise morfológica pode esclarecer os aspectos superficiais dos implantes desenvolvidos e possibilitar uma avaliação, quanto ao aspecto morfológico dos diferentes perfis de liberação observados para cada sistema.

A diferença entre os perfis de liberação da CsA a partir de ambos os implantes também pode ser explicada pelos distintos aspectos morfológicos verificados por MEV (Figuras 39 e 40).

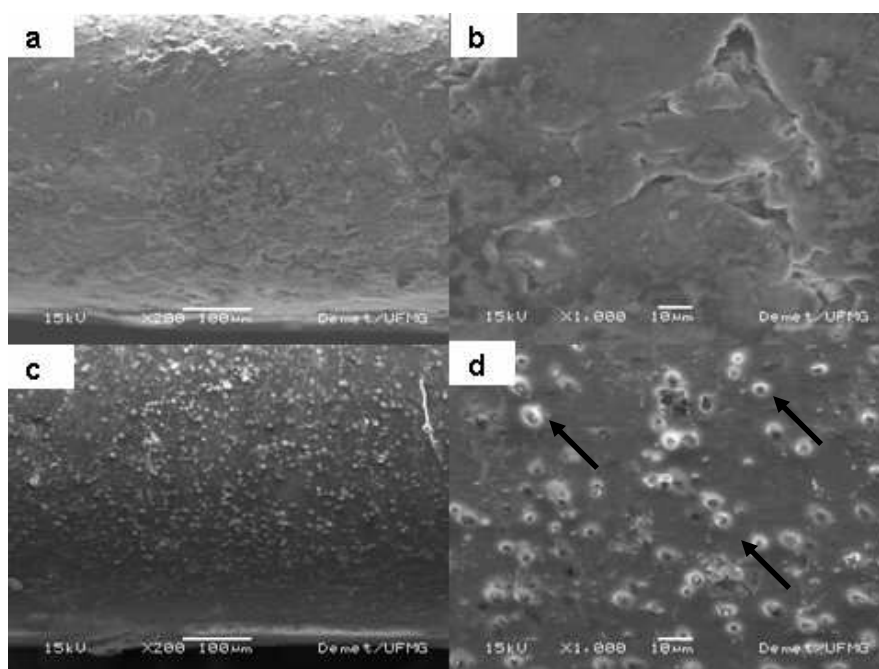


FIGURA 39: Fotografia de MEV dos implantes obtidos a partir da ML em aumentos de 200 vezes (a,c) e 1000 vezes (b,d): antes da incubação (a,b); 7 dias após o início da incubação (c,d).

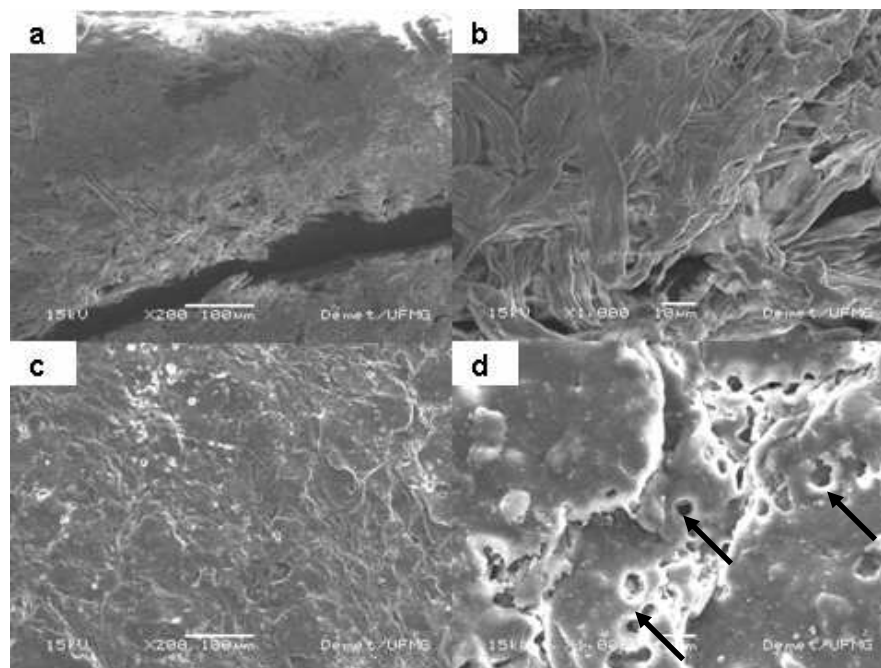


FIGURA 40: Fotografia de MEV dos implantes obtidos a partir da ME em aumentos de 200 vezes (a, c) e 1000 vezes (b,d): antes da incubação (a,b); 7 dias após o início da incubação (c,d).

As superfícies dos implantes obtidos a partir da ML (Figura 39) apresentaram-se morfologicamente homogêneas antes da incubação (Figuras 39a e 39b). Após sete dias de incubação (Figura 39c e 39d), apresentaram na sua superfície poros homogeneamente dispersos na forma de cones, caracterizando uma degradação externa.

Os implantes obtidos a partir da ME apresentaram uma superfície heterogênea, reticular antes da incubação no teste de liberação *in vitro* (Figuras 40a e 40b). Após sete dias de incubação, a superfície apresentou poros irregulares e um distinto perfil de liberação, comportamento bem diferente dos implantes obtidos a partir da ML (Figuras 40c e 40d).

A observação da presença de poros (Figuras 39 e 40) sugere a ocorrência da hidrólise do tipo III e da erosão superficial da matriz polimérica, mesmo esta não sendo a principal responsável pela difusão do fármaco. Em adição, ainda confirmam a proposta da existência de diferentes aspectos morfológicos obtidos pelo método de moldagem dos implantes e a sua interferência nas distintas taxas de liberação da CsA apresentadas pelos perfis preliminares de liberação *in vitro* para o ML e ME.

Complementando as discussões realizadas quanto às etapas de liberação do fármaco, observadas no teste preliminar de liberação *in vitro*, propõe-se que os

implantes obtidos a partir da ML, apresentaram um lento perfil de liberação da CsA também devido à superfície homogênea, indicativo de uma boa dispersão do fármaco na matriz polimérica (Figura 39). A maior taxa de liberação apresentada para os implantes intra-oculares obtidos a partir da ME pode ser justificada pela rede polimérica heterogênea e reticulada encontrada. Acredita-se que a presença das fendas na rede polimérica facilita a entrada da água nos espaços presentes entre as microesferas e, conseqüentemente, proporciona um maior intumescimento do polímero e uma maior liberação de CsA (Figura 40).

Ainda, acredita-se que as distintas área e espessura apresentadas pelos implantes intra-oculares desenvolvidos interferem nos perfis de liberação observados. Quanto maior a área e menor espessura do sistema, maior a superfície de contato entre a matriz polimérica e maior facilidade de difusão do fármaco pela matriz polimérica para o meio externo. Assim, a maior área e menor espessura do implante obtido a partir da ME provavelmente possibilitou uma maior liberação da CsA quando comparado com a taxa de liberação do fármaco pelo implante intra-ocular obtido a partir da ML que apresentou uma menor área e uma maior espessura.

A fim de ilustrar as discussões apresentadas e as expectativas quanto ao estudo finalizado dos perfis de liberação do fármaco a partir dos sistemas poliméricos produzidos, propôs-se esquematizar as etapas secundária e terciária, esta última caracterizada pela erosão superficial de cada implante (Figura 41).

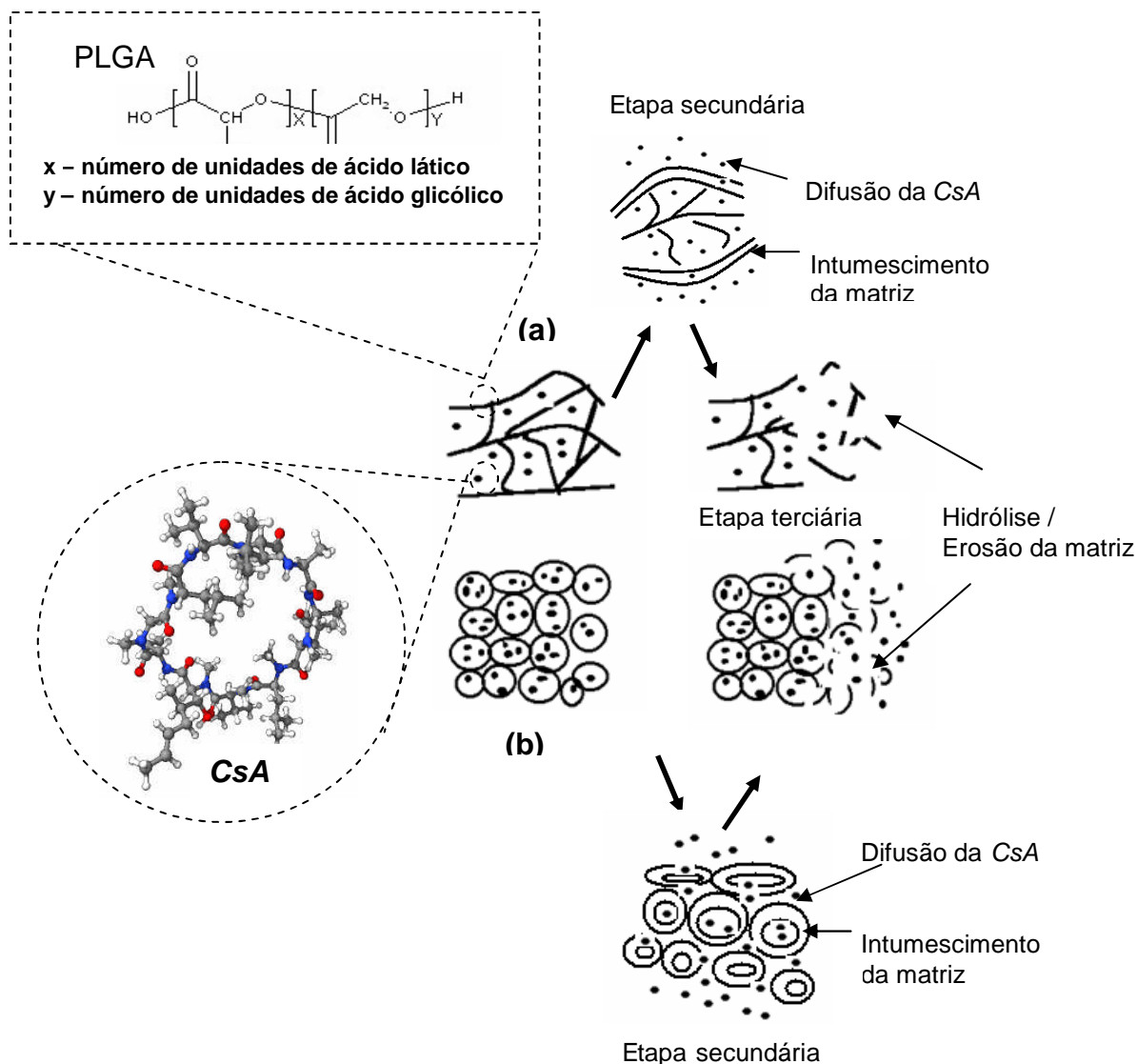


Figura 41: Proposta esquemática da biodegradação e erosão da matriz polimérica, seguido da liberação da CsA: (a) implantes obtidos a partir da mistura liofilizada e (b) implantes obtidos a partir da microesfera.

A Figura 41 representa a morfologia homogênea e compacta dos implantes obtidos por ML (41a), a presença de espaços entre as esferas poliméricas das microesferas moldadas (41b) e a liberação do fármaco decorrente das etapas de alteração esperadas para ambos os implantes intra-oculares: o intumescimento da matriz, a entrada de água, o início da hidrólise polimérica e a erosão superficial.

Em resumo, a parte experimental deste trabalho permitiu: 1) validar a metodologia adotada para quantificação da CsA presente nos implantes e durante o teste de liberação *in vitro*, 2) desenvolver os sistemas sólidos à base do copolímero derivado do ácido láctico e glicólico (PLGA 75:25), 3) caracterizar a CsA e o PLGA 75:25 presentes nos sistemas obtidos por meio de técnicas de caracterização

térmica (TG, DSC), constitucional (IV), conformacional (DRX) e morfológica (MEV) e 4) avaliar o perfil preliminar de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos sistemas obtidos.

Os resultados obtidos neste trabalho viabilizam a utilização dos implantes desenvolvidos para tratamento da uveíte posterior já que foi possível obter sistemas por meio de métodos reprodutíveis que disponibilizam o fármaco na forma dispersa em ambas as matrizes poliméricas e na sua forma biologicamente ativa. Em adição, o trabalho mostrou a possibilidade de quantificação de pequenas quantidades da CsA em meio aquoso pelo método analítico Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao detector UV (CL/UV), um método analítico pouco sensível para a detecção do fármaco frente às técnicas de imunensaio e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à espectroscopia de massa (CL/MS) e a técnica de imunensaio.

Quanto ao perfil preliminar de liberação *in vitro* foi possível mostrar a liberação acumulada da CsA em concentrações mínimas de 200 ng/mL, concentrações próximas às encontradas por Dong e colaboradores (2006) ao avaliar a capacidade de inibir processos inflamatórios na cavidade vítrea quando o fármaco é disponibilizado em um sistema polimérico constituído do copolímero sintético ácido láctico / ácido glicólico / ϵ - caprolactona. Além disso, foi mostrado que o fator determinante de liberação do fármaco durante as 23 semanas analisadas é dependente, principalmente, da difusão do fármaco pela matriz e da área e espessura obtida para cada implante e que a hidrólise observada ainda pouco interfere na liberação da CsA. Ainda, as técnicas de caracterização mostraram a ausência de detectáveis interações físicas e químicas entre o fármaco e o polímero, características que possibilitaram a liberação de forma prolongada do fármaco em meios laboratoriais similares às condições fisiológicas do corpo vítreo.

Uma vez necessário a liberação prolongada do fármaco na cavidade vítrea do bulbo do olho para o tratamento, em específico, da uveíte posterior, ambos os implantes aqui desenvolvidos e caracterizados apresentam-se como novos sistemas promissores para futuro tratamento da doença.

6 CONCLUSÃO

Nosso estudo permitiu a obtenção de um implante de natureza sólida a partir de dois diferentes métodos de preparo: mistura liofilizada e microesferas, ambos destinados à aplicação intra-ocular. Os estudos preliminares de liberação *in vitro* mostraram que os implantes desenvolvidos são adequados para a utilização como sistemas de liberação de CsA, onde se espera uma liberação completa do fármaco por um longo período.

Como perspectiva, pretende-se avaliar em estudos de liberação *in vivo*, a segurança e a viabilidade da utilização dos sistemas aqui desenvolvidos quanto à disponibilização de doses terapêuticas efetivas do fármaco no corpo vítreo visando o tratamento de uveíte posterior.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; MURPHY, K.M.; CHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, p. 797-793, 1996.

ABENDROTH, D. Experience with therapeutic drug monitoring of cyclosporine. **Transplantation Proceedings**, v.36, p.426-429, 2004.

ALIABADI, H. M.; BROCKS, R.D.; LAVASANIFAR, A. Polymeric micelles for the solubilization and delivery of Cyclosporine A: pharmacokinetics and biodistribution. **Biomaterials**, v. 26, p. 7251-7259, 2005a

_____; MAHMUD, A.; SHARIFABADI, A.; LAVASANIFAR, A. Micelles of poly(ethylene oxide)-b-poly(ϵ -caprolactone) as vehicles for the solubilization and controlled delivery of Cyclosporine A. **Journal of Controlled Release**, v. 104, p. 301-311, 2005b

AL-MESHAL, M.A.; KHIDR, S.H.; BAYOMI, H.A.; AL-ANGARY, A.A. Oral administration of liposomes containing cyclosporine: a pharmacokinetics study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.168, p.163-168, 1998.

ALONSO, M.J., CALVO, P., VILA-JATO, J.L., LOPEZ, M.I., LORENTE, J., PASTOR, J.C. Increased ocular corneal uptake of drugs using poly- ϵ -caprolactone nanocapsules and nanoemulsions. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM CONTROLLED RELEASE BIOACTIVE MATERIALS, 2., Seattle, 1995.

AMERICAN SOCIETY OF HEALTH SYSTEM PHARMACIST **AHFS**: drug information 2000. Bethesda: c 2000. 3546p.

ANDRYSEK, T.; JEGOROV, A.; VESELSKY, Z.; MATHA, V. Equoral, new cyclosporine drug delivery system, versus neoral: a bioequivalence study in healthy volunteers. **Transplantation Proceedings**, v.35, p.207-209, 2003.

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

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **International standards**: standard test method for transition temperatures of polymers by Differential Scanning Calorimetry (ASTM D3418). Disponível em: <http://webstore.ansi.org/RecordDetail.aspx?sku=ASTM+D3418-03>. Acesso em: 26/09/2005.

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

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

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

BALLESTEROS, D.L.; FATTAH, A.A.; STEVENSON, C.L.; BENNET, D.B. Properties and stability of a liquid crystal form of cyclosporine: the first reported naturally occurring peptide that exist as a thermotropic liquid crystal. **Journal of pharmaceutical Science**, v. 92, n. 00, 2003.

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

BERTACCHE, V.; PINI, E.; STRADI, R.; STRATTA, F. Quantitative determination of amorphous cyclosporine in crystalline cyclosporine sample by fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.95, n. 1, p. 159-166, 2006.

BERTELMANN, E.; PLEYER, U. Immunomodulatory therapy in ophthalmology: is there a place for topical application? **Ophthalmologica**, v. 218, p. 359-367, 2004.

BOINPALLY, R.R.; ZHOU, S.L.; DEVRAJ, G.; ANNE, P.K.; POONDRU, S.; JARTI, B.R. Iontophoresis of lecithin vesicles of Cyclosporine A. **International Journal of Pharmaceutics**, v.274, p.185-190, 2004.

BOREL, J.F.; FEURER, c.; GUBLER, H.V.; STAHELLIN, H. Biological effects of CsA: a new antilymphocytic agent. **Agents Actions**, v.6, p.468-475, 1976 *apud* REZZANI, R. Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 2004, p. 85-128, 2004.

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

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

CALNE, R.V.; WHITE, D.J.G. Cyclosporine A: a powerful immunosuppressant in dogs with renal allografts. **CRS Medical Science**, v.5, p.595, 1998 *apud* GRAEB, C.; ARBOGAST, H.; GUBA, M.; JAUCH, K.W.; LAND, W. Cyclosporine: 20 years of experience at the University of Munich. **Transplantation Proceedings**, v.36, p. 125-129, 2004.

CANEVAROLO, J.; SEBASTIÃO, V. **Ciência dos polímeros**: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. São Paulo: Artliber, 2002. 183 p.

COATES, J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In: MEYRES, R.A. (Ed.). **Encyclopedia of analytical chemistry**. Chincester: John Wiley & Sons, 2000. p.10815-10837.

COLTHURST, M.J.; WILLIAMS, R.L.; HISCOTT, P.S.; GRIERSON, I. Biomaterials used in the posterior segment of the eye. **Biomaterials**, v.21, p.649-665, 2000.

DICK, A.; LIVERSIDGE, J.; COPE, A.P. The role of tumour necrosis factor (TNF- α) in experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). **Progress in Retinal and Eye Research**, v.23, p.617-637, 2004.

DING, S. Recent developments in ophthalmic drug delivery. **PSIT**, v.1, n.8, p. 328-335, 1998.

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

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara -Koogan, c1997. 663p.

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

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

_____; REGO, M.G.B.; CARDILHO, J.A.; SIQUEIRA, R.B.; JORGE, R.; CUNHA, A.S. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.66, p.891-896, 2003b.

FREIBERG, S.; ZHU, X.X. Polymers microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v.282, p.1-18, 2004.

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

GÖPFERICH A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. **Biomaterials**, v.17, p.103-114, 1996.

GRAEB, C.; ARBOGAST, H.; GUBA, M.; JAUCH, K.W.; LAND, W. Cyclosporine: 20 years of experience at the University of Munich. **Transplantation Proceedings**, v.36, p. 125-129, 2004.

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

HASIRCI, V.; LEWANDROWSKI, K.; GRESSER, J.D.; WISE, D.L.; TRANTOLO, D.L. Versatility of biodegradable biopolymers : degradability and an in vivo application. **Journal of Biotechnology**, v.85, p.135-150, 2001.

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

ITALIA, J.L.; BHATT, D.K.; TIKOO, K.; KUMAR, M.N.V.R. PLGA nanoparticles for oral delivery cyclosporine: nephrotoxicity and pharmacokinetic studies in comparasion to sandimmune neoral®. **Journal of Controlled Release**, v.119, p.197-206, 2007.

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

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

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

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

JAISWAL, J.; GUPTA, S.K.; KREUTER, J. Preparation of biodegradable cyclosporine nanoparticles by high-pressure emulsification-solvent evaporation process. **Journal of Controlled Release**, v.96, p.169-178, 2004.

JANOT, Paulo. Anatomia do olho. Brasília: OftalmoJanot, 2006. Disponível em: <http://www.oftalmojanot.com.br/2006/4/18/Pagina35.htm>. Acesso em 10/04/2007.

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

JAYASURIYA, A.C.; MALAK, A.; JAYATISSA, A.H.; EBRAHEIM, N.A. Dissolution behavior of biomimetic minerals 3D PLGA scaffold. **Surface & Coatings Technology**, v.200, p.6336-6339, 2006.

JEGOROV, A.; HUSÁK, M.; KRATOCHVÍL, B.; CÍSAROVÁ, I. How many new entities can be created from one active substance? The case of cyclosporine A. **Crystal Growth & Design**, v.3, n.4, p.441-444, 2003.

KÄLLKROT, M.; EDLUND, U.; ALBERTSSON, A.C. Surface functionalization of degradable polymers by covalent grafting. **Biomaterials**, v.27, p.1788-1796, 2006.

KANAI, A.; ALBA, R.M.; TAKANO, T.; KOBAYASHI, C.; NAKAJIMA, A.; KURIHARA, K.; YOKOYAMA, K.; FUKAMI, M. The effect on the cornea of the alpha cyclodextrin vehicle for cyclosporine eye drops. **Transplantation Proceeding**, v.21, p.1-3, 1989.

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

KAUR, I.P.; GARG, A.; SINGLA, A.K.; AGGARWAL. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v.269, p.1-14, 2004.

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

KUNOU, N.; OGURA, Y.; YASUKAWA, T.; KIMURA, H.; MIYAMOTO, H.; HONDA, Y.; IKADA, Y. Long-term sustained release of ganciclovir from biodegradable scleral implant for the treatment of cytomegalovirus retinitis. **Journal of Controlled Release**, v. 68, p. 263-271, 2000.

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

_____; FURRER, P.; BAEYENS, O.F.; FABRY, M.G.; DUMONT, J.M.; BESSEGHIR, K.; GURNY, R. A novel water-soluble Cyclosporine A prodrug: ocular tolerance and in vivo kinetics. **International Journal of Pharmaceutics**, v.295, p. 7-14, 2005.

LAZAROVA, T.; CHEN, J.S.; HAMANN, B.; KANG, J.M.; TROMBINO, D.H.; HAN, F.; HOFFMANN, E.; MCCLURE, C.; ECKSTEIN, J.; OR, Y.S. Synthesis and biological evaluation of novel Cyclosporine A analogues: potential soft drugs for the treatment of autoimmune disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, p.674-676, 2003.

LEWIS, D.H. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: CHASIN, M.; LANGER, R. **Biodegradable polymers as drug delivery system**. New York: Marcel Dekker, 1990. p.01-41 *apud* FIALHO S.L., REGO, M.G.B.; CARDILHO, J.A.; SIQUEIRA, R.B.; JORGE, R.; CUNHA, A.S. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.66, p.891-896, 2003b.

LI, Y.; ZHU, K.J.; JIANG, H.L.; LIU, J.H.; HAO, Y.L.; YASUDA, H.; ICHIMARU, A.; YAMAMOTO, K. In vitro and in vivo studies of cyclosporin A-loaded microspheres based on copolymers of lactide and ϵ -caprolactone: Comparison with conventional PLGA microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v.295, p.67-76, 2005.

LIU, H.; WANG, Y.; YAO, H.; ZANG, Y. Effect of vehicles and enhancers on the topical delivery of Cyclosporin A. **International Journal of Pharmaceutics**, v.311, p.182-186, 2006.

LOO, S.C.J.; OOI, C.P.; BOEY, Y.C.F. Radiation effects on poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly (L-lactide) (PLLA). **Polymer Degradation and Stability**, v.83, p.259-265, 2004.

LOOR, F.; TIBERGHIE, F.; WENANDY, T.; DIDIER, A.; TRABER, R. Cyclosporins: structure-activity relationships for the inhibition of the human MDR1 P-glycoprotein ABC transporter. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p.4598-4612, 2002.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2001. 366 p.

MANSUR H.S. Notas de aula de caracterização de superfícies e interfaces. Curso de pós-graduação em engenharia metalúrgica e minas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Brasil, 2001.

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

MICHELSON, J.B.; NOZIK, R.A. Experimental endophthalmitis treat with an implantable osmotic minipump. **Archive of Ophthalmology**, v.97, p.1375-1346, 1979. *apud* PEYMAN, G.A.; GANIBAN, G.J. Delivery systems for intraocular routes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 107-123, 1995.

MIGUEL, JÚNIOR, Armando; CASTRO, Antônio Carlos Leitão. **Medicina geriátrica**. Disponível em <http://www.medicinageriatrica.com.br/wp-content/uploads/2007/05/olho.jpg>. Acesso em 15/05/2007.

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

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M.; MANSUR, H. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Ed. Cultura Médica, 552. p. 2006.

PARK, J.H.; YE, M.; PARK, K. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. **Molecules**, v.10, p.146-161, 2005.

PERRET OPTICIENS. **Eye pain: light sensibility**. Geneva, 2005
http://www.perretoptic.ch/optometrie/symptomes_diagnostiques/symptomes/opto_sympain_d.htm. Acesso em 03/03/2007.

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

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.5, p.447-451, 2001.

PLEYER, U., ELKINS, B., RUCKERT, D., LUTZ, S., GRAMMER, J., CHOU, J., SCHMIDT, K.H., MONDINO, B.J. Ocular absorption of Cyclosporine A from liposomes incorporated into collagen shields. **Current Eye Research**, v.13, p.177-181, 1994.

POLLARD, S.; NASHAN, B.; JOHNSTON, A.; HOYER, P.; BELITSKY, P.; KEOWN, P.; HELDERMAN, H. A pharmacokinetic and clinical review of the potential clinical impact using different formulations of cyclosporine A. **Clinical Therapeutics**, v.25, n.6, p.1654-1699, 2003.

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

REYNOLDA, J. E. F. **Martindale the extra pharmacopoeia**. 29.ed. London: Pharmaceutical Press, 1989. 1896p.

REZZANI, R. Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 2004, p. 85-128, 2004.

RODRIGUES, G.V.; MARCHETTO, O. **Análises térmicas**. Florianópolis: UFSC, Departamento de Engenharia Mecânica, 2007. Disponível em: <http://www.materiais.ufsc.br/Disciplinas/EMC5733/Apostila.pdf>. Acesso em: 07/04/2006

SAKAGUCHI, M.; SUGITA, S.; ITOH, K.; MOCHIZUKI, M. Cytokine production by T cells infiltrating in the eye of uveitis patients. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v.42, p.262-268, 1998.

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

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, c 2000. 460p.

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

STANDARD HANDBOOK OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND DESIGN. **Biomaterials**. McGraw-Hill Companies: Digital Engineering Library, 2004. Part 3. Disponível em: <http://www.digitalengineeringlibrary.com>. Acesso em: 27/08/2006.

STEVENSON, C.L.; BENNET, D.; BALLESTEROS, D.L. Pharmaceutical liquid crystal: the relevance of partially ordered systems. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 94, n. 9, p. 1861 - 1879, 2005.

_____; TAN, M.M.; BASTELLEROS, D.L. Secondary structure of cyclosporine in a spray-dried crystal by FTIR. **Journal of pharmaceutical Science**, v. 92, n. 00, 2003.

THE UNITED STATES Pharmacopeia. 24. ed. Rockville: United States Pharmacopeil Convention Inc., 2000. (NF19).

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

YASUKAWA, T.M.D.; KIMURA, H.; TABATA, Y.; OGURA, Y. Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, p. 25-36, 2001.

YANG S., PENG Y., WANG S. Immuouppressants: pharmacokinetics, methods of monitoring and role of high performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v.5, p. 405-430, 2005.

ZHOU, T.; LEWIS, H.; FOSTER, R. E.; SCHWENDEMAN, S. P. Development of a multiple-drug delivery implant for intra-ocular management of proliferativa vitreoretinopathy. **Journal of Controlled Release**, v.55, p. 281-295, 1998.

CONTRIBUIÇÕES PARA A LITERATURA

Resumos publicados em anais de congressos

SALIBA J.B., MANSUR, H. S.; CUNHA JUNIOR, A. S. Spectroscopy, Morphological and Crystallinity Investigation of the Interaction Cyc-Biodegradable Polymer Network. In: International Conference on Nanoscience and Technology-ChinaNANO2007, 2007, Beijing. **Proceedings of International Conference on Nanoscience and Technology-ChinaNANO2007**, 2007. v. 1. p. 260-260.

SALIBA J.B., YOSHIDA M.I., FARACO A.A.G., MANSUR, H. S. ; CUNHA JUNIOR, A. S.. DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF A BIODEGRADABLE INTRAOCULAR SYSTEM CONTAINING CYCLOSPORINE A FOR THE TREATMENT OF POSTERIOR UVEITIS. In: 34th Annual Meeting of the Controlled Release Society, 2007, Long Beach - California. **Program Book of 34th Annual Meeting of the Controlled Release Society, 2007**. v. 1. p. 74.

SALIBA J.B., Yoshida M.I., Faraco A.A.G., MANSUR, H. S. ; CUNHA JUNIOR, A. S. Biodegradable Intraocular Systems Containing Cyclosporine A (CyA) For The Treatment of Posterior Uveitis. In: 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP 2007), 2007, Ribeirão Preto-SP. **Proceedings of 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences** (CIFARP 2007, 2007, v. 1. p. 22-22.

JULIANA B. SALIBA, ANDRÉ A.G. FARACO, MARIA IRENE YOSHIDA, HERMAN S. MANSUR, ARMANDO DA SILVA-CUNHA. Development and characterization of an intraocular biodegradable polymer system containing cyclosporine a (CyA) for the treatment of posterior uveitis. In: II Simpósio Mineiro de Ciência dos Materiais (SMCM 2007), Ouro Preto-MG. **Revista da Física de Ouro Preto**, v.1, p.37.