



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Márcia Reus

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DE SISTEMAS
COLOIDAIS COMO CARREADORES PARA A ADMINISTRAÇÃO OCULAR DO
AGENTE ANTITUMORAL 5-FLUOROURACIL**

Florianópolis

2006

Márcia Reus

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DE SISTEMAS
COLOIDAIS COMO CARREADORES PARA A ADMINISTRAÇÃO OCULAR DO
AGENTE ANTITUMORAL 5-FLUOROURACIL**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Farmácia como
requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre em Farmácia.**

**Orientadora: Profa. Dra. Angela
Machado de Campos**

Florianópolis

2006

Àqueles que sempre estiveram ao meu lado: meus pais, Olindauro e Nedi e meus queridos irmãos, Riva e Evandro.

AGRADECIMENTOS

A colaboração de colegas e amigos para a realização de um trabalho é fundamental para que se possa alcançar os objetivos propostos. É gratificante poder compartilhar esse momento com aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho.

Agradeço em primeiro lugar à Deus, fonte de luz e coragem em meu caminho.

Carinhosamente à Prof. Dra. Angela Machado de Campos pela orientação e dedicação na elaboração deste trabalho.

Ao colega Gerson Appel, diretor da Dermus e aos diretores do Grupo Racine, Nilce Barbosa e Marco Quintão, pelas oportunidades profissionais que me proporcionam, pela amizade e incentivo na realização deste projeto.

Aos meus pais e meus irmãos, por sempre acreditarem nos meus sonhos e por me ensinarem os valores primordiais da vida.

Aos Professores Marení Rocha Farias, Mirian Falkenberg, Marco Segatto e Letícia Scherer Koester, pela colaboração ao disponibilizarem recursos dos seus laboratórios e especialmente à Professora Cláudia Maria Oliveira Simões pela grande colaboração e apoio.

Ao colega Edison Carvalho pela grande contribuição nas análises realizadas na UFRGS e na Universidade de Santiago de Compostela.

Ao Sr. Gilson e Sra. Eliete Schmitt, diretores do Frigorífico Antônio Carlos, pela doação das córneas de porcos utilizadas nesse estudo.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Farmacêuticas, principalmente Sandra, Nilson, Solange e Cláudia pela atenção, carinho e amizade compartilhados durante a realização do trabalho.

Às queridas amigas do Laboratório de Farmacotécnica: Françoise, Taty, Juliana, Tati Sartori, Andréa e Geci pela parceria, colaboração, companheirismo e alegrias compartilhadas nesta caminhada.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia, especialmente Roberto e Andressa e do Laboratório de Controle de Qualidade Talize, Fábio e Ariane, pela colaboração e amizade.

Às grandes amigas Dra. Silvia Santos, Caroline Vanessa, Viviane Rodrigues, Roselene Kroth e Paula Macedo, por estarem ao meu lado nas diversas etapas desse trabalho.

Um agradecimento especial a Mário Nelson Alves Júnior, pelo seu carinho, compreensão e colaboração em muitos momentos.

*O olho é o senhor da astronomia e o autor da cosmografia; ele desvenda e corrige toda a arte da humanidade; conduz os homens às partes mais distantes do mundo...
...que povos, que línguas poderão descrever completamente sua função? O olho é a janela do corpo humano pela qual ele abre os caminhos e se deleita com a beleza do mundo.*

(Leonardo Da Vinci, 1452-1519)

RESUMO

O potencial das nanopartículas poliméricas em aumentar as oportunidades de absorção corneal após a administração tópica na superfície ocular têm sido alvo de intensas pesquisas nos últimos anos. Nesse sentido, as vantagens do recobrimento destes sistemas com polímeros catiônicos mucoadesivos também têm sido investigadas. Neste estudo, com o objetivo de avaliar a interação com a córnea e a passagem transcorneal do agente antitumoral 5-fluorouracil (5-FU) nanoencapsulado, nanoesferas de poli- ϵ -caprolactona (PECL) e poli- ϵ -caprolactona recoberta com quitosana (PECL-CS) foram preparadas. As nanoesferas foram obtidas pela técnica da dupla emulsão (a/o/a)/evaporação do solvente, sob agitação ultrassônica. A caracterização físico-química do sistema foi efetuada, sendo avaliados o potencial zeta e o diâmetro médio das partículas. Ambas as formulações PECL e PECL/CS obtiveram tamanho nanométrico e potencial zeta - 19 e + 60 mV, respectivamente. A eficiência de encapsulação do 5-FU foi determinada por espectrofotometria de absorção no ultravioleta (UV) a 260 nm e os resultados obtidos foram da ordem de 59 e 66% para PECL e PECL/CS, respectivamente. O estudo de cinética de liberação do 5-FU *in vitro* demonstrou a influência do recobrimento das nanopartículas com a quitosana sobre o perfil de liberação, sendo 60 % do fármaco liberado ao longo das 12 horas de estudo, a partir da formulação revestida com quitosana. As nanopartículas não recobertas, por sua vez, apresentaram uma liberação de 95 % do 5-FU em 120 minutos. Na avaliação da interação das nanopartículas com os componentes do muco ocular, as características mucoadesivas da quitosana foram demonstradas a partir da modificação na viscosidade de uma dispersão de mucina após incubação com a formulação contendo o biopolímero. Na determinação da estabilidade destes sistemas frente a lisozima, uma agregação das nanopartículas sem quitosana foi demonstrada a partir de alterações ocorridas no diâmetro médio e índice de polidispersão das partículas, após incubação com a enzima. Na avaliação *ex vivo* da retenção do 5-FU livre e nanoencapsulado em córneas de porco, um método de extração do 5-FU foi desenvolvido, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência para quantificar o fármaco retido no tecido corneal. Os resultados obtidos no estudo *ex vivo* em células de difusão foram superiores para os sistemas dispersos em relação à solução de fármaco livre. Porém, quando comparadas as duas formulações de nanopartículas, aquelas recobertas com quitosana demonstraram um aumento significativo na quantidade de fármaco retido na córnea ($p < 0,05$). No doseamento do 5-FU permeado através da córnea não foi detectada a presença de fármaco liberado a partir das formulações de nanoesferas. Esses resultados sugerem que as nanopartículas de PECL e PECL/CS apresentam um potencial para a liberação de fármacos na mucosa ocular e representam uma alternativa promissora no tratamento de patologias extra-oculares.

Palavras-chave: nanopartículas; 5-FU; quitosana; poli- ϵ -caprolactona; ocular; sistema de liberação.

ABSTRACT

Development and biopharmaceutical evaluation of colloidal systems as carriers for the ocular administration of the antitumoral agent 5 fluorouracil

The potential of polymeric nanoparticles for enhancing corneal absorption after the administration of ocular drugs has been the focus of intense research in the last years. Thus, the advantages of coating these systems with mucoadhesive cationic polymers have also been researched. In this study, in order to evaluate the interaction with the cornea and the transcorneal penetration of the nanoencapsulated antitumoral agent, 5-fluorouracil (5-FU), nanospheres of poly- ϵ -caprolactone (PECL) and poly- ϵ -caprolactone coated with chitosan (PECL-CS) were prepared. The nanospheres were obtained by a double emulsion (a/o/a)/ solvent evaporation technique, under ultrasonic stirring. A physical-chemical characterization of the system was carried out, with both zeta potential and mean diameter of the particles being measured. Both PECL and PECL/CS formulations presented nanometric size and zeta potential of -19 and +60 mV, respectively. The encapsulation efficiency of the 5-FU was determined by ultraviolet absorption spectrophotometry at 260 nm and the results obtained were around 59 and 66% for PECL and PECL/CS, respectively. The study of the *in vitro* release kinetics of 5-FU demonstrated the influence of coating nanoparticles with chitosan on the release profile, with 60% of the drug being released throughout the 12 hour study, from the chitosan-coated formulation. Non-coated nanoparticles, however, presented 95% of 5-FU release in 120 minutes. The evaluation of the interaction between the nanoparticles and the components of the ocular mucous membrane demonstrated the mucoadhesive properties of chitosan through the modification in the viscosity of the mucin dispersion after incubation with a formula containing biopolymer. In order to determine the stability of these systems in relation to the lysozyme, an agglomeration of nanoparticles without chitosan was presented from the modifications that took place in the mean diameters and in the polydispersion index of the particles, after the incubation with the enzyme. Through an *ex vivo* retention evaluation of free and nanoencapsulated 5-FU in a pig's corneas, a 5-FU extraction method was developed, using high-efficiency liquid chromatography to quantify the drug retained in the corneal tissue. The results obtained in the *ex vivo* diffusion cells study were superior to the dispersion systems when compared to the free drug solution. However, when compared to both nanoparticle formulation, those coated with chitosan presented a significant increase in relation to the quantity of drug retained in the cornea ($p < 0,05$). In the quantification of 5-FU penetrated through the cornea, it was not possible to detect the presence of the drugs released through nanospheres formulations. These results suggest that the PECL and PECL/CS nanoparticles present potential for the release of drugs in the ocular mucous membrane and it represent a promising alternative to the treatment of extraocular diseases.

Keywords: nanoparticles; 5-FU; chitosan; poli- ϵ -caprolactone; ocular; drug delivery

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da córnea (Adaptado de www.uniteforsight.org)	22
Figura 2. Estrutura química do 5-FU.....	34
Figura 3. Representação esquemática do método de preparação das suspensões de nanoesferas contendo 5-FU. Adaptado de Blanco & Alonso, 1997.....	42
Figura 4. Curva de calibração do 5-fluorouracil obtida por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.....	63
Figura 5. Curva de calibração do 5-fluorouracil em tampão fosfato pH 7,4 obtida por CLAE.	69
Figura 6. Perfil de liberação do 5-fluorouracil a partir de nanoesferas poliméricas em tampão fosfato pH 7,4 pelo método de diálise (CLAE).....	70
Figura 7. Curva de calibração do 5-fluorouracil em solução de acetonitrila/tampão acetato pH 4,4 (15:85) com metanol 4,0 % (V/V), obtida por CLAE.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição quali/quantitativa das formulações avaliadas no ensaio preliminar para o estabelecimento das condições de preparação das suspensões de nanopartículas contendo 5-FU.	41
Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação do 5-FU por CLAE.	46
Tabela 3. Diâmetro médio (nm) e índice de polidispersão (I.P.) das diferentes formulações de nanopartículas (resultado de 10 leituras das triplicatas de cada formulação).	57
Tabela 4. Valores de potencial zeta (mV) das formulações de nanopartículas brancas pelo método de Anemometria Laser Doppler	60
Tabela 5. Valores de eficiência de encapsulação do 5-fluorouracil em nanoesferas preparadas pelo método da dupla emulsão.	64
Tabela 6. Valores de pH referentes às soluções de tensoativos utilizados como diluentes da fase externa da segunda emulsão.	66
Tabela 7. Áreas de pico obtidas após análise das soluções padrão do 5-fluorouracil por CLAE.	69
Tabela 8. Medidas de viscosidade cinemática (cP) da dispersão de mucina (0,4 mg/mL) após incubação com nanopartículas F1 (n=3)	75
Tabela 9. Medidas de viscosidade cinemática (cP) da dispersão de mucina (0,4 mg/mL) após incubação com nanopartículas F2 (n=3)	76
Tabela 10. Propriedades físico-químicas das nanopartículas após a incubação das suspensões coloidais com uma solução aquosa de lisozima (0,04%).	78
Tabela 11. Áreas de pico obtidas após análise das soluções padrão do 5-fluorouracil por CLAE.	81
Tabela 12. Quantidade de 5-fluorouracil (mg/g) extraído das córneas de porco, em estudo <i>ex vivo</i> em células de difusão (CLAE).	83
Tabela 13. Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração do 5-FU por espectrofotometria de absorção no ultravioleta	101
Tabela 14. Valores de absorbância, concentração e recuperação de 5-FU obtidos após análise por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.	102

Tabela 15. Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração do 5-fluorouracil por cromatografia líquida de alta eficiência.....	103
Tabela 16. Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração do 5-fluorouracil por cromatografia líquida de alta eficiência	104
Tabela 17. Taxa de recuperação do 5-FU extraído de córneas de porco com solução metanólica em estudo preliminar.	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluorouracil
δ	Desvio padrão
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
a/o/a	Água/óleo/água
ANOVA	Análise de variância
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
CS	Quitosana
CV%	Coeficiente de variação
Da	Daltons
i.p.	Índice de polidispersão
M	Média
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mV	Milivolts
nm	Nanômetro
PECL	Poli- ϵ -caprolactona
PLA	Poli(ácido láctico)
PLAGA	Poli(DL-ácido láctico-co-glicólico)
PM	Peso molecular
p/p	Peso por peso
p/V	Peso por volume
PVA	Álcool polivinílico
Polaxâmero 188	PLU
rpm	Rotações por minuto
R^2	Coeficiente de regressão
UV	Ultravioleta
V/V	Volume por volume
W	Watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	ASPECTOS RELACIONADOS À BIODISPONIBILIDADE OCULAR DE MEDICAMENTOS	19
3.1.1	Características anátomo-fisiológicas da córnea	21
3.1.2	Filme lacrimal	22
3.1.3	Absorção corneal de fármacos	23
3.2	TERAPIA TÓPICA OCULAR	24
3.2.1	Novas tendências na terapia tópica ocular	25
3.2.1.1	Nanopartículas poliméricas	26
3.2.1.2	A aplicação ocular das nanopartículas poliméricas	27
3.2.1.3	Preparações oftálmicas com quitosana	30
3.3	PATOLOGIAS OCULARES - QUIMIOTERAPIA	32
3.3.1	5-Fluorouracil (5-FU)	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	MATERIAIS	37
4.1.1	Matérias-primas	37
4.1.2	Solventes e Reagentes	37
4.1.3	Córneas	38
4.1.4	Equipamentos e material de consumo	38
4.2	METODOLOGIA	39
4.2.1	Estudo preliminar das condições de preparação de sistemas nanoparticulares contendo 5-fluorouracil	39
4.2.2	Determinação do diâmetro médio, distribuição granulométrica e potencial zeta das nanoesferas	42
4.2.3	Determinação da eficiência de encapsulação do 5-fluorouracil em suspensões de nanoesferas	43
4.2.3.1	Curva de calibração do 5-fluorouracil em tampão acetato por espectrofotometria no ultravioleta (UV)	43

4.2.3.2	Determinação da eficiência de encapsulação das nanoesferas contendo 5-FU	44
4.2.4	Determinação do perfil de liberação do 5-FU a partir das nanoesferas de PECL e PECL/CS	45
4.2.4.1	Solubilidade do 5-FU em tampão fosfato pH 7,4	45
4.2.4.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	45
4.2.4.2.1	Condições cromatográficas	45
4.2.4.2.2	Curva de calibração de 5-FU em tampão fosfato pH 7,4 obtida por CLAE	46
4.2.4.3	Estudo de cinética de liberação do 5-FU a partir das nanoesferas.....	46
4.2.5	Estudo da interação e estabilidade das nanoesferas de PECL e PECL/CS frente aos componentes do muco ocular.....	47
4.2.5.1	Interação com a mucina	47
4.2.5.2	Estabilidade frente a lisozima	48
4.2.6	Interação <i>ex-vivo</i> do 5-FU livre e nanoencapsulado com o tecido corneal.....	49
4.2.7	Estudo da retenção corneal <i>ex-vivo</i> do 5-FU livre e nanoencapsulado	50
4.2.7.1	Curva de calibração do 5-FU em acetonitrila/tampão acetato pH 4,4 e metanol a 4,0 % obtida por CLAE.....	50
4.2.7.2	Determinação das condições de extração do 5-FU do tecido corneal.....	50
4.2.7.3	Determinação da quantidade de 5-FU retido no tecido corneal após estudo nas células de difusão	52
4.2.8	Passagem transcorneal <i>ex vivo</i> do 5-FU	52
4.2.8.1	Curva de calibração do 5-FU em acetonitrila/tampão acetato pH 4,4 por CLAE	52
4.2.8.2	Determinação da concentração de 5-FU na solução do compartimento receptor da célula de difusão.....	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	ESTUDO PRELIMINAR DAS CONDIÇÕES DE PREPARAÇÃO DE SUSPENSÕES COLOIDAIS DE NANOESFERAS CONTENDO 5-FLUOROURACIL.....	54
5.2	DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO, DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA E DO POTENCIAL ZETA DAS NANOESFERAS.....	56
5.2.1	Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica	56
5.2.2	Determinação do potencial zeta	59
5.3	DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO NAS SUSPENSÕES COLOIDAIS DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO 5-FLUOROURACIL.....	61

5.4	ESTUDO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DO 5-FLUOROURACIL A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS	67
5.4.1	Cinética de liberação do 5-fluorouracil a partir das nanoesferas	70
5.5	ESTUDO DA INTERAÇÃO NAS NANOPARTÍCULAS FRENTE AOS COMPONENTES DO MUCO OCULAR	73
5.5.1	Interação com a mucina	74
5.5.2	Avaliação da estabilidade das nanopartículas frente a lisozima	77
5.6	INTERAÇÃO <i>EX VIVO</i> DO 5-FU LIVRE E NANOENCAPSULADO COM O TECIDO CORNEAL	79
5.6.1	Extração do 5-FU retido no tecido corneal após estudo nas células de difusão	82
5.6.2	Permeação <i>ex vivo</i> do 5-FU	84
6	CONCLUSÕES	86
7	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	89
8	ANEXOS	100

1 INTRODUÇÃO

Entre as diferentes vias de administração de medicamentos, a via ocular destaca-se pela facilidade de acesso quando da utilização das formas farmacêuticas tópicas convencionais, como colírios e pomadas (BOURLAIS *et al.*, 1998). No entanto, a aplicação local de medicamentos não garante que a biodisponibilidade dos princípios ativos aplicados topicamente seja ótima. Isso ocorre em função das características morfológicas do olho e dos sistemas de proteção presentes (CALVO, 1995). Desta forma, o tempo de residência ocular de preparações líquidas convencionais está limitado a poucos minutos, sendo que a penetração intraocular de fármacos aplicados topicamente é de cerca de 1-3 % (LEE & ROBINSON, 1986; ZIMMER & KREUTER, 1995). Isto implica na necessidade de administrar doses elevadas e freqüentes para alcançar e manter a resposta terapêutica desejada, ocasionando, além de efeitos locais, um aumento da absorção conjuntival e, conseqüentemente, a possibilidade de incidência de efeitos sistêmicos indesejados (CHRAI *et al.*, 1973).

Entre as estratégias que vêm sendo utilizadas para prolongar o tempo de contato medicamento-superfície corneal, no intuito de aumentar as oportunidades de absorção corneal após a administração tópica, destacam-se os sistemas dispersos. Estes sistemas constituem uma interessante alternativa no campo da oftalmologia porque proporcionam a comodidade, simplicidade na administração, tolerância e boa aceitação das preparações líquidas e, ao mesmo tempo, o aumento do tempo de contato fármaco-área pré corneal e a possibilidade de controlar a liberação do fármaco. Como conseqüência, os sistemas dispersos têm potencial para reduzir a freqüência de aplicação e diminuir a incidência de efeitos secundários sistêmicos, quando comparadas com as formulações convencionais (ZIMMER & KREUTER, 1995; LANGER *et al.*, 1997; CHIANG *et al.*, 2001; YEH *et al.*, 2001).

Dentre os sistemas dispersos, destacam-se as suspensões de nanopartículas, com as quais foram obtidos interessantes resultados no campo da terapia oftálmica. As nanocápsulas obtidas a partir do poliéster poli- ϵ -caprolactona

(PECL) vêm sendo utilizadas como um sistema de liberação tópica ocular de fármacos, demonstrando resultados interessantes como a diminuição significativa dos efeitos sistêmicos indesejáveis (LOSA *et al.*, 1993); interação preferencial com a córnea em relação à conjuntiva (CALVO, 1995); e aumento significativo da concentração de fármaco em córnea comparada com uma solução comercialmente disponível utilizada como referência (CALVO *et al.*, 1996). Uma estratégia bastante interessante para incrementar a capacidade de permanência na área pré-corneal dos sistemas nanoparticulares destinados à via ocular é o recobrimento com polímeros mucoadesivos, como é o caso do biopolímero quitosano. Este polissacarídeo apresenta uma série de propriedades interessantes em oftalmologia, como mucoadesão (HE *et al.*, 1998), biodegradabilidade (STRUSZCZYK *et al.*, 1994), biocompatibilidade (RICHARDSON *et al.*, 1999) e ausência de toxicidade (FELT *et al.*, 1999), além de outras propriedades biomédicas de interesse em oftalmologia como ação epitelizante, cicatrizante e antimicrobiana (MUZZARELLI *et al.*, 1988; FELT *et al.*, 2000). Adicionalmente, a quitosana apresenta a capacidade de incrementar transitoriamente a permeabilidade das barreiras mucosas e, desta forma, pode favorecer a penetração ocular a partir de uma administração tópica (CAMPOS, 2001).

Os resultados obtidos com sistemas nanoparticulares poliméricos podem ser considerados bastante promissores no que se refere à biodisponibilidade ocular. Portanto, estes sistemas podem ser utilizados como alternativas terapêuticas para patologias de difícil tratamento tanto a partir de uma administração sistêmica como tópica, seja pela dificuldade do fármaco em atingir os tecidos intra-oculares, seja pela incidência de efeitos colaterais importantes.

Para os cânceres intraoculares, via de regra bastante agressivos, a radiação e a cirurgia permanecem como as principais formas de tratamento. Porém, em certos casos, a combinação destes procedimentos com a administração de quimioterápicos pode ser empregada para reduzir a morbidade, o tamanho do tumor e aumentar a eficácia do tratamento (WILSON *et al.*, 2001). Nestes casos, a quimioterapia tópica apresenta como vantagem sobre a administração sistêmica a redução da dose e, conseqüentemente, dos efeitos adversos decorrentes da elevada toxicidade destes agentes quimioterápicos.

O 5-fluorouracil, agente anti-metabólito que atua inibindo ou competindo na síntese de DNA e RNA das células, provocando a morte celular (GAGO, 1996), vem sendo empregado, sobretudo, para o tratamento de tumores sólidos da úvea e linfoma intraocular (WILSON *et al.*, 2001, VELEZ *et al.*, 2001). As reações adversas associadas à administração sistêmica inicial são diversas e importantes, incluindo toxicidade cardíaca, anorexia, náusea, estomatite e alterações das mucosas do trato gastrointestinal, que podem levar à diarreia fulminante, choque e morte. A instilação tópica deste fármaco, mesmo reduzindo a incidência de efeitos colaterais sistêmicos, pode conduzir a efeitos locais importantes tais como dor, fotofobia, lacrimação excessiva, conjutivite, blefarite e síndrome do olho seco (MAINO *et al.*, 2000).

Diante destas considerações, entende-se como relevante o desenvolvimento de um sistema nanoestruturado contendo 5-fluorouracil visando uma melhora da biodisponibilidade ocular a partir da administração tópica ocular e/ou a redução da absorção sistêmica e, conseqüentemente, levando a uma menor incidência dos importantes efeitos colaterais relacionados a este fármaco. Para tanto, este trabalho propõe-se a desenvolver suspensões de nanopartículas, utilizando a poli- ϵ -caprolactona como material polimérico, revestidas ou não com o polissacarídeo quitosana, através da técnica da dupla emulsão. Cabe salientar que até o momento não há relatos da utilização da quitosana para o revestimento de nanopartículas obtidas pelo método da dupla emulsão, sendo esta uma proposta inédita do presente trabalho.

A proposta compreende também a avaliação da interação dos sistemas com componentes do fluido lacrimal, bem como o estudo da permeação *ex vivo* do fármaco no tecido corneal, investigando a influência da nanoencapsulação e do revestimento de quitosana neste processo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar suspensões de nanopartículas de diferentes características físico-químicas como carreadores para a administração ocular do agente antitumoral 5-fluorouracil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar sistemas coloidais contendo o 5-Fluorouracil utilizando poliésteres alifáticos como material polimérico.
- Preparar e caracterizar sistemas coloidais contendo o 5-Fluorouracil utilizando poliésteres recobertos com quitosana.
- Determinar o perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos sistemas nanoparticulares preparados.
- Avaliar a estabilidade *in vitro* das nanoesferas em presença dos componentes do muco ocular e do fluido lacrimal, lisozima e mucina.
- Avaliar a retenção corneal *ex-vivo* do 5-fluorouracil nanoencapsulado em córneas de porco, empregando célula de difusão.
- Avaliar a passagem transcorneal *ex-vivo* do 5-fluorouracil nanoencapsulado em córneas de porco, empregando células de difusão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS RELACIONADOS À BIODISPONIBILIDADE OCULAR DE MEDICAMENTOS

O tratamento farmacológico de patologias oculares é conduzido pelas vias de administração sistêmica e local. A via sistêmica apresenta algumas limitações relacionadas com a baixa concentração de princípio ativo que alcança os tecidos oculares devido, fundamentalmente, às barreiras existentes entre os tecidos e a corrente sangüínea. Portanto, para que se obtenha uma concentração da substância ativa dentro da faixa terapêutica utilizando essa via, é necessária a administração de concentrações elevadas durante um período prolongado, podendo ocasionar sérios efeitos adversos em outros órgãos do corpo humano (FIALHO *et al.*, 2003).

A aplicação tópica de medicamentos na superfície ocular é uma forma comum de administração, sendo bem aceita para o tratamento de diversas patologias oculares. Entretanto, a biodisponibilidade dos fármacos oftálmicos é afetada pelos eficientes mecanismos de proteção do olho, o que caracteriza uma limitação para a instilação de fármacos por esta via. Tais mecanismos compreendem a dinâmica dos fluídos (produção e drenagem), união a proteínas, metabolismo e absorção não produtiva (ZIMMER & KREUTER, 1995).

Quando um princípio ativo é instilado na área pré-corneal pode exercer a sua atividade farmacológica na superfície do olho, bem como penetrar a câmara anterior e distribuir-se pelos tecidos oculares internos. Contudo a instilação de fármacos no saco conjuntival provoca um lacrimejamento que conduz à eliminação de grande parte do fármaco instilado (JARVINEN *et al.*, 1995).

A administração de um grande volume de solução leva a uma alta taxa de drenagem lacrimal, de forma que o volume fisiológico, em torno 7 μ L, seja alcançado, ocasionando a absorção de pequena quantidade de fármaco (entre 1 e 3 %) para os tecidos oculares (LANGER *et al.*, 1995). Após a instilação de um volume

de 50 μL , em torno de 90 % da dose administrada é eliminada em até dois minutos, enquanto que na administração de 10 μL este tempo alcança os quatro minutos (CHRAI *et al.*, 1973). Conseqüentemente, essa limitação no tempo de residência ocular de soluções convencionais afeta a biodisponibilidade dos fármacos utilizados (LANGER *et al.*, 1995).

Por outro lado, a fração de principio ativo não eliminada da área pré-corneal pode ser absorvida pela conjuntiva ou mucosa nasal, podendo ocasionar reações adversas no paciente (ZIMMER & KREUTER, 1995; GEROSKI & EDELHAUSER, 2001). Para substâncias potentes, a toxicidade pode ocorrer quando a exposição sistêmica for suficientemente alta (TOJO & ISOWAKI, 2001; KAUR & KANWAR, 2002; MAINARDES *et al.*, 2005).

Além da interferência da drenagem naso-lacrimonasal sobre a permanência dos princípios ativos na área pré-corneal, a ligação destes às proteínas existentes no fluido lacrimal constituem uma importante limitação na biodisponibilidade do fármaco, já que somente as moléculas livres são capazes de alcançar seu local de ação (CALVO, 1995).

Um outro mecanismo de proteção do olho frente às substâncias aplicadas na superfície ocular é a metabolização do principio ativo. Em alguns tecidos oculares, incluindo a córnea, existe uma quantidade significativa de enzimas como as esterases, peptidases e proteases, entre outras, que podem metabolizar os fármacos aplicados topicamente durante ou após a absorção, afetando a sua atividade biológica (LEE *et al.*, 1986; JÄRVINEN *et al.*, 1995).

As características anátomo-fisiológicas do olho também interferem na biodisponibilidade dos fármacos oftálmicos (JÄRVINEN *et al.*, 1995; KAUR, *et al.*, 2004). Para a maioria dos fármacos aplicados no olho a córnea representa a principal via de penetração para os tecidos intra-oculares. Contudo, a extensão da absorção de fármacos oftálmicos é severamente limitada por propriedades fisiológicas, destacando-se a relativa impermeabilidade da barreira corneal (MAINARDES *et al.*, 2005).

3.1.1 Características anátomo-fisiológicas da córnea

A córnea, localizada no segmento anterior do globo ocular, é um tecido avascular claro e transparente cujos nutrientes e oxigênio são suplementados pelo fluido lacrimal e humor aquoso. A mesma é composta por três camadas, sendo elas o epitélio, o estroma e o endotélio, além das membranas de Descemet's e de Bowman (Figura 1).

O epitélio, tecido mais externo da córnea, consiste de 5 a 6 camadas de células em sua área central, apresentando uma espessura total de 50 – 100 μm (JÄRVINEN *et al.*, 1995). Devido à sua histologia, o epitélio corneal apresenta uma natureza lipofílica, constituindo a principal barreira para a passagem de substâncias hidrofílicas (MAINARDES, 2005). Essas células da camada basal são colunares e compactadas como um pavimento, formando não somente uma efetiva barreira contra microorganismos, mas também em relação à absorção de fármacos. A baixa permeabilidade da córnea sugere a presença de junções íntimas entre as células (KAUR & KANWAR, 2002; LUDWIG, 2005).

O estroma, ou substância própria, é constituído por fibras de colágeno entrelaçadas e apresenta um alto teor aquoso. Sua espessura varia de 600–1000 μm . Devido ao seu caráter hidrofílico, esta camada constitui uma barreira para os princípios ativos lipofílicos, sendo que tais substâncias podem permear facilmente o epitélio corneal e permanecerem retidas no estroma. A membrana de Bowman localiza-se entre o epitélio e o estroma, a qual apresenta uma espessura de 8 – 14 μm e não difere significativamente do estroma (BOURLAIS *et al.*, 1998).

O endotélio é uma camada de células hexagonais, apresentando característica lipofílica e espessura de 5 μm . Essa camada apresenta-se mais permeável do que o epitélio. Entre o estroma e o endotélio existe uma camada de espessura variável, compreendida entre 5 – 10 μm , denominada membrana de Descemet (BOURLAIS *et al.*, 1998).

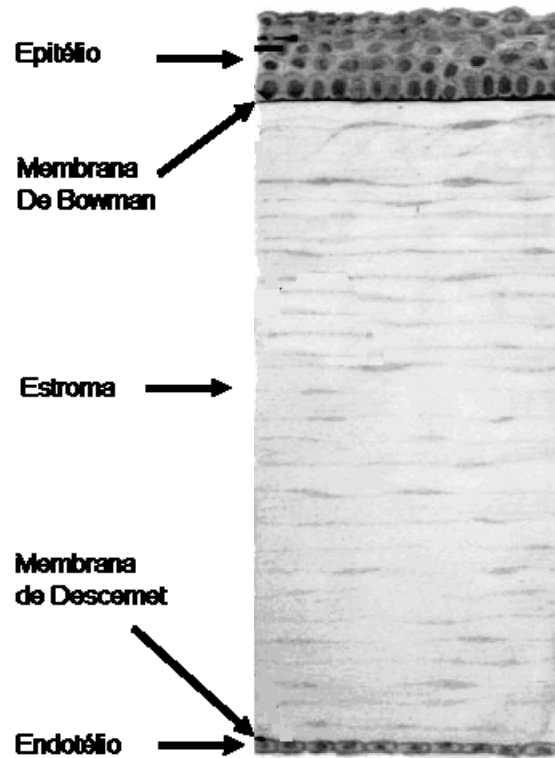


Figura 1. Estrutura da córnea (Adaptado de www.uniteforsight.org)

3.1.2 Filme lacrimal

A parte exposta do olho é totalmente recoberta por uma camada fluida fina também chamada de filme lacrimal pré-corneal.

O filme lacrimal apresenta uma espessura de cerca de 3 – 10 μm e a quantidade de volume residente é de cerca de 7 μL (LUDWIG, 2005) e pH entre 7,14 e 7,82. O filme lacrimal pré-corneal consiste de uma camada lipídica superficial, uma camada aquosa central e uma camada mucosa interna. A camada lipídica é composta principalmente de ésteres esteróis, triacilgliceróis e fosfolípídeos, esteróis livres e ácidos graxos livres. Os lipídeos desempenham um importante papel na redução da taxa de evaporação de um modo que a osmolalidade lacrimal normal pode ser mantida quando o fluxo lacrimal é muito baixo (LUDWIG, 2005).

A glândula lacrimal e os acessórios da glândula contribuem para a formação da camada aquosa, que contém sais orgânicos, glicose e uréia bem como retinol, ácido ascórbico, imunoglobulinas, lisozima, lactoferrina e glicoproteínas (LUDWIG, 2005).

A camada mucosa está intimamente associada com o glicocálix das células epiteliais corneais/conjuntivais. Apresenta sensibilidade à hidratação e forma uma camada gelatinosa com propriedades viscoelásticas reológicas.

A mucina, componente primário da camada mucosa, é uma glicoproteína de alto peso molecular com subunidades contendo uma proteína central com aproximadamente 800 aminoácidos, dos quais cerca de duzentos estão ligados lateralmente a cadeias de polissacarídeos. A proteína central apresenta seqüências repetidas principalmente de serina, treonina e prolina. As cadeias laterais de polissacarídeos usualmente terminam em fucose ou ácido siálico, a glicoproteína é carregada negativamente em pH fisiológico, podendo interagir com substâncias catiônicas (KHANVILKAR *et al.*, 2001).

3.1.3 Absorção corneal de fármacos

A extensão da absorção de fármacos oftálmicos é severamente limitada pelas propriedades fisiológicas do olho, como já descrito anteriormente. O epitélio corneal é o principal fator para a limitação da absorção ocular de princípios ativos. Porém, as propriedades físico-químicas dos princípios ativos como a solubilidade, caráter lipofílico, tamanho de partícula, carga e grau de ionização, afetam a rota e a taxa de penetração na córnea (BOURLAIS *et al.*, 1998; KAUR *et al.*, 2004).

A barreira que limita a penetração ocular de fármacos altamente hidrofílicos é o epitélio corneal lipofílico, enquanto que para aqueles muito lipofílicos a barreira mais importante para a penetração é o estroma hidrofílico (CALVO, 1995; MAINARDES *et al.*, 2005).

Os fármacos atravessam o epitélio corneal por mecanismo transcelular ou paracelular. Aqueles com características lipofílicas passam mais facilmente pela via transcelular. Os hidrofílicos atravessam primariamente através da via paracelular, a qual envolve difusão alterada ou passiva entre os espaços intracelulares. Para muitos fármacos aplicados topicamente, a difusão passiva aumenta o seu gradiente de concentração, seja pela via transcelular ou paracelular, sendo o principal mecanismo de permeação através da córnea (MAINARDES *et al.*, 2005; TOROPAINEN *et al.*, 2003)

Além do caráter hidrofílico ou lipofílico da substância, a carga da molécula também afeta a sua penetração corneal. Formulações catiônicas permeiam a barreira corneal mais facilmente do que as formas aniônicas, isso se dá pelo fato de o epitélio corneal apresentar cargas carregadas negativamente (BOURLAIS *et al.*, 1998; MAINARDES *et al.*, 2005).

3.2 TERAPIA TÓPICA OCULAR

O tratamento das patologias oftálmicas consiste tradicionalmente na aplicação tópica de soluções aquosas sobre a superfície ocular. Os colírios são utilizados para a administração de moléculas solúveis, necessitando de instilações freqüentes e altas doses de fármaco. Esta forma farmacêutica apresenta como vantagens o custo favorável, a simplicidade no desenvolvimento e produção da formulação, bem como a boa aceitação pelos usuários. Contudo, uma grande desvantagem da aplicação tópica de colírios caracteriza-se pela rápida perda pré-corneal do fármaco causada pela drenagem naso-lacrimal (BOURLAIS *et al.*, 1998). Com o objetivo de se prolongar o tempo de residência pré-corneal dos fármacos e conseqüentemente a biodisponibilidade destes, agentes viscosificantes foram adicionados às soluções aquosas para aumentar a viscosidade da preparação e elevar a sua eficácia terapêutica, formando os hidrogéis (LUDWIG, 2005). Os polímeros utilizados na formação dos hidrogéis apresentam peso molecular elevado, destacando-se os derivados semi-sintéticos da celulose, o álcool polivinílico, polissacarídeos naturais como quitosana, dextrano, goma xantana e polímeros sintéticos como os derivados

do ácido poliacrílico. Além disso, sistemas bioadesivos, que incluem polímeros capazes de interagir com os componentes do muco ocular, como o ácido hialurônico e o ácido poli-acrílico, são utilizados para aumentar o tempo e a intensidade de contato entre o medicamento e a superfície corneal (BOURLAIS *et al.*, 1995).

No início da década de 80 dispositivos sólidos de liberação controlada de fármacos foram desenvolvidos, funcionando como um sistema reservatório dos fármacos, objetivando incrementar a permanência do fármaco na área pré-corneal. Tais sistemas como Ocusert®, NODS – New Ophtalmic Delivery System, entre outros, promoviam precisão na dosificação, redução na absorção sistêmica dos fármacos com conseqüente diminuição na incidência de efeitos colaterais (GREAVES *et al.*, 1992). Porém, esses sistemas apresentavam como desvantagem o desconforto manifestado pelos pacientes, devido à presença de um objeto sólido na área pré-corneal (ALONSO, 2001).

3.2.1 Novas tendências na terapia tópica ocular

Com base nas limitações que envolvem a aplicação tópica de formulações convencionais na superfície ocular diversas pesquisas vêm sendo realizadas, cujo objetivo contempla a otimização da biodisponibilidade e duração da ação terapêutica dos fármacos oftálmicos bem como a diminuição dos efeitos adversos decorrentes da aplicação das formulações convencionais. Desta forma, os sistemas de liberação ocular de fármacos têm sido extensivamente investigados (BOURLAIS *et al.*, 1998).

Os sistemas de liberação promovem a liberação do fármaco no seu sítio de ação de forma controlada e contínua. Além disso, recursos para aumentar a absorção dos fármacos através da córnea e diminuir a perda pré-corneal dos mesmos também são alvos de intensos estudos (KAUR *et al.*, 2004).

O principal fator requerido para a liberação controlada de preparações oftálmicas é, portanto, a bioadesividade que aumenta o tempo de contato com a córnea, levando à melhora da absorção do fármaco no local (KUMAR *et al.*, 2004).

Um sistema ideal para a liberação ocular de fármacos não deve prejudicar a visão do paciente ou causar irritação aos tecidos oculares e deve ainda obedecer a um regime terapêutico de uma ou duas aplicações diárias (BOURLAIS *et al.*, 1998). Os benefícios para o paciente são a diminuição na frequência de instilações, baixa toxicidade e diminuição dos efeitos colaterais.

O controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através da utilização de vetores capazes de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias, tem sido alvo de intensa pesquisa nos últimos anos (CAMPOS, 2001). Dentre os vetores, incluem-se as micropartículas e os sistemas coloidais, cujos principais representantes são os lipossomas e nanopartículas.

3.2.1.1 Nanopartículas poliméricas

As suspensões coloidais de nanopartículas poliméricas são os sistemas que mostram atualmente um maior grau de inovação e versatilidade. Tais sistemas são representados na forma de nanoesferas sólidas elaboradas a partir de um polímero biodegradável ou na forma de nanocápsulas consistentes de nanogotículas de óleo envoltas por uma cobertura polimérica. Em função da distinta composição interna, os sistemas coloidais permitem a inclusão, em sua estrutura, de fármacos com características físico-químicas bem diferenciadas, desde moléculas altamente hidrofílicas e polares a fármacos hidrofóbicos (CALVO *et al.*, 1996).

As nanoesferas consistem de partículas sólidas coloidais e apresentam uma variação de tamanho entre 10 e 1000 nm. São obtidas a partir de materiais macromoleculares nos quais o princípio ativo encontra-se associado, encapsulado ou adsorvido (KREUTER, 1983). O principal objetivo destas formas de tamanho reduzido é a obtenção de uma ação prolongada, ou controlada, do fármaco incorporado ou encapsulado. Além disso, esses sistemas podem oferecer vantagens

por proteger ou separar o seu conteúdo ou ainda retardar a liberação do fármaco (KREUTER, 1983).

No que tange a obtenção das nanopartículas, elas podem ser obtidas através de métodos mecânicos ou físico-químicos. O mecanismo de obtenção das partículas representa um fator crucial para as suas características físico-químicas como tamanho, distribuição e morfologia, o que, em contrapartida, determina o comportamento destas em relação à encapsulação e liberação do fármaco (ROSCA *et al.*, 2004).

Para a nanoencapsulação dos fármacos que apresentam caráter hidrofílico, o método físico-químico da dupla emulsão apresenta-se como o mais adequado (YANG *et al.*, 2001). Este método é conceitualmente simples, consistindo na preparação de uma emulsão primária a/o, através da sonicação de um pequeno volume de água contendo o fármaco e um solvente orgânico contendo o polímero. Esta emulsão constitui a fase interna da segunda emulsão, também preparada por sonicação, cuja fase externa é uma solução aquosa de tensoativo (BLANCO & ALONSO, 1997).

A preparação das formulações de nanopartículas por este método requer a presença de um agente emulsificante para estabilizar a fase dispersa em uma emulsão múltipla (a/o/a) (ZAMBAX *et al.*, 1999). O agente emulsionante, neste caso, é requerido para prevenir a agregação e a coalescência das partículas. De acordo com Watts e colaboradores (1990), os tensoativos mais utilizados na preparação de sistemas nanoestruturados são a gelatina, o álcool polivinílico e a metilcelulose, o polisorbato 80, oleato de sódio, dodecil sulfato, colato de sódio, polaxâmeros, entre outros.

3.2.1.2 A aplicação ocular das nanopartículas poliméricas

A capacidade dos sistemas nanoparticulares em promover a penetração ocular de fármacos já foi anteriormente descrita. Os primeiros estudos, a

avaliarem estes sistemas, como formas de aplicação tópica ocular foram Wood e colaboradores (1985). Esses autores utilizaram nanopartículas de polihexilcianoacrilato marcadas radioativamente e observaram tanto a capacidade de adesão das partículas à superfície corneal e conjuntival como a biodegradabilidade do polímero no filme lacrimal. Esses resultados demonstraram que esse sistema poderia promover uma melhora na biodisponibilidade ocular de fármacos (WOOD *et al.*, 1985).

A presença das nanoesferas fluorescentes no interior das células do epitélio corneal de coelhos albinos e a ausência de dano celular, foram reveladas por microscopia confocal de fluorescência fármacos (CALVO, 1995). Estes autores observaram que as nanoesferas são capazes de atravessar o epitélio corneal segundo um mecanismo de transporte transcelular.

Com relação à capacidade de interação das nanopartículas com as mucosas, é interessante que o polímero utilizado na preparação das nanoestruturas apresente características mucoadesivas, promovendo um íntimo contato com a camada mucosa. Tais sistemas interagem com a mucina por pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. Assim, as características do polímero empregado na obtenção das nanopartículas são cruciais para que essas estruturas adquiram propriedades mucoadesivas (VASIR *et al.*, 2003). Nesse sentido, a poli- ϵ -caprolactona comporta propriedades interessantes para aplicação na mucosa ocular, como biocompatibilidade e biodegradabilidade. Este polímero apresenta solubilidade em solventes apolares como acetona, acetato de etila e acetonitrila (CALVO, 1995).

Nanopartículas obtidas a partir do poliéster poli- ϵ -caprolactona (PECL) vêm sendo estudadas como um sistema de liberação tópica ocular de fármacos, demonstrando resultados interessantes como a diminuição significativa dos efeitos sistêmicos indesejáveis associados à terapia com betabloqueadores, mantendo-se a resposta terapêutica (LOSA *et al.*, 1992); interação preferencial com a córnea em relação à conjuntiva (CALVO *et al.*, 1996); e aumento significativo da concentração de indometacina em córnea comparada com uma solução comercialmente disponível utilizada como referência (CALVO *et al.*, 1996).

A capacidade da poli- ϵ -caprolactona em liberar o fármaco gradualmente foi demonstrada através da permanência da nanopartículas de PECL agregadas no saco conjuntival, após instilação, liberando o fármaco gradualmente. Este fenômeno foi observado quando a redução da pressão intraocular em coelhos glaucomatosos foi observada após a administração de nanoesferas contendo PECL, em comparação às esferas de polialquilcianoacrilato e poli(D,L-lático-co-glicólico) (LUDWIG, 2005).

A habilidade das nanopartículas de atravessar o epitélio corneal está relacionada ao seu tamanho nanométrico, sendo que partículas com diâmetro médio inferior a 1000 nm são mais susceptíveis de serem transportadas através da mucosa ocular (ALONSO, 2001). Nesse sentido, um estudo anteriormente realizado por Calvo e colaboradores (1996) investigou a administração ocular de indometacina encapsulada em diferentes sistemas coloidais (nanocápsulas, nanopartículas e nanoemulsões) quando comparados à solução comercial de referência e às micropartículas contendo o fármaco. Na comparação com a solução comercial os níveis de fármaco detectados na córnea foram significativamente maiores para os sistemas coloidais. Contudo, quando micropartículas de indometacina (tamanho entre 3 a 6 μ m) foram administradas, foi observado um aumento na concentração do fármaco na córnea em relação ao controle, porém, quantidades inferiores de fármaco foram detectadas em comparação aos sistemas coloidais.

Os resultados obtidos com estes sistemas, como a capacidade de transportar fármacos através da córnea e boa tolerância pelos tecidos oculares, podem ser considerados excelentes no que se refere a biodisponibilidade ocular, no entanto, mesmo conseguindo reduzir a dose necessária para alcançar o efeito terapêutico desejado, esses sistemas não permitiram reduzir a frequência das instilações.

Recentemente, com o objetivo de incrementar a capacidade de permanência dos sistemas nanoparticulares na área pré-corneal, o recobrimento com polímeros mucoadesivos, como o biopolímero quitosana, vem sendo realizado.

A quitosana (CS) apresenta-se como um veículo potencial para formulações oftálmicas por exibir diversas propriedades biológicas favoráveis como biodegradabilidade (PANGBURN *et al.*, 1982) ausência de toxicidade (FETL *et al.*, 1999) e mucoadesividade (HE *et al.*, 1998). Além disso, apresenta ainda propriedades antimicrobianas e cicatrizantes e um comportamento pseudoplástico e viscoelástico (BAEYENS & GURNY, 1997; BOONSOGRIT *et al.*, 2005).

De acordo com Lehr e colaboradores (1992), polímeros catiônicos apresentam boas propriedades mucoadesivas, devido à sua capacidade de desenvolver forças de atração molecular por interações eletrostáticas com as cargas negativas do muco.

Com relação a quitosana, as suas propriedades mucoadesivas são determinadas pela formação de ligações químicas secundárias como pontes de hidrogênio ou interações iônicas entre as cargas positivas dos grupos amina da quitosana e as cargas negativas dos resíduos de ácido siálico das mucinas, dependendo do pH do meio, sendo o desempenho mucoadesivo da quitosana significativamente maior em pH neutro ou levemente alcalino, como no filme lacrimal (FELT *et al.*, 1999; LUDWIG, 2005; BOONSOGRIT *et al.*, 2005).

3.2.1.3 Preparações oftálmicas com quitosana

Nos últimos anos, a influência da quitosana sobre a liberação ocular de fármacos tem sido investigada. Calvo e colaboradores (1997) observaram que nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona recobertas com quitosana aumentaram significativamente a biodisponibilidade ocular da indometacina comparada à forma não encapsulada e também às nanocápsulas recobertas com poli-L-lisina, cujas cargas superficiais também são positivas. Esses achados sugerem que não somente as cargas positivas, mas a natureza específica da quitosana foi responsável pela melhora da biodisponibilidade do fármaco.

Resultados positivos foram também obtidos com microesferas de quitosana contendo o agente antiviral aciclovir, onde a melhora na penetração corneal do fármaco encapsulado foi observada (GENTA *et al.*, 1997).

A capacidade de liberação ocular de fármacos da quitosana foi avaliada por Felt e colaboradores (1999) ao comparar o tempo de residência pré-corneal de um gel de quitosana contendo tobramicina com a solução comercial de referência. Esse estudo foi realizado *in vivo*, utilizando córneas de coelhos albinos. Os resultados demonstraram um aumento de pelo menos três vezes no tempo de permanência pré-corneal do gel quando comparado com o controle. Nesse estudo, foi realizado ainda um teste de irritação ocular, utilizando oftalmoscopia confocal de varredura a laser combinada com a fixação de fluoresceína corneal, demonstrando claramente a excelente tolerância do biopolímero após a administração sobre a superfície corneal.

Mais recentemente, Campos e colaboradores (2001) avaliaram a associação de ciclosporina A em nanopartículas de quitosana e seu potencial para a liberação de fármacos nos tecidos oculares *in vivo*, utilizando coelhos como modelo animal. Os resultados desse estudo demonstraram que as nanopartículas de quitosana apresentaram resultados superiores ao controle e que estas representam um veículo interessante na aplicação de fármacos com potencial para o tratamento de patologias extra-oculares.

Com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação e interação da quitosana com a mucina, Campos e colaboradores (2004), compararam a interação de nanoesferas de PECL recobertas com polietilenoglicol *versus* quitosana com a mucosa ocular. O estudo *in vivo* em coelhos demonstrou que as nanoesferas penetram no epitélio corneal por um mecanismo transcelular e a taxa de penetração foi dependente da composição da camada externa das partículas. O polietilenoglicol melhorou a passagem das nanocápsulas através do epitélio intacto, no entanto, a quitosana favoreceu a retenção das partículas na camada superficial do epitélio.

3.3 PATOLOGIAS OCULARES - QUIMIOTERAPIA

O tratamento convencional do câncer ocular, patologia via de regra bastante agressiva, conta com a radiação e a cirurgia como as principais formas de tratamento e, em certos casos, a combinação destes procedimentos com a administração de quimioterápicos. A utilização dos antineoplásicos objetiva reduzir a morbidade, o tamanho do tumor e aumentar a eficácia do tratamento (WILSON *et al.*, 2001). Contudo, os avanços na terapia do câncer progredem rapidamente em relação ao desenvolvimento de novos agentes antitumorais e também às novas formas de liberação de fármacos já conhecidos (PEPPAS-BRANNON & BLANCHETTE, 2004).

Os tumores malignos do olho e de seus anexos são um grupo diversificado, incluindo o carcinoma, melanoma, sarcoma e retinoblastoma, localizados na pálpebra, conjuntiva, úvea, retina, órbita, glândula lacrimal e córnea (UICC, 1998).

Além disso, tumores benignos também podem acometer o epitélio da superfície ocular, como é o caso da neoplasia intra-epitelial córneo - conjuntival (NIC). Esta patologia apresenta diagnóstico e tratamento difíceis, podendo manifestar-se sob as mais variadas formas. O termo NIC hoje substitui outros anteriormente empregados, como doença de Bowen, epiteloma intra-epitelial, displasia, carcinoma *in situ* e intra-epiteloma (SANTOS *et al.*, 2004).

Durante a sua evolução clínica, a NIC progride lenta e continuamente, transformando-se em carcinoma escamoso (PIZZARELLO & JAKOBIEC, 1978). A neoplasia intraepitelial da conjuntiva e córnea, como a maioria dos tumores que aparecem na superfície ocular, afeta o limbo, onde estão localizadas as células progenitoras do epitélio corneal e se caracteriza por uma alta taxa de recorrência (SANTOS *et al.*, 2004).

A partir da invasão sub-epitelial da córnea ou conjuntiva, a lesão passa a ser denominada carcinoma invasivo de células escamosas (SANTOS *et al.*, 2004).

O tratamento tradicionalmente empregado na doença corneana tem sido a excisão associada a crioterapia. A excisão, isoladamente, leva à recorrência em um terço dos casos, num intervalo médio de dois anos. A crioterapia pode levar à cicatrização, membrana retro-corneal, disfunção endotelial e edema, devendo ser reservada somente para as lesões peri-límbicas. Quando associadas crioterapia e excisão, a recorrência se dá em 9% dos pacientes (SANTOS *et al.*, 2004).

Recentemente, alguns estudos têm mostrado que o uso de quimioterápicos como a mitomicina C, interferon e 5-fluorouracil podem eliminar NICs de variados tamanhos (YEATTS *et al.*, 2000; ESPANA *et al.*, 2003).

3.3.1 5-Fluorouracil (5-FU)

O 5-fluorouracil, análogo das pirimidinas é classificado como um agente antimetabólito. Os fármacos deste grupo são empregados no tratamento de diversas afecções, incluindo doenças neoplásicas, psoríase e infecções causadas por fungos e vírus contendo DNA (Lee *et al.*, 1995). As vias de ativação metabólica e degradação destes compostos durante a administração sistêmica na terapia do câncer apresentam oportunidades para o desenvolvimento de terapias de combinação sinérgicas com outros fármacos clinicamente eficazes (GILMAN, 1996).

O 5-FU é um potente inibidor da enzima timidilato sintetase, que interfere com a síntese do ácido desoxiribonucleico (DNA) e em menor extensão inibe a formação do ácido ribonucléico (RNA). Desde que DNA e RNA são essenciais para a divisão e crescimento celular, o efeito do 5-FU pode gerar uma deficiência de timina que provoca um desequilíbrio no crescimento e morte da célula (SKEEL & LACHANT, 1995; MURAD & KATZ, 1996; MOSBY'S, 2002). Sua curva dose-resposta é linear, diferentemente dos demais antimetabólitos. Penetra rapidamente em todos os tecidos, incluindo o líquido céfallo-raquidiano e efusões malignas. Requer ativação por uma série de enzimas fosforilativas e é degradado principalmente ao nível hepático; os metabólitos inativos são excretados pela urina e respiração (MURAD & KATZ, 1996).

As principais vias de administração para o uso terapêutico do 5-FU são a intravenosa, intracavitária, intraarterial e também a via tópica (SKEEL & LACHANT, 1995). Esquemas de administração intermitente, com doses variando de 300 a 500 mg/m² por dia, de 1 a 5 dias a cada 21 dias, bem como regimes de infusão contínua com doses de 1,0 g/m²/dia por 4 a 5 dias, são comumente empregados. Em casos de mielodepressão e mucosite as doses devem ser reduzidas (SKEEL & LACHANT, 1995; MURAD & KATZ, 1996; MOSBY'S, 2002).

Quimicamente, o 5-FU, cuja fórmula molecular é C₄H₃FN₂O₂, apresenta-se na forma de um pó cristalino branco, praticamente inodoro. Decompõe-se aos 282° C e é estável quando exposto ao ar. Um grama de 5-fluorouracil é solúvel em 80 mL de água, 170 mL de álcool e 55 mL de metanol, é praticamente insolúvel em clorofórmio, éter e benzeno; a solubilidade em soluções aquosas aumenta na medida em que se eleva o pH da solução (GENNARO, 1987; CLARKE, 2004).

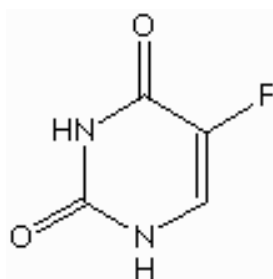


Figura 2. Estrutura química do 5-FU

O 5-FU pode ser utilizado como principal agente terapêutico ou em combinação com outros agentes antineoplásicos (PRASAD *et al.*, 2000). Quando administrado sistemicamente, as reações adversas iniciais apresentadas são anorexia e náusea, seguidas por estomatite e diarreia. Efeitos mucocutâneos como estomatites podem ocorrer, demonstrando sinais iniciais de toxicidade severa. Ocasionalmente pode ocorrer hiperpigmentação da pele, mãos, e veias usadas para infusão do fármaco. A exposição ao sol pode agravar as reações cutâneas (SKEEL & LACHANT, 1995). Alterações das mucosas ocorrem em todo o trato gastrointestinal e podem levar à diarreia fulminante, choque e morte, principalmente

em pacientes que estão recebendo infusões contínuas de 5-FU. Outras reações que podem ocorrer são trombocitopenia e anemia, além disso, perda de cabelos, alterações ungueais, dermatite, pigmentação aumentada e atrofia da pele podem ser observadas. Além disso, manifestações neurológicas, incluindo uma síndrome cerebelar aguda e mielopatia foram relatados após administração intratecal. Toxicidade cardíaca, particularmente dor torácica aguda com evidência de isquemia no eletrocardiograma, também pode ocorrer (GENNARO, 1987; GILMAN, 1996; MOSBY'S, 2002).

Além da utilização do 5-FU pela via sistêmica no tratamento das neoplasias, esse fármaco vem sendo aplicado também na terapia tópica de patologias oculares. Alguns autores têm relatado as vantagens da terapia tópica com 5-FU e a baixa toxicidade deste sobre os tecidos oculares (CAPONE *et al.*, 1987; YEATTS *et al.*, 2000; MIDENA *et al.*, 2000).

Em estudos com 5-fluorouracil Capone e colaboradores (1987) avaliaram a relação de dose antiproliferativa e dose tóxica deste fármaco na superfície do epitélio corneal, utilizando córneas de coelhos. As doses estudadas foram 0,05 mg, 0,5 mg ou 5,0 mg por dia em doses divididas ou solução salina como controle. As soluções foram aplicadas por 18 dias e os efeitos sobre a superfície epitelial foram observados pelos aspectos clínico e histológico. A dose diária de 0,05 mg não apresentou resultados diferentes do controle. O uso do 5-fluorouracil na concentração de 0,5 mg por dia preveniu a alta taxa mitótica, tipicamente observada no início da terapia e não apresentou efeitos significativos sobre o aspecto clínico ou histológico. A aplicação de 5,0 mg do fármaco reduziu em 1 % a taxa mitótica do epitélio corneal afetado.

No estudo realizado por Yeatts e colaboradores (2000) foi avaliada a eficácia do 5-fluorouracil no tratamento da neoplasia intraepitelial da conjuntiva e da córnea em pacientes voluntários. O regime terapêutico constava de aplicação tópica de uma solução de 5-fluorouracil a 1 % contendo metilcelulose, quatro vezes ao dia por quatro dias, com repetições mensais do ciclo de tratamento, sendo realizados de quatro a seis ciclos no total. A terapia estabelecida demonstrou eficácia no

tratamento da neoplasia intraepitelial da conjuntiva e da córnea com ausência de efeitos colaterais.

A avaliação da eficácia da aplicação tópica de uma solução aquosa de 5-fluorouracil a 1 %, isoladamente no tratamento do carcinoma das células escamosas da conjuntiva foi realizada por Midena e colaboradores (2000). Todos os pacientes submetidos ao tratamento demonstraram uma regressão clínica do carcinoma conjuntival, sendo a conjuntiva neoplásica totalmente recuperada em um período de três meses. Nesse estudo, não foram observados efeitos colaterais.

Com base no exposto, este trabalho visa desenvolver e avaliar sistemas nanoestruturados destinados à administração ocular, contendo o agente antineoplásico 5-fluorouracil. Desta forma, nanopartículas poliméricas com diferentes características superficiais serão desenvolvidas e avaliadas quanto às suas propriedades físico-químicas, interação com os componentes do fluido lacrimal e com o tecido corneal visando a melhora da biodisponibilidade ocular a partir da administração tópica destes sistemas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matérias-primas

- 5-Fluorouracil (Galena – Brasil);
- Álcool polivinílico (Vetec – Rio de Janeiro);
- Quitosana 85% desacetilada (PM 161 kDa) (Sigma-Aldrich – USA);
- Polaxâmero 188 (BASF – New Jersey);
- Poli- ϵ -caprolactona (PM 40.000 Da) (Aldrich – Alemanha).

4.1.2 Solventes e Reagentes

Todos os solventes, com exceção daqueles utilizados na análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), possuíam grau de pureza para análise (P.A).

- Acetato de etila (Vetec – Rio de Janeiro);
- Acetato de sódio (Vetec – Rio de Janeiro);
- Acetonitrila para CLAE (Tedia Company Inc. - EUA);
- Ácido acético glacial (Vetec – Rio de Janeiro);
- Ácido clorídrico (Vetec – Rio de Janeiro);
- Carbonato de sódio (Synth – São Paulo);
- Cloreto de cálcio dihidratado (Vetec – Rio de Janeiro);
- Cloreto de magnésio hexahidratado (Synth – São Paulo);
- Cloreto de potássio (Vetec – Rio de Janeiro);
- Cloreto de sódio (Vetec – Rio de Janeiro);

- Fosfato de potássio monobásico (Synth – São Paulo);
- Fosfato de sódio dibásico monohidratado (Synth – São Paulo);
- D-Glicose anidra (Synth – São Paulo);
- Hidróxido de sódio (Cinética Química LTDA – São Paulo);
- L-Glutation (Akrós – EUA);
- Lisozima (Sigma-Aldrich – EUA);
- Mucina (Sigma-Aldrich – Alemanha).

4.1.3 Córneas

Córneas frescas isoladas de porcos obtidas no Frigorífico Antônio Carlos, situado em Antônio Carlos - Santa Catarina – Brasil, conservadas em tampão Ringer glutationizado a pH 7,0 durante o transporte até a realização dos ensaios.

4.1.4 Equipamentos e material de consumo

- Agitador magnético Are-Velp Scientifica;
- Aquecedor Etl4-basic Ika Labortechnik;
- Balança analítica Ohaus Corporation AS200S;
- Banho de ultra-som Ultrasonic Cleaner Unique 1400 USC;
- Bomba de vácuo Marconi;
- Capela de fluxo laminar vertical Pachane;
- Centrífuga Sigma 4K 15;
- Centrífuga Sigma 2-15, rotor 12148;
- Coluna LiChrospher RP18-5 (HICHRON - UK);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, equipado com duas bombas LC-10AD VP, detector UV/VIS SPD-10AV VP, workstation Class-VP;
- Espectrofotômetro UV/VIS Perkin Elmer Lambda 10;
- Evaporador rotatório Quimis Q-344B2;

- Membrana de filtração Millex AA 0,8 μ m (Millipore-EUA);
- Membrana éster de celulose Spectra/Por CE MWCO 10000;
- Nanosizer/Zetasizer[®] Nano-ZS Modelo ZEN 3600 (Malvern Instruments - USA).
- pHmetro WTW pH 330i;
- Ponta de ultra-som (Fisher – EUA);
- Unidades de filtração Ultrafree-MC 100000 NMWL (Milipore, EUA);
- Viscosímetro Cannon Fenske AS 350 (Schott);
- Vortex Mixer, modelo VS -1300V.
- Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments - UK)

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Estudo preliminar das condições de preparação de sistemas nanoparticulares contendo 5-fluorouracil

Suspensões de nanoesferas foram preparadas pela técnica de evaporação do solvente, a partir de uma dupla emulsão (a/o/a), adaptada da metodologia desenvolvida por Blanco & Alonso (1997). Brevemente, 50 mg de poli- ϵ -caprolactona (PECL) foram solubilizados em 2,0 mL de acetato de etila em banho de ultra-som, em um tubo de ensaio. Duzentos ou 400 microlitros de uma solução aquosa de tensoativo contendo 5-fluorouracil (5-FU) a 12,5 mg/mL foram acrescentados. A mistura foi submetida à agitação por ponta de ultra-som a 15 W, por 20 segundos, para a formação da emulsão primária a/o. A esta emulsão foram adicionados 2,0 mL de uma solução de tensoativo (Polaxâmero 188, PLU, ou álcool polivinílico, PVA) a 1 % (p/V), e uma nova agitação em ponta de ultra-som, nas mesmas condições descritas anteriormente, formou a dupla emulsão a/o/a. Para completar o volume da dupla emulsão formada, foram adicionados sob agitação magnética 96 mL de uma solução PLU ou PVA a 0,3 % (p/V), respectivamente.

Nas formulações de PECL revestidas pela quitosana (CS), o polissacarídeo foi dissolvido em 96 mL de uma solução aquosa de ácido acético glacial a 0,2 % (v/v), na qual foi posteriormente acrescentado o tensoativo utilizado na preparação da dupla emulsão (PLU ou PVA) para obter uma concentração final de 0,3 %. Essa dispersão foi acrescentada à dupla emulsão formada em substituição à solução de tensoativo utilizada para a diluição da fase externa, nas mesmas condições descritas acima.

A suspensão resultante foi submetida à agitação magnética por 10 minutos e, em seguida o volume da suspensão reduzido a 5,0 mL em rotaevaporador, obtendo-se formulações contendo 0,5 ou 1,0 mg/mL de 5-FU. Com a evaporação do solvente orgânico, o polímero, insolúvel na fase aquosa, solidifica, formando as nanoesferas que contém o fármaco.

A composição das nanoesferas e as formulações avaliadas no estudo preliminar podem ser visualizadas na Tabela 1.

A Figura 3 apresenta uma ilustração esquemática do método de obtenção das nanopartículas contendo 5-FU.

Tabela 1. Composição quali/quantitativa das formulações avaliadas no ensaio preliminar para o estabelecimento das condições de preparação das suspensões de nanopartículas contendo 5-FU.

Fases da Formulação	Composição	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Fase interna aquosa da primeira emulsão	5-FU (mg)	2,5	2,5	2,5	2,5	5,0	5,0	5,0	5,0
	PLU (% p/V)	1	1			1	1		
	PVA (% p/V)			1	1			1	1
	Água qsp (µL)	200	200	200	200	400	400	400	400
Fase externa orgânica da emulsão primária (a/o)	PECL (mg)	50	50	50	50	50	50	50	50
	Acetato de etila (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Fase externa aquosa da dupla emulsão (a/o/a)	PLU (% p/V)	1	1			1	1		
	PVA (% p/V)			1	1			1	1
	Água qsp (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Diluyente da dupla emulsão	PLU (g)	0,3	0,3			0,3	0,3		
	PVA (g)			0,3	0,3			0,3	0,3
	Ác. Acético (mL)		0,2		0,2		0,2		0,2
	CS (g)		0,2		0,2		0,2		0,2
	Água (mL)	96,0	96,0	96,0	96,0	96,0	96,0	96,0	96,0

Nesse estudo, também foram preparadas formulações de nanopartículas com composição quali/quantitativa equivalente às formulações apresentadas na Tabela 1, porém sem a adição do fármaco. Estas formulações foram denominadas nanopartículas brancas.

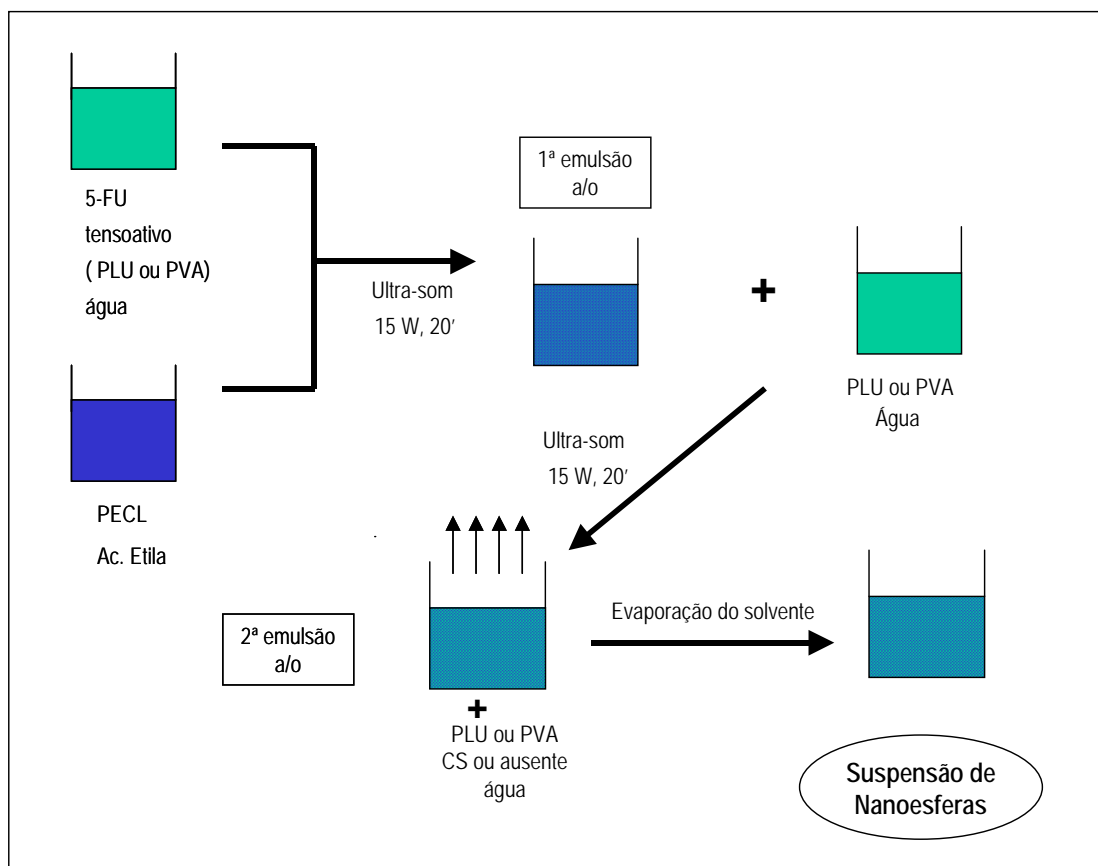


Figura 3. Representação esquemática do método de preparação das suspensões de nanoesferas contendo 5-FU. Adaptado de Blanco & Alonso, 1997

4.2.2 Determinação do diâmetro médio, distribuição granulométrica e potencial zeta das nanoesferas

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das nanoesferas obtidas foram determinados por espectroscopia de correlação fotônica. O potencial zeta foi determinado a partir da mobilidade eletroforética por Anemometria Laser Doppler num campo elétrico de 150 V/cm e ambas medidas foram realizadas em um equipamento Nanosizer/Zetasizer® Nano-ZS Modelo ZEN 3600 (Malvern Instruments

- USA)¹. Na determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica, as suspensões de nanopartículas foram diluídas em água na proporção de 1:500. As medidas foram realizadas em triplicata, sendo o resultado expresso como a média de 10 leituras de cada amostra. Para a determinação do potencial zeta, as amostras foram diluídas em uma solução de NaCl 1 mM, na mesma proporção indicada acima e as medidas analisadas em triplicata.

4.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação do 5-fluorouracil em suspensões de nanoesferas

4.2.3.1 Curva de calibração do 5-fluorouracil em tampão acetato por espectrofotometria no ultravioleta (UV)

Uma solução foi preparada pela diluição da massa exata de aproximadamente 10 mg de 5-FU em 10 mL de água purificada. Posteriormente, alíquotas desta solução-mãe foram diluídas em tampão acetato pH 4,7 para a obtenção de soluções nas concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µg/mL. O tampão acetato pH 4,7 foi preparado com 8,4 g de acetato de sódio e 3,35 mL de ácido acético glacial para 1000 mL de solução (USP XXVI, 2003). As soluções foram preparadas em triplicata e analisadas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta no comprimento de onda de 260 nm. As médias das absorbâncias referentes a cada concentração foram utilizadas para a construção de uma curva de calibração. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados pela análise de regressão linear.

¹ Estes ensaios foram realizados na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela equipe da Professora Doutora Sílvia Stanisquaski Guterres.

4.2.3.2 Determinação da eficiência de encapsulação das nanoesferas contendo 5-FU

Uma alíquota de 500 µL da suspensão de nanoesferas (n=3) foi transferida para uma unidade de filtração (Ultrafree-MC 100000) e centrifugada a 16.708 g por 30 minutos. A seguir, 50 µL do filtrado foram transferidos para um balão volumétrico de 5,0 mL e o volume foi completado com tampão acetato pH 4,7, preparado como descrito em 4.2.3.1. A concentração de 5-FU presente nas amostras foi estimada por espectrometria no UV a 260 nm. Como controle de possíveis variações na leitura decorrentes do equipamento, uma solução de fármaco na concentração de 10 µg/mL foi utilizada como padrão externo.

A eficiência de encapsulação foi calculada como sendo a diferença percentual entre a quantidade inicial de fármaco e aquela encontrada no filtrado, empregando-se a seguinte equação:

$$\text{Eficiência de encapsulação (\%)} = \frac{CI - CF}{CI} \times 100 \quad \text{equação 1}$$

onde:

CI = Concentração inicial

CF = Concentração no filtrado

4.2.4 Determinação do perfil de liberação do 5-FU a partir das nanoesferas de PECL e PECL/CS

4.2.4.1 Solubilidade do 5-FU em tampão fosfato pH 7,4

A massa exata de aproximadamente 200 mg de 5-FU foi diluída em 10,0 mL de tampão fosfato 7,4, preparado conforme especificado na British Pharmacopoeia (1999). A solução foi preparada em triplicata e submetida à agitação magnética por duas horas. Posteriormente, uma alíquota de 500 µL da solução (n=3) foi transferida para unidades de filtração (Ultrafree-MC 100000) e centrifugadas a 16.708 g por 10 minutos. Dez microlitros do filtrado foram transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume completado com tampão acetato pH 4,7, preparado como descrito em 4.2.3.1.

A concentração do fármaco foi determinada por espectrofotometria no UV a 260 nm utilizando a equação da reta calculada como descrito em 4.2.3.1.

4.2.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.2.4.2.1 Condições cromatográficas

A concentração de 5-FU no meio de dissolução foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando cromatógrafo Shimadzu, equipado com duas bombas LC-10AD VP, detector UV/VIS SPD-10AV VP, workstation Class-VP, adaptado da metodologia descrita por Lamprecht (2003). O ensaio foi realizado de acordo com as condições descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação do 5-FU por CLAE.

Característica	Descrição
Detecção	UV ($\lambda = 260$ nm)
Fluxo	0,8 mL/minuto
Coluna	Coluna LiChrospher RP18-5 (25 cm x 4.0 mm) (HICHROM - UK)
Fase Móvel	Acetonitrila:Tampão acetato pH 4,4 (15:85)
Volume de injeção	50 μ L

4.2.4.2.2 Curva de calibração de 5-FU em tampão fosfato pH 7,4 obtida por CLAE

Na preparação da curva padrão foram exatamente pesados aproximadamente 10 mg de fármaco e imediatamente transferidos para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi completado com tampão fosfato pH 7,4. A seguir, alíquotas dessa solução-mãe foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL e o volume completado com o mesmo solvente para a obtenção de soluções de 5-FU nas concentrações de 0,1; 0,5; 0,8; 3,0 e 8,0 μ g/mL. As soluções foram analisadas por CLAE utilizando as condições descritas em 4.2.4.2.1. As soluções foram injetadas no cromatógrafo em triplicata e as médias das áreas referentes a cada concentração foram plotadas em gráfico de concentração *versus* área. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados por regressão linear.

4.2.4.3 Estudo de cinética de liberação do 5-FU a partir das nanoesferas

Uma alíquota de 3,0 mL de suspensão de nanoesferas ou de uma solução aquosa de 5-FU a 0,5 mg/mL foi transferida para o interior do saco de diálise (Spectra/Por CE MWCO 10000). Após seu fechamento, o saco de diálise foi colocado em béquer contendo 297,0 mL de tampão fosfato pH 7,4, esse sistema foi mantido sob agitação magnética constante, a 37 °C, e, no tempo zero e após 15, 30,

60, 120, 240 e 720 minutos, alíquotas de 5,0 mL do meio de liberação foram coletadas para análise. O volume de amostra retirado foi imediatamente repostado com o mesmo meio de liberação. As amostras foram analisadas por CLAE com as condições descritas em 4.2.4.2.1. As análises foram realizadas em triplicata e a concentração do 5-FU foi determinada utilizando-se a equação da reta da curva de calibração do 5-FU em tampão fosfato pH 7,4, conforme descrito em 0.

A partir destes resultados, curvas de liberação do 5-FU, expressas em porcentagem (%) de fármaco liberado *versus* tempo (minutos), foram construídas.

4.2.5 Estudo da interação e estabilidade das nanoesferas de PECL e PECL/CS frente aos componentes do muco ocular

4.2.5.1 Interação com a mucina

A interação das suspensões de nanopartículas com a mucina foi avaliada por meio de medidas de viscosidade, utilizando a técnica de viscosimetria capilar. Misturas de uma dispersão de mucina em água (0,4 mg/mL) com as suspensões de nanopartículas nas proporções 0:100, 10:90, 50:50, 90:10 e 100:0 (V/V) foram preparadas. Para a determinação propriamente dita, foi transferido para um viscosímetro capilar Schott AVS 350-Cannon-Fensk termostartizado a 37 °C, um volume total de 5 mL de cada mistura, no tempo zero e após incubação a 37 °C por 60 e 120 minutos. De acordo com o tempo de escoamento de cada amostra, a viscosidade relativa foi determinada através da equação:

$$V = K.(t - \vartheta)$$

equação 2

onde:

V = viscosidade cinemática (cSt)

K = constante do viscosímetro

t = tempo de passagem da amostra (s)

ϑ = correção da energia cinemática

O viscosímetro capilar utilizado para as medidas de viscosidade da dispersão de mucina foi o de número 75 e constante igual a 0,008. Para o ensaio com a formulação F1 o capilar utilizado foi o de número 100, sendo a constante 0,015. O capilar de número 200 foi utilizado nas medidas de viscosidade da formulação F2, apresentando a constante igual a 1,01. O valor de correção da energia cinemática é fornecida pelo fabricante e relativo a cada tempo específico de ensaio.

Os resultados foram expressos como a média de quinze determinações dos três lotes preparados de cada formulação e analisados estatisticamente empregando a análise de variância (ANOVA).

4.2.5.2 Estabilidade frente a lisozima

A influência da lisozima sobre a estabilidade das suspensões de nanopartículas foi avaliada por meio de medidas de tamanho de partícula e potencial zeta antes e após a incubação com a enzima. Para a realização do estudo uma alíquota de 200 μL de cada uma das suspensões de nanoesferas foi adicionada a 1,0 mL de uma solução aquosa de lisozima 1,0 mg/mL. O tamanho de partícula e o potencial zeta das amostras foram determinados no tempo zero e após duas horas de incubação a 37 °C em banho termostaticado em equipamento Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments - UK)², de acordo com a metodologia descrita em 4.2.2. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram analisados estatisticamente empregando o teste *t* de *Student*.

² Este ensaio foi realizado pelo Dr. Edison Carvalho no Departamento de Farmácia y Tecnología Farmacéutica da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha, gentilmente disponibilizado pela Profa. Maria José Alonso.

4.2.6 Interação *ex-vivo* do 5-FU livre e nanoencapsulado com o tecido corneal

A influência da nanoencapsulação sobre a capacidade de permeação e retenção no tecido corneal do 5-FU foi avaliada *ex-vivo* em células de difusão. Estas células são compostas por dois compartimentos, doador e receptor, cuja interface está desenhada especificamente para manter a curvatura do tecido corneal. Cada compartimento apresenta agitação magnética e aquecimento individual, o que garante a homogeneização das amostras e o controle rigoroso da temperatura durante todo o tempo de ensaio.

Nesse estudo, o total de dez córneas foi utilizado para cada uma das formulações, F1 e F2 e também para a solução de 5-FU. Cada córnea, removida do globo ocular de porcos mediante corte na esclera, foi cuidadosamente colocada na interface das células de difusão. Inicialmente, para a estabilização do tecido corneal, uma alíquota de 3,0 mL de Tampão Ringer glutationizado (TRG) pH 7,0 (ROBINSON, 1989) foi colocada em cada um dos compartimentos da célula de difusão e o sistema foi mantido a 37 °C por 10 minutos, sob agitação magnética constante. A seguir, o TRG do compartimento doador foi substituído por 1,0 mL da solução de 5-FU a 1,0 mg/mL ou 2,0 mL das suspensões de nanoesferas de PECL ou PECL/CS e o volume completado para 3,0 mL com TRG. Desta forma, cada amostra avaliada continha o equivalente a 0,33 mg de 5-FU por mililitro.

Ambos os compartimentos, doador e receptor, foram mantidos sob agitação magnética moderada por duas horas a 37 °C. Transcorrido este tempo, a totalidade da solução contida no compartimento receptor foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferida para tubo de ensaio. A córnea foi retirada da célula de difusão, lavada com solução fisiológica e seca em papel absorvente. A fração excedente da córnea (parte que não estava em contato com a amostra) foi retirada e a fração restante foi pesada em balança analítica.

As amostras foram devidamente armazenadas para os ensaios posteriores, descritos a seguir.

4.2.7 Estudo da retenção corneal *ex-vivo* do 5-FU livre e nanoencapsulado

4.2.7.1 Curva de calibração do 5-FU em acetonitrila/tampão acetato pH 4,4 e metanol a 4,0 % obtida por CLAE

Para a obtenção da curva padrão foram pesados exatamente cerca de 10 mg de 5-FU, imediatamente transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi completado com uma solução de acetonitrila/tampão acetato pH 4,4 (15:85). Alíquotas dessa solução foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL e diluídas no mesmo veículo adicionado de metanol 4,0 % (V/V). As soluções resultantes contendo 0,05; 0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 µg/mL de 5-FU foram analisadas por CLAE, conforme descrito em 4.2.4.2.1. As soluções foram injetadas no cromatógrafo em triplicata e as médias das áreas referentes a cada concentração foram plotadas em gráfico de concentração *versus* área. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados por regressão linear.

4.2.7.2 Determinação das condições de extração do 5-FU do tecido corneal

A quantificação do 5-FU retido nas córneas após o ensaio *ex vivo* em células de difusão foi realizada por CLAE. Para possibilitar esse estudo, foi necessária a otimização de uma metodologia de extração do fármaco contido nas amostras.

Como líquido extrator foi utilizado o álcool metílico (MetOH) devido à solubilidade do fármaco nesse solvente (GENARO *et al.*, 1994).

Para a contaminação das amostras com o fármaco, cerca de 50 mg de córnea foram exatamente pesados e transferidos para um tubo de ensaio (tubo 1), no qual 100 µg de 5-FU foram adicionados através de uma solução de 5-FU a 1,0 mg/mL ou

200 µL de uma suspensão aquosa de nanoesferas. As córneas contendo o fármaco ficaram incubadas por duas horas em banho termostático a 37 °C.

Após o período de incubação das córneas, uma alíquota de 2,0 mL de MetOH foi adicionada ao tubo 1. Este tubo foi agitado em vórtex por dois minutos e, a seguir, centrifugado a 5000 rpm por trinta minutos. Em seguida, uma alíquota de 1,5 mL do sobrenadante foi transferida para um tubo de ensaio previamente identificado (tubo 2).

Para garantir a completa extração do 5-FU uma nova alíquota de 1,0 mL de MetOH foi adicionado no tubo 1, que foi novamente vortexado e centrifugado. Em seguida, uma alíquota de 1,5 mL do sobrenadante do tubo 1 foi transferida para o tubo 2, juntamente com a solução metanólica resultante da primeira etapa de extração.

A concentração de fármaco presente na solução extrativa foi determinada por CLAE, de acordo com as condições cromatográficas descritas em 4.2.4.2.1. A extração foi realizada em triplicata para cada uma das amostras.

A taxa de recuperação do 5-FU foi calculada, considerando as diluições realizadas nas diferentes etapas da extração, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Taxa de recuperação 5-FU (\%)} = \frac{\text{Concentração obtida por CLAE} \times 100}{\text{Concentração inicial}} \quad \text{equação 3}$$

Para avaliar a interferência dos componentes da córnea sobre a extração do fármaco, foi realizado, como controle, o mesmo procedimento citado acima em frações equivalentes de córnea, sem contaminação com o fármaco.

4.2.7.3 Determinação da quantidade de 5-FU retido no tecido corneal após estudo nas células de difusão

As córneas previamente pesadas, foram colocadas em tubo de ensaio (tubo 1) e adicionadas de uma alíquota de 2,0 mL de MetOH. A seguir, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração do 5-FU descrito em 4.2.7.2.

A concentração de fármaco presente na solução extrativa foi determinada por CLAE, de acordo com as condições cromatográficas descritas em 4.2.4.2.1. A concentração do 5-FU foi calculada, considerando as diluições realizadas nas diferentes etapas da extração, de acordo com equação descrita em 4.2.7.2.

4.2.8 Passagem transcorneal *ex vivo* do 5-FU

4.2.8.1 Curva de calibração do 5-FU em acetonitrila/tampão acetato pH 4,4 por CLAE

Nesse estudo a concentração de fármaco presente no compartimento receptor da célula de difusão foi determinada por CLAE. Para isso, uma curva padrão foi construída, onde a massa exata de aproximadamente 10 mg de 5-FU foi diluída em 10 mL de uma solução acetonitrila/tampão acetato pH 4,4 (15:85). Em seguida, alíquotas dessa solução-mãe foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e diluídas no mesmo veículo para a obtenção das seguintes concentrações: 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 µg/mL. As soluções foram preparadas em triplicata e analisadas por CLAE conforme descrito em 4.2.4.2.1. As médias das áreas referentes a cada concentração foram plotadas em gráfico de concentração *versus* área. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados pela análise da regressão linear.

4.2.8.2 Determinação da concentração de 5-FU na solução do compartimento receptor da célula de difusão

As amostras coletadas do compartimento receptor foram adequadamente diluídas em solução de acetonitrila/tampão acetato pH 4,4 (15:85) (USP XXVI, 2003), antes da injeção no cromatógrafo. A quantificação do 5-FU presente na solução do compartimento receptor foi realizada por CLAE, de acordo com as condições cromatográficas descritas em 4.2.4.2.1. Os cálculos da concentração de fármaco obtido foram realizados utilizando a equação da reta proveniente da curva de calibração do 5-FU, descrita em 4.2.8.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO PRELIMINAR DAS CONDIÇÕES DE PREPARAÇÃO DE SUSPENSÕES COLOIDAIS DE NANOESFERAS CONTENDO 5-FLUOROURACIL

A escolha da técnica mais adequada para a encapsulação de fármacos em sistemas nanoestruturados depende principalmente da hidrofília/lipofília do mesmo (ZAMBAUX *et al.*, 1998). A maioria dos métodos mais utilizados para a preparação de sistemas nanoparticulares poliméricos é eficiente para a encapsulação de moléculas lipofílicas. No caso de fármacos hidrofílicos, estes métodos geralmente resultam em uma baixa eficiência de encapsulação, devido à facilidade de difusão do fármaco para a fase externa aquosa (BALA *et al.*, 2004).

O 5-fluorouracil é solúvel em água, etanol e metanol, e é praticamente insolúvel em clorofórmio, éter e benzeno, sendo que a solubilidade aumenta na medida em que se eleva o pH da solução (CLARKE, 2004). Devido à hidrossolubilidade do fármaco, as nanopartículas de 5-FU foram preparadas através da técnica de dupla emulsão (BLANCO e ALONSO, 1997). Nesta técnica, inicialmente é formada por ultrassonicação uma emulsão primária a/o, composta de uma fase orgânica contendo o polímero e uma fase aquosa contendo o fármaco e um tensoativo hidrofílico. Esta emulsão constitui a fase interna da segunda emulsão a/o/a, também obtida por ultrassonicação, cuja fase externa é constituída de uma solução aquosa de tensoativo hidrofílico. As formulações são submetidas à evaporação sob pressão reduzida e concentradas ao volume desejado.

Um estudo de formulação para determinar as condições de preparação dos sistemas nanoparticulares contendo 5-FU foi realizado, visando estabelecer o efeito de algumas variáveis sobre a formação da suspensão, otimizar a eficiência de encapsulação e maximizar o percentual de fármaco no interior das nanopartículas. As variáveis avaliadas foram:

(i) o volume de fase interna aquosa (200 ou 400 μL): um aumento de volume da fase aquosa na emulsão primária pode levar a um maior teor de fármaco nas partículas; por outro lado, este aumento pode conduzir a uma menor eficiência de encapsulação (ZAMBAUX *et al.*, 1998). Considerando a solubilidade do 5-FU em água, 1g em 80 mL, foram utilizados para a formação da emulsão primária 200 ou 400 μL de solução aquosa contendo 12,5 mg/mL de 5-FU, representando 2,5 e 5,0 mg de fármaco, respectivamente.

(ii) o tipo de tensoativo utilizado (PVA ou Polaxâmero 188): na técnica de evaporação do solvente a partir de uma emulsão múltipla a/o/a, é indispensável a presença de um agente estabilizante para a fase dispersa (FLORENCE & WHITEHILL, 1982). O PVA é um dos estabilizantes mais amplamente utilizados com esta finalidade. No entanto, o PVA permanece na superfície das partículas, oferecendo bastante dificuldade à remoção (CARRIO *et al.*, 1991). Uma vez que o PVA é potencialmente carcinogênico (ZAMBAUX *et al.*, 1998) é importante a redução do mesmo da superfície das partículas, e quantidade residual deve ser determinada. Portanto, a substituição deste tensoativo por outro tensoativo hidrofílico admitido para preparações oftálmicas, como é o caso do Polaxâmero 188, passa a ser bastante vantajosa.

(iii) a presença de quitosano na fase externa aquosa da segunda emulsão (zero ou 2 mg/mL, 100 mL): o quitosano é um polissacarídeo catiônico com características que o tornam potencialmente interessante em oftalmologia: biocompatibilidade e bioegradabilidade (PANGBURN *et al.*, 1982; HIRANO *et al.*, 1990), mucoadesividade (HASSAN & GALLO, 1990; LEHR *et al.*, 1992) além da habilidade de aumentar transitoriamente a permeabilidade das barreiras mucosas (ARTURSSON *et al.*, 1994; DODANE *et al.*, 1999). Soluções de quitosano têm sido propostas para aumentar o tempo de permanência de moléculas na superfície ocular (FELT *et al.*, 1999) e o recobrimento de nanocápsulas de PECL com quitosano resultou positivo para melhorar a penetração ocular de indometacina (CALVO *et al.*, 1997).

A partir das variáveis selecionadas, foram preparadas oito diferentes formulações que foram avaliadas macroscopicamente. As formulações que

apresentaram um aspecto leitoso e homogêneo, e ausência de agregados, sedimentos ou precipitados foram consideradas adequadas para os estudos subsequentes. As formulações F4 e F8, contendo respectivamente 200 e 400 µL de fase interna aquosa, ambas elaboradas com PVA como tensoativo e contendo o polissacarídeo quitosano, apresentaram uma quantidade elevada de precipitado. A não formação das nanopartículas nestas formulações foi atribuída à viscosidade elevada da fase externa da segunda emulsão a/o/a, provavelmente por dificultar a difusão do solvente orgânico e, desta forma, comprometer a etapa de solidificação do polímero e formação das partículas. Estas formulações foram, portanto, descartadas dos experimentos realizados a seguir.

5.2 DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO, DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA E DO POTENCIAL ZETA DAS NANOESFERAS

5.2.1 Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica

Nesse estudo foram avaliados o diâmetro médio e a distribuição granulométrica das diferentes formulações de nanoesferas brancas, conforme formulações especificadas na Tabela 1. O ensaio foi realizado empregando-se espectroscopia de correlação fotônica em equipamento Nanosizer/Zetasizer[®] Nano-ZS Modelo ZEN 3600 (Malvern Instruments/USA). O princípio desta técnica está relacionado com o movimento browniano que apresentam os sistemas coloidais. Este movimento causa uma variação na intensidade de luz dispersada quando sobre a suspensão coloidal incide um feixe de luz. Esta variação é função do tamanho das partículas, de modo que quanto maiores são as partículas, mais lentamente se movem, sendo também menor a velocidade das flutuações da luz dispersada.

A técnica utilizada para a formação das partículas é um fator determinante para o seu diâmetro médio, distribuição e morfologia. De acordo com a literatura, a utilização de uma elevada velocidade de agitação em ambas as etapas de emulsificação é necessária e leva à redução do tamanho das gotículas da fase

interna tanto da emulsão primária como da dupla emulsão, possibilitando a obtenção de partículas submicrômicas (BLANCO & ALONSO, 1997). Da mesma forma, resultados obtidos por Bhavsar e colaboradores (2005), no desenvolvimento de nanopartículas-em-micropartículas utilizando poli- ϵ -caprolactona pelo método da dupla emulsão, demonstraram a correlação entre a alta velocidade de homogeneização e o tamanho reduzido das partículas. Assim, devido ao interesse em obter partículas de reduzido tamanho, um sonicador (ponta de ultra-som) foi utilizado tanto na preparação da emulsão primária como na dupla emulsão.

Tabela 3. Diâmetro médio (nm) e índice de polidispersão (I.P.) das diferentes formulações de nanopartículas (resultado de 10 leituras das triplicatas de cada formulação).

Formulação	Diâmetro médio (nm) ($M \pm \sigma$)	Índice de polidispersão
F1	195,2 \pm 2,10	0,32
F2	506,4 \pm 4,07	0,51
F3	516,9 \pm 29,32	0,42
F5	167,8 \pm 7,03	0,33
F6	379,0 \pm 5,71	0,54
F7	525,0 \pm 25,91	0,44

Como pode ser observado na Tabela 3, as variáveis avaliadas afetaram o tamanho médio das partículas obtidas de diferentes formas.

A primeira variável estudada, o volume da fase interna aquosa da emulsão primária, não parece ter uma relação direta com o tamanho da partícula, uma vez que não foram observadas diferenças significativas na comparação das formulações onde a única variação é este parâmetro (F1 e F5; F2 e F6; F3 e F7; teste t de Student, $p < 0,05$).

Por outro lado, o tipo de tensoativo e o revestimento com o polissacarídeo quitosana exercem uma influência marcante sobre o diâmetro médio das partículas obtidas.

A utilização do estabilizante PVA resultou em partículas de tamanhos consideravelmente maiores quando comparados àquelas formulações contendo PLU, sendo que para as formulações F3 e F7 o diâmetro médio obtido foi superior a 500 nm (F1 e F3; F5 e F7; teste t de Student, $p < 0,05$).

O PVA é um dos surfactantes mais comumente utilizados na obtenção de nanopartículas e observa-se que as partículas produzidas com esse tensoativo apresentam altos valores de diâmetro médio, dependentes da concentração utilizada. A adição de PVA na fase externa conduz ao aumento da viscosidade, o que pode afetar o tamanho das partículas, geralmente reduzindo o tamanho à medida que sua concentração aumenta (YANG *et al.*, 2001). Todavia, a dificuldade de remoção dos resíduos do PVA das nanopartículas é um fator problemático envolvendo a utilização desta substância (BOSKIR & SAKA, 2005).

A adição do biopolímero quitosana na fase externa aquosa da segunda emulsão promoveu um aumento no diâmetro médio das nanopartículas de PECL, o que pode ser atribuído ao revestimento das nanopartículas com o biopolímero. A forte interação iônica decorrente das cargas positivas do polímero natural com as cargas negativas apresentadas pelas partículas pode explicar esse fenômeno, claramente demonstrado nos resultados obtidos com as formulações F2 e F6, cujo diâmetro médio é significativamente superior àquele apresentado pelas partículas não revestidas preparadas com o mesmo tensoativo, formulações F1 e F5, respectivamente. Estes resultados corroboram com os obtidos em diferentes estudos (CALVO *et al.*, 1997; CAMPOS *et al.*, 2004), nos quais, independente da técnica de preparação utilizada, a presença de quitosana na formulação resultou em um aumento no diâmetro médio de partícula.

5.2.2 Determinação do potencial zeta

As partículas de uma suspensão coloidal podem conter grupamentos químicos ou adsorver íons capazes de conferir uma carga de superfície à partícula. A medida dessa carga é fundamental porque permite inferir propriedades diretamente relacionadas com a estabilidade físico-química da suspensão, como o tempo de decantação e a redispersibilidade das mesmas. Neste sentido, é desejável que um sistema nanoestruturado apresente uma carga de superfície elevada, já que grandes forças repulsivas tendem a evitar agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes.

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão. Este parâmetro é obtido a partir da determinação dos dados de mobilidade eletroforética, mediante a técnica denominada *Anemometria Laser Doppler*, utilizando-se o equipamento Nanosizer/Zetasizer[®] Nano-ZS Modelo ZEN 3600 (Malvern Instruments - USA) (ALONSO *et al.*, 1991; HOFFMAN *et al.*, 1997). Neste método, a carga elétrica não é medida diretamente, mas após a aplicação de um campo elétrico, que faz com que as partículas movimentem-se em direção ao eletrodo de carga oposta e, desta forma, o potencial elétrico possa ser determinado pela medida da sua velocidade de migração (MALVERN, 2004).

Os valores de potencial zeta das formulações de nanopartículas brancas estudadas são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de potencial zeta (mV) das formulações de nanopartículas brancas pelo método de Anemometria Laser Doppler

Formulação	Potencial Zeta (mV, $M \pm \sigma$)
F1	-19,7 \pm 0,77
F2	+ 60 \pm 1,50
F3	+ 0,38 \pm 0,11
F5	-16,13 \pm 0,44
F6	+ 58,96 \pm 2,5
F7	+ 0,46 \pm 0,32

Conforme pode ser observado na Tabela 4, o potencial zeta foi grandemente influenciado pelas variáveis em estudo nas diferentes formulações.

A influência do volume de fase interna da emulsão primária sobre os valores de potencial zeta foi avaliada nesse estudo. Uma análise de variância, com 95% de confiança, foi efetuada para comparar as formulações F1 x F5 e F2 x F6, onde esta é a única variável existente. Os resultados indicam que o parâmetro avaliado parece não exercer influência sobre o potencial zeta das nanopartículas, uma vez que F calculado (1,80 para F2 x F6; 1,67 para F1 x F5) foi menor que o valor de F tabelado (5,32) ($F < F_{0,05}$).

As nanopartículas de PECL não revestidas de CS, contendo o estabilizante polaxâmero 188, apresentaram cargas de superfície negativas e valores de potencial zeta -19,7 e -16,13 mV para F1 e F5, respectivamente. As nanopartículas contendo o tensoativo PVA apresentaram cargas de superfície próximas a zero, o que pode comprometer a estabilidade do sistema formado. De acordo com Schaffazick e colaboradores (2003), tensoativos não iônicos como o poloxâmero e o PVA tendem a reduzir os valores absolutos de potencial zeta.

Contudo, com a inclusão do biopolímero quitosana foram observados altos valores de potencial zeta e a inversão do sinal, o que pode ser constatado pelos valores obtidos para as formulações F2 e F6. Esses resultados corroboram com aqueles encontrados por Bravo-Osuna e colaboradores (2006) e Campos e

colaboradores (2004), em que a presença do biopolímero quitosana resultou em uma inversão da carga de superfície, com partículas de potencial zeta de sinal positivo e com valores elevados. Esta inversão foi atribuída à deposição do polímero catiônico na superfície das partículas, indicando que o revestimento das mesmas foi efetivado. Portanto, o potencial zeta positivo e o aumento do tamanho de partícula foram considerados evidências da associação da quitosana à superfície das partículas. Por outro lado, um elevado valor de potencial zeta em módulo (> 20 mV) é importante para a estabilidade físico-química das suspensões, uma vez que forças repulsivas tendem a evitar possíveis agregações das nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Assim, os elevados valores de potencial zeta apontam para uma boa estabilidade do sistema.

Os valores de potencial zeta obtidos para as formulações F2 e F6 podem ser particularmente interessantes para a via ocular, uma vez que, as cargas positivas favorecem a mucoadesão dos sistemas nanoparticulares às superfícies mucosas devido ao caráter aniônico da mucina, o que pode prolongar o tempo de contato com a mucosa ocular e, conseqüentemente, influenciar na melhora das oportunidades de penetração da molécula encapsulada (CAMPOS *et al.*, 2004).

5.3 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO NAS SUSPENSÕES COLOIDAIS DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO 5-FLUOROURACIL

A determinação da taxa de associação do fármaco às nanopartículas é fundamental, porém bastante complexa devido à dificuldade em separar o fármaco livre em função da natureza coloidal dos sistemas. Uma técnica amplamente utilizada para este fim é a ultrafiltração/centrifugação, que separa a fase aquosa dispersante da fração de nanopartículas e, assim, permite a quantificação do fármaco livre presente no ultrafiltrado. O conteúdo de fármaco associado é determinado pela diferença entre o total de fármaco contido na suspensão e a quantidade de fármaco livre contido no ultrafiltrado (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Quando um fármaco hidrofílico é encapsulado, como é o caso do 5-FU, uma baixa eficiência de encapsulação pode ser obtida devido a uma possível difusão do mesmo para a fase aquosa externa da dupla-emulsão, fato amplamente demonstrado na literatura (YEH *et al.*, 2000; PEREZ *et al.*, 2001; TAKEUCHI *et al.*, 2001). Neste sentido, em um estudo comparativo, Hombbrero-Perez e colaboradores (2003) observaram uma menor eficiência de encapsulação em micropartículas contendo o fármaco hidrofílico, cloridrato de propranolol, preparadas pela técnica da dupla emulsão/evaporação do solvente (a/o/a) em relação as micropartículas de nifedipina, de caráter lipofílico, obtidas pela técnica da emulsificação/evaporação do solvente (o/a). Os autores atribuem esse resultado à difusão do cloridrato de propranolol em direção à fase aquosa da dupla-emulsão devido ao seu caráter hidrofílico, diminuindo assim a quantidade de fármaco encapsulado.

O método utilizado para quantificar o 5-fluorouracil no ultrafiltrado foi a espectrofotometria de absorção no ultravioleta, utilizando metodologia descrita na USP XXVI (2003). Uma curva de calibração concentração x absorbâncias, cuja equação da reta obtida por regressão linear e coeficiente de regressão podem ser visualizados na Figura 4.

A análise do ponto de intersecção e a determinação dos limites de confiança, da curva de calibração, demonstram a ausência de erro sistemático constante com o emprego da metodologia de espectrofotometria de absorção no ultravioleta estabelecida (ANEXO A). O estudo de validação da metodologia analítica para quantificação do 5-FU por espectrofotometria no UV encontra-se no ANEXO B.

Após a validação da metodologia analítica, a quantidade de fármaco associada às partículas foi determinada utilizando a equação 1 no item 4.2.3.2, e os valores da eficiência de encapsulação determinados constam da Tabela 5.

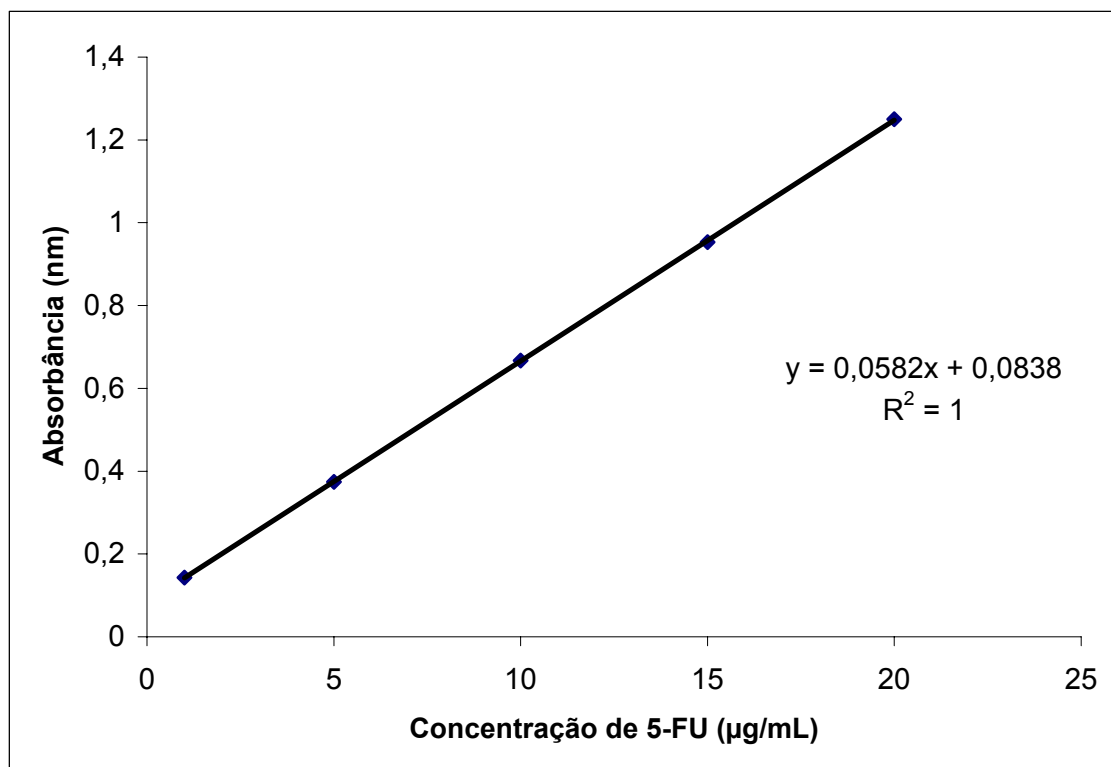


Figura 4. Curva de calibração do 5-fluorouracil obtida por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

Tabela 5. Valores de eficiência de encapsulação do 5-fluorouracil em nanoesferas preparadas pelo método da dupla emulsão.

Formulação	Eficiência de encapsulação (%, $M \pm \sigma$) CV%
F1	59,73 \pm 2,17 3,64
F2	66,03 \pm 1,80 2,7
F3	89,30 \pm 3,07 3,75
F5	39,31 \pm 1,21 3,10
F6	91,73 \pm 0,38 0,40
F7	65,83 \pm 1,92 2,92

A variação na quantidade de 5-FU nanoencapsulada entre as formulações, em torno de 40 a 90%, indica que as diferenças na composição das formulações repercutem sobre a eficiência de encapsulação.

Neste estudo, como nos estudos anteriores, as variáveis em questão são (i) o volume de fase interna aquosa da emulsão primária, (ii) o tipo de tensoativo utilizado e (iii) a presença ou ausência do revestimento com biopolímero quitosana. Através de uma análise de variância ($p \leq 0,05$) foi possível avaliar a influência destes parâmetros sobre a eficiência de encapsulação.

Quando se utiliza a técnica da dupla emulsão para a preparação de nanopartículas, o fármaco, normalmente hidrofílico, é adicionado ao sistema como uma solução que constitui a fase interna da emulsão primária (BLANCO & ALONSO, 1997; SOPPIMATH *et al.*, 2001). Neste estudo foram utilizados dois volumes

diferentes de uma solução de 5-FU de concentração constante de 12,5 mg/mL, como fase interna aquosa. Conseqüentemente, as formulações apresentam concentrações diferentes de fármaco; como a quantidade de polímero é constante, as formulações com maior volume de fase interna aquosa apresentam uma maior relação fármaco:polímero e vice versa.

A observação da Tabela 5 permite constatar que o volume de fase interna da emulsão primária afetou a eficiência de encapsulação do 5-FU, o que foi confirmado estatisticamente pela comparação das formulações que têm este parâmetro como única variação (F1 x F5; F2 x F6; F3 x F7, test t de Student, $p < 0,05$). No entanto, esta influência não se manifesta de uma forma linear. O aumento da relação fármaco:polímero pode ter uma grande influência sobre a eficiência de encapsulação do fármaco. De maneira geral, um aumento da relação fármaco:polímero pode resultar em uma maior taxa de associação (UBRICH *et al.*, 2004). No entanto, ultrapassado um valor limite em que a encapsulação máxima é atingida para um determinado sistema, o excesso de fármaco permanece na fase aquosa externa da suspensão coloidal. Nesse caso, o aumento da relação fármaco:polímero vai resultar em uma menor encapsulação percentual (UBRICH *et al.*, 2004). Este fenômeno poderia explicar parcialmente os resultados observados nas formulações em que a única diferença é o volume de fase interna, F1 x F5; F3 x F7, quando comparadas, indicando que a relação entre a eficiência de encapsulação e a quantidade inicial de fármaco, neste caso, foi inversamente proporcional. Por outro lado, a comparação entre as formulações revestidas com quitosana (F2 e F6) demonstrou um comportamento inverso, onde a maior concentração inicial de 5-FU resultou em maior eficiência de encapsulação.

O diâmetro médio das nanopartículas revestidas com quitosana é consideravelmente maior comparado às suspensões não revestidas, o que confirma que o revestimento das nanopartículas com o polissacarídeo foi efetivado. O maior diâmetro das nanopartículas com quitosana pode ter contribuído para diminuir a difusão do 5-FU do interior da partícula para o meio externo, resultando em uma maior taxa de encapsulação às nanopartículas recobertas, como observado na comparação das formulações F1 x F2; e F5 x F6 (teste t de Student, $p < 0,05$). Além

disso, a alta viscosidade das suspensões contendo o biopolímero pode também caracterizar uma barreira à difusão do fármaco para o meio externo.

Estes resultados demonstram a marcante influência da presença da quitosana sobre a eficiência de encapsulação. No entanto, é necessário destacar que a dissolução da quitosana ocorre em presença de meio ácido, portanto deve ser considerada, ainda, uma possível interferência do pH do diluente da fase externa. Considerando que a maior quantidade inicial de fármaco presente resultou em maior eficiência de encapsulação e que a solubilidade do 5-FU é influenciada pelo pH do meio (SINGH *et al.*, 2005), a maior acidez das suspensões contendo quitosana possivelmente dificultou a difusão do fármaco para a fase aquosa externa da dupla-emulsão. Com o intuito de avaliar esta hipótese, o pH das soluções de tensoativos utilizadas como diluentes da fase externa da segunda emulsão foi avaliado. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de pH referentes às soluções de tensoativos utilizados como diluentes da fase externa da segunda emulsão.

Composição do diluente da fase externa	pH
Solução aquosa de Polaxâmero 188 0,3% (p/V)	6,0
Solução aquosa de PVA 0,3% (p/V)	5,36
Solução aquosa de polaxâmero 188 0,3% + quitosana 0,2% + ácido acético glacial 0,2% (p/V)	3,8

Cabe destacar que, em estudo preliminar, foi avaliada a eficiência de encapsulação do fármaco em meio alcalino, com pH em torno de 9,0. Os resultados de eficiência de encapsulação obtidos nesse estudo foram próximos à zero, demonstrando a forte influência do pH na encapsulação do 5-fluorouracil nas nanopartículas.

O tipo de tensoativo empregado na estabilização da dupla emulsão exerceu uma influência significativa sobre a nanoencapsulação do 5-fluorouracil. A utilização do PVA resultou em uma maior eficiência de encapsulação quando comparada com o Polaxâmero 188, entre as formulações F1 x F3 e F5 x F7 (test t de Student, $p < 0,05$). Possivelmente, essa influência pode ter ocorrido em função das diferentes viscosidades das suspensões, uma vez que aquelas estabilizadas com PVA apresentaram maior viscosidade em comparação às formulações preparadas com o Polaxâmero 188. Esse aumento na viscosidade pode ter dificultado a difusão do fármaco para a fase externa da dupla emulsão, contribuindo para a maior eficiência de encapsulação das formulações estabilizadas com PVA.

Os resultados obtidos até esta etapa permitiram estabelecer que as formulações que apresentam um conjunto de características favoráveis para a continuação deste trabalho foram F1 e F2. Portanto, estas formulações foram utilizadas nos ensaios realizados posteriormente.

5.4 ESTUDO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DO 5-FLUOROURACIL A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS

O estudo da cinética de liberação dos fármacos a partir de sistemas poliméricos nanoestruturados permite elucidar importantes parâmetros relacionados ao sistema, entre eles a influência da composição qualitativa sobre o controle de liberação do fármaco encapsulado, bem como estabelecer os fatores que governam a liberação do mesmo a partir da estrutura coloidal. Além disso, o perfil de liberação *in vitro* a partir de um sistema específico pode fornecer subsídios importantes para inferir sobre o comportamento deste sistema *in vivo*.

A liberação dos fármacos a partir das nanopartículas poliméricas depende de fatores como a dessorção do fármaco da superfície das partículas, a difusão do fármaco através da matriz das nanoesferas, a difusão através da matriz polimérica das nanocápsulas, a erosão da matriz polimérica ou combinação dos processos de difusão e erosão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Vários métodos, como a difusão em

sacos de diálise e a separação baseada na ultracentrifugação, na filtração a baixa pressão ou na ultrafiltração-centrifugação, têm sido utilizados para este fim (SOPPIMATH *et al.*, 2001). A técnica selecionada e executada, a difusão em sacos de diálise, consiste na colocação das suspensões de nanopartículas em sacos de diálise em um meio de liberação sob agitação constante, à temperatura de 37 °C. Este método é considerado prático e com menor possibilidade de indução de erros, por não exigir etapas de filtração ou centrifugação posteriores (WATTS *et al.*, 1990). Portanto, nesse estudo, a técnica de diálise foi empregada na determinação do perfil de liberação do 5-fluorouracil a partir das nanoesferas, utilizando-se como meio de liberação o tampão fosfato pH 7,4.

A realização deste estudo exige condições *sink*, sendo esta condição definida como uma situação de diluição infinita, onde não há saturação do fármaco no seu meio de liberação (WASHINGTON, 1990), e, conseqüentemente, a solubilidade de fármaco no meio de liberação não atua como fator limitante da liberação. Para os estudos de liberação estipula-se que a concentração máxima do fármaco deva ser inferior a 10% da sua concentração máxima de saturação (PRISTA *et al.*, 1995).

Para estabelecer as condições do estudo de liberação, garantindo as condições *sink*, um estudo de solubilidade do 5-FU em tampão fosfato pH 7,4 foi conduzido. Para tanto, uma solução saturada, tendo como veículo o tampão fosfato e um excesso de fármaco, foi obtida e, após os procedimentos de centrifugação e filtração, a quantidade de fármaco solubilizado foi determinada por espectrofotometria de absorção no UV, em comprimento de onda de 260 nm. A concentração de fármaco presente na solução foi determinada empregando-se a equação da reta da curva de calibração do 5-fluorouracil, apresentada na Figura 4. A partir dos resultados obtidos, a solubilidade do 5-FU foi estimada como sendo de 15,6 mg/mL em tampão fosfato pH 7,4, o que permitiu estabelecer as condições do ensaio.

O método utilizado para quantificar o fármaco no meio de liberação e, assim, estabelecer a cinética de liberação do 5-FU a partir das nanoesferas foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para isto, uma curva de calibração foi construída após a análise cromatográfica de soluções de 5-FU em concentrações

variando entre 0,1 e 8,0 $\mu\text{g/mL}$, em tampão fosfato pH 7,4 como diluente. As áreas dos picos, obtidas a partir dos cromatogramas, são apresentadas na Tabela 7. A curva de concentração de 5-fluorouracil *versus* área, bem como a equação da reta e o coeficiente de correlação, obtidos por regressão linear, podem ser visualizados na Figura 5.

Tabela 7. Áreas de pico obtidas após análise das soluções padrão do 5-fluorouracil por CLAE.

Concentração de 5-fluorouracil ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância $\pm \sigma$	CV (%)
0,1	13663 \pm 97,58	0,71
0,5	49021 \pm 914,52	1,86
0,8	65167 \pm 1144	1,76
3	226757 \pm 5806	2,56
8	608244 \pm 3,27	0,0006

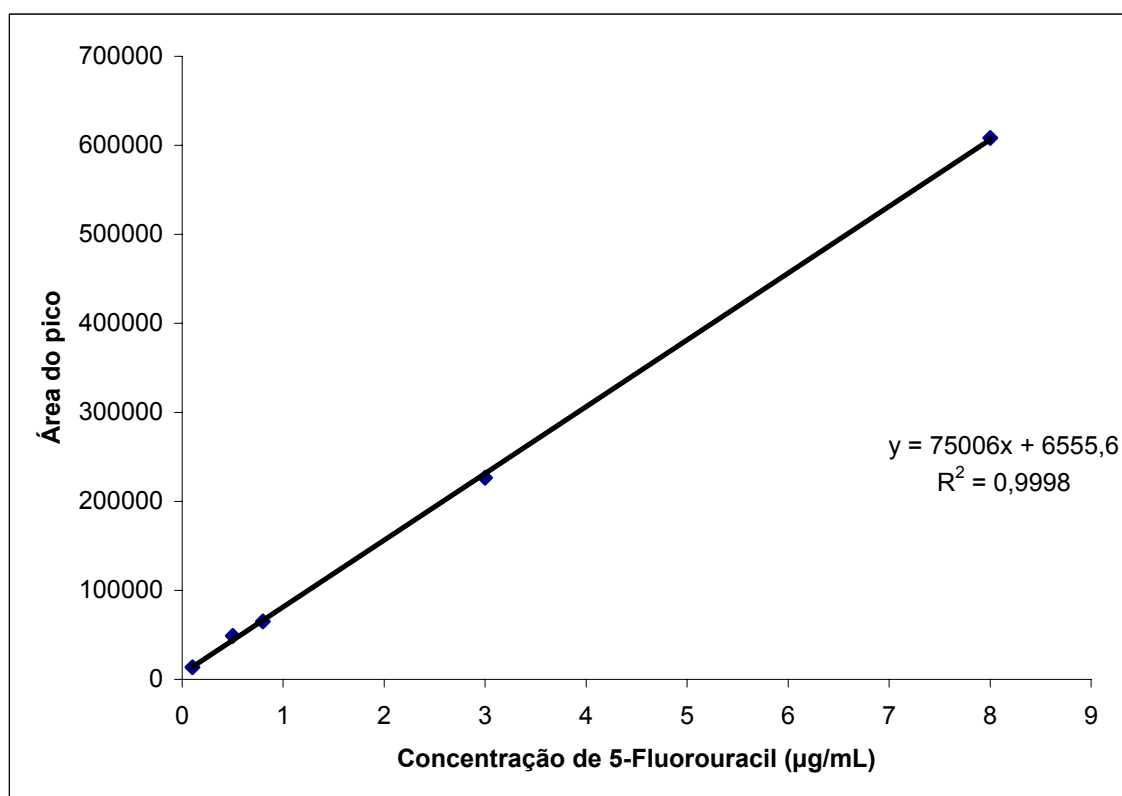


Figura 5. Curva de calibração do 5-fluorouracil em tampão fosfato pH 7,4 obtida por CLAE.

A análise do ponto de intersecção e a determinação dos limites de confiança, da curva de calibração, demonstram a ausência de erro sistemático constante com o emprego da metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência estabelecida (ANEXO C).

5.4.1 Cinética de liberação do 5-fluorouracil a partir das nanoesferas

A Figura 6 apresenta as curvas da cinética de liberação das formulações F1 e F2, bem como de uma solução de 5-FU utilizada como controle.

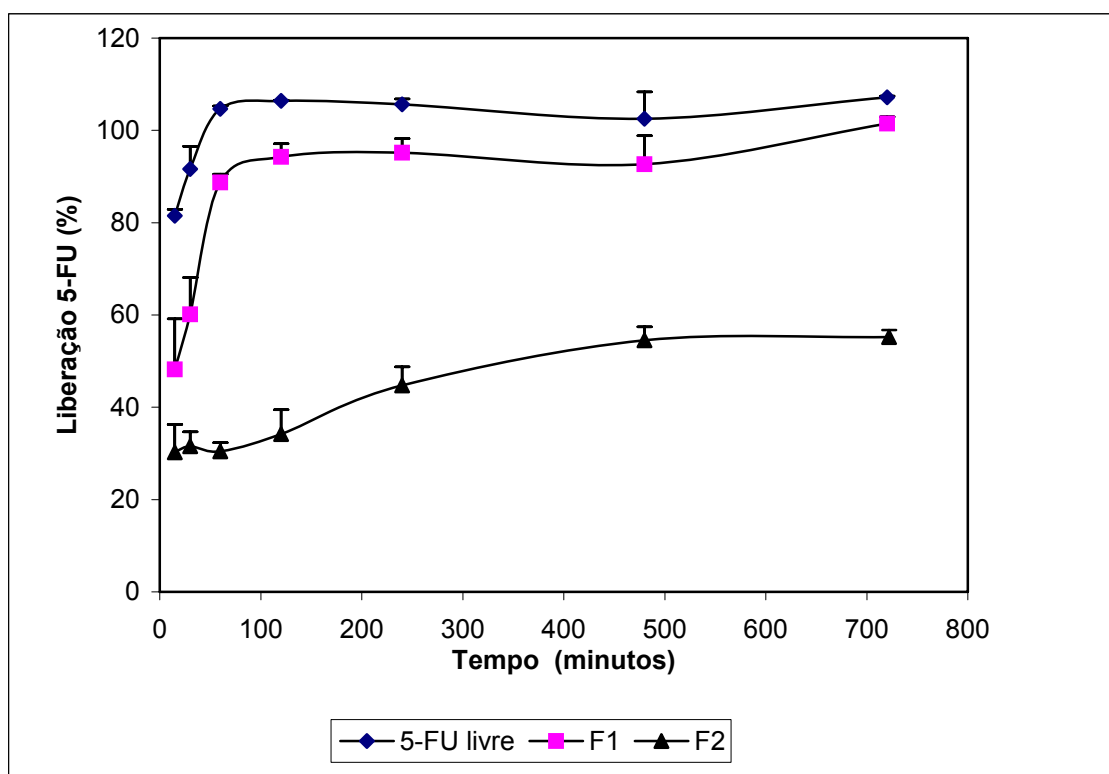


Figura 6. Perfil de liberação do 5-fluorouracil a partir de nanoesferas poliméricas em tampão fosfato pH 7,4 pelo método de diálise (CLAE).

Os resultados apresentados na Figura 6 mostram que o 5-fluorouracil livre difundiu rapidamente para o meio de liberação, sendo que em torno de 81% de fármaco foi liberado nos primeiros 15 minutos e atingiu 100% de liberação em aproximadamente uma hora. A quase imediata e completa liberação do fármaco livre demonstra que a membrana de diálise não constituiu uma barreira para a liberação,

sendo que provavelmente o tempo para o sistema atingir o equilíbrio foi o único fator envolvido no perfil de liberação do fármaco.

A formulação F1, constituída unicamente de PECL, apresentou uma liberação nos primeiros quinze minutos de cerca de 50 % de fármaco para o meio de liberação, atingindo aproximadamente 95 % em 120 minutos. Também é interessante destacar a semelhança da curva de liberação a partir desta formulação com aquela obtida para o fármaco puro, onde a concentração de 5-FU no meio de liberação apresentou-se ligeiramente inferior em todos os pontos, porém mantendo, como o fármaco livre, a maior parte do fármaco liberado nos primeiros sessenta minutos.

Por outro lado, a formulação F2, cujas partículas encontram-se revestidas pela quitosana, apresentou um perfil de liberação diferenciado, com uma liberação de cerca de 30 % nos primeiros 15 minutos, percentual que se manteve praticamente inalterado durante os primeiros 120 minutos. A seguir, a quantidade de fármaco liberada foi aumentando lentamente, atingindo um máximo de 55 % ao longo das 12 horas do estudo.

A rápida liberação de 5-FU nos primeiros quinze minutos, observada em ambas as formulações, pode ser atribuída à quantidade de fármaco adsorvida ou fracamente ligada à superfície das nanopartículas e às condições *sink* nas quais o estudo foi realizado, que favorecem a solubilidade do 5-FU e sua difusão para o meio de liberação (CAMPOS *et al.*, 2001; SOPPIMATH *et al.*, 2001; UBRICH *et al.*, 2004). Este fenômeno, denominado efeito *burst*, já foi anteriormente demonstrado. No estudo da cinética de liberação *in vitro* realizado por Campos e colaboradores (2001), a ciclosporina A, nanoencapsulada em partículas de quitosana, apresentou uma rápida liberação inicial na primeira hora do ensaio, seguida por uma liberação gradual do fármaco durante o período de 24 horas. Li e colaboradores (2001) verificaram que a albumina, utilizada como proteína modelo, associada a nanopartículas de PLGA ou de PLGA-co-poli(etileno)glicol apresentou uma rápida liberação inicial, o que foi atribuído a uma fração da proteína adsorvida à superfície das partículas, porque o perfil de liberação apresentou uma segunda etapa

sustentada, sendo esta atribuída à difusão da proteína através da matriz polimérica e à erosão desta.

A liberação gradual da formulação F2 pelo período de 12 horas, observada na Figura 6, indica que a presença de quitosana na superfície das partículas pode ter exercido influência sobre a velocidade de liberação do fármaco, sendo esta a única diferença na composição das duas suspensões. Esta influência pode ser atribuída a diversos fatores como viscosidade da suspensão, diâmetro médio das nanopartículas e eficiência de encapsulação do fármaco.

Na obtenção das suspensões de nanopartículas F1 e F2, uma maior viscosidade foi observada na formulação F2 devido à presença da quitosana. A elevada viscosidade da suspensão F2 pode ter influenciado a cinética de liberação do 5-FU ao longo do tempo, por dificultar a difusão do fármaco através do saco de diálise. Nestas condições, pode ocorrer uma possível saturação de fármaco ao redor das nanopartículas, diminuindo a velocidade de liberação do fármaco do interior das partículas em direção à fase externa aquosa da suspensão, contribuindo assim para a menor difusão deste para o meio de liberação.

O diâmetro médio das nanopartículas parece também influenciar a cinética de liberação do fármaco, uma vez que partículas com menor diâmetro médio facilitam a difusão do fármaco para o meio de liberação, como observado nos estudos de DUNNE e colaboradores (2000), PAYNAN e colaboradores (2003); LIU e colaboradores (2005). De acordo com os resultados obtidos na caracterização físico-química, o diâmetro médio da formulação F2 é maior em comparação à formulação F1, na ordem de 195 e 500 nm, respectivamente, o que também pode ter proporcionado uma velocidade de liberação mais gradual do 5-FU para a formulação contendo quitosana.

Possivelmente, a maior eficiência de encapsulação do 5-FU apresentada pela formulação F2, quando comparada à F1, pode ter contribuído para a menor velocidade de liberação do fármaco através da matriz polimérica recoberta com a quitosana, uma vez que, quantidades maiores de 5-FU estão presentes no interior

das nanopartículas em relação ao meio externo. Resultados similares foram previamente apresentados por Bozkir e Saka (2005), LIU e colaboradores (2005).

O comportamento da formulação revestida com a quitosana, no que tange à cinética de liberação, demonstra uma liberação sustentada em tampão fosfato, somado às suas propriedades como mucoadesão, biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade indica que esta formulação pode ser interessante para a aplicação em sistemas de liberação controlada, principalmente voltados para a aplicação ocular de medicamentos.

5.5 ESTUDO DA INTERAÇÃO NAS NANOPARTÍCULAS FRENTE AOS COMPONENTES DO MUCO OCULAR

Quando nanopartículas poliméricas são aplicadas sobre a superfície do olho é fundamental avaliar o comportamento destes sistemas frente ao muco ocular. Estes estudos são conduzidos avaliando a influência do contato das formulações com componentes do muco, especialmente aqueles que potencialmente possam acarretar maiores alterações nas formulações, refletindo em sua estabilidade ou em alterações indesejáveis na superfície ocular.

A lisozima, enzima antibacteriana presente em diversos fluidos corporais, é o maior componente protéico do fluido lacrimal. Esta proteína apresenta uma importante atividade enzimática hidrolítica, capaz de promover a degradação metabólica dos fármacos (ANSEL *et al.*, 2000). Além disso, apresenta um caráter catiônico que, na presença de nanopartículas carregadas negativamente, pode ocasionar modificações nas suas propriedades físico-químicas como diâmetro médio e potencial zeta dos sistemas nanoparticulares (CALVO, 1995; CALVO *et al.*, 1997).

A mucina, glicoproteína de alto peso molecular, apresenta-se como componente primário do muco e desempenha um importante papel na melhora da distribuição, estabilidade e coesão do filme lacrimal (KHANVILKAR *et al.*, 2001; LUDWIG, 2005). Esta glicoproteína apresenta características viscoelásticas e, em

pH fisiológico, é carregada negativamente, podendo interagir com moléculas catiônicas presentes no fluido lacrimal.

Com base nessas considerações, no presente estudo avaliou-se o comportamento das suspensões coloidais contendo nanoesferas na presença de componentes do muco ocular mucina e lizosima.

5.5.1 Interação com a mucina

A presença das nanopartículas poliméricas na mucosa ocular não deve gerar modificações que comprometam a viscosidade do fluido lacrimal, de modo a evitar danos ao epitélio corneal (CAMPOS *et al.*, 2003). Portanto, para avaliar a interação e a estabilidade das nanopartículas F1 e F2 na presença de mucina, medidas de viscosidade de uma dispersão de mucina e de misturas da dispersão com diferentes proporções de nanopartículas poliméricas foram realizadas antes e após incubação a 37 °. O estudo foi desenhado de modo a avaliar a interação em função do tempo de contato, bem como das diferentes diluições das suspensões frente à dispersão de mucina. A Tabela 8 e a Tabela 9 apresentam os valores de viscosidade cinemática provenientes da interação entre a dispersão de mucina 0,04 % (p/V) com as suspensões de nanopartículas F1 e F2, respectivamente, nos tempos zero, 60 e 120 minutos de incubação. As seguintes proporções mucina:nanopartículas (V/V) foram empregadas: 0:100; 10:90; 50:50 e 90:10 e as medidas da viscosidade foram calculadas pela equação 2 apresentada em 4.2.5.1.

Tabela 8. Medidas de viscosidade cinemática (cP) da dispersão de mucina (0,4 mg/mL) após incubação com nanopartículas F1 (n=3)

Nanoesferas de PECL (F1) (Média ± σ) CV (%)				
Tempo (min.)	Proporção Mucina:Suspensão			
	0:100	10:90	50:50	90:10
t₀	2,03 ± 0,003 (0,14)	2,07 ± 0,03 (1,46)	1,47 ± 0,002 (0,17)	1,05 ± 0,005 (0,05)
t₆₀	1,54 ± 0,007 (0,46)	1,28 ± 0,005 (0,006)	1,09 ± 0,005 (0,44)	1,05 ± 0,0005 (0,005)
t₁₂₀	1,46 ± 0,015 (1,02)	1,23 ± 0,006 (0,05)	1,11 ± 0,0001 (0,001)	0,96 ± 0,0006 (0,007)

A variação da viscosidade resultante da incubação de mucina:suspensão de nanopartículas foi avaliada estatisticamente, considerando a mesma proporção mucina:suspensão nos diferentes tempos de incubação, e a influência da diluição sobre a viscosidade, para o mesmo tempo de incubação, para cada uma das formulações. Para isso, uma análise de variância, com 95 % de confiança, foi realizada.

A viscosidade da formulação F1 (expressa na Tabela 8 como 0:100) bem como da associação entre a glicoproteína e as nanopartículas apresentaram variações significativas quando ambos os parâmetros determinados foram avaliados (teste t de Student, $p < 0,05$). Contudo, analisando-se a modificação da viscosidade nas diferentes diluições e nos diferentes tempos, é possível observar que os valores de viscosidade se mantiveram maiores ou iguais àqueles da dispersão de mucina sem diluição, que inicialmente era de $0,98 \pm 0,001$ cP. A partir disso, é possível sugerir que, considerando unicamente a interação das suspensões das nanopartículas de PECL com a mucina nas diferentes proporções e tempos avaliados, não ocorreria uma perda de viscosidade do fluido lacrimal que comprometesse a permanência dos fármacos aplicados topicamente.

Tabela 9. Medidas de viscosidade cinemática (cP) da dispersão de mucina (0,4 mg/mL) após incubação com nanopartículas F2 (n=3)

Nanoesferas de PECL/CS (F2) (Média \pm σ) CV (%)				
Tempo (min.)	Proporção Mucina:Suspensão			
	0:100	10:90	50:50	90:10
t₀	27,88 \pm 0,12 (0,42)	4,47 \pm 0,012 (0,28)	2,93 \pm 0,02 (0,64)	2,26 \pm 0,014 (0,62)
t₆₀	11,53 \pm 0,11 (1,01)	2,48 \pm 0,0003 (0,013)	1,60 \pm 0,001 (0,007)	1,98 \pm 0,019 (0,97)
t₁₂₀	10,95 \pm 0,09 (0,82)	1,94 \pm 0,021 (1,06)	1,11 \pm 0,001 (0,01)	1,22 \pm 0,01 (0,83)

A análise estatística dos resultados de viscosidade obtidos pela incubação da formulação F2 (expressa na Tabela 9 como 0:100) e da associação mucina:suspensão de nanopartículas demonstrou variações significativas com relação às variáveis avaliadas, tempo de incubação e proporção dispersão de mucina:suspensão de nanopartículas ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos demonstraram que as nanopartículas de PECL/CS sofreram alterações na sua viscosidade em função do tempo de incubação. É possível observar também que a associação entre a formulação F2 e a dispersão de mucina promove uma marcante diminuição na viscosidade da formulação. Neste caso, possivelmente este fato esteja relacionado com a interação entre as moléculas da quitosana e da mucina durante o período de incubação.

A capacidade mucoadesiva da quitosana já foi amplamente discutida na literatura. Polímeros catiônicos apresentam propriedades mucoadesivas superiores, devido à sua capacidade de desenvolver forças de atração molecular por interações eletrostáticas com as cargas negativas do muco (LEHR *et al.*, 1992; GRABOVAC *et al.*, 2005; WANG, *et al.*, 2006). Esse fenômeno se dá pela formação de ligações

químicas secundárias como as pontes de hidrogênio ou interações iônicas entre as cargas positivas dos grupos amina do biopolímero e as cargas negativas dos resíduos de ácido siálico das mucinas (CAMPOS *et al.*, 2003; LUDWIG, 2005; WANG *et al.*, 2006).

Cabe salientar que, em consonância com os resultados observados para a formulação F1, a associação entre a formulação F2 e a dispersão de mucina também resultou em medidas de viscosidade maiores do que a viscosidade inicial apresentada pela dispersão de mucina ($0,98 \pm 0,001$ (cP)). Portanto, a formulação contendo quitosana, quando em contato com a mucina presente no muco ocular, poderá incrementar o tempo de permanência dos medicamentos na superfície do globo ocular.

5.5.2 Avaliação da estabilidade das nanopartículas frente a lisozima

A estabilidade das nanoesferas brancas na presença de lisozima foi avaliada através de medidas de diâmetro médio e potencial zeta, pela comparação dos valores obtidos antes e após a incubação das suspensões coloidais com uma solução aquosa de lisozima 1,0 mg/mL. O tamanho de partícula e o potencial zeta foram determinados no tempo zero e após duas horas de incubação a 37 °C em banho termostático, em equipamento Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments - UK).

Tabela 10. Propriedades físico-químicas das nanopartículas após a incubação das suspensões coloidais com uma solução aquosa de lisozima (0,04%).

Tempo (minutos)	Potencial Zeta (mV \pm σ)		Diâmetro médio (nm \pm σ) (i.p)	
	t ₀	t ₁₂₀	t ₀	t ₁₂₀
F1	- 23,64 \pm 0,4	- 14,57 \pm 0,99	184,47 \pm 6,64 (0,15)	598,77 \pm 218,85 (0,98)
F2	+ 60,2 \pm 1,07	+ 36,50 \pm 1,0	362,80 \pm 33,85 (0,98)	327,73 \pm 24,22 (0,52)

Os resultados apresentados na Tabela 10 indicam que o tamanho de partícula da formulação F1 sofreu uma elevação significativa, após duas horas de incubação com a solução de lisozima (ANOVA, $p < 0,05$). Esse comportamento, provavelmente, é decorrente da interação da enzima com este sistema coloidal, já que, devido ao seu caráter catiônico, a lisozima apresenta capacidade de adsorver-se à superfície negativa das nanopartículas formadas com PECL, modificando assim o diâmetro médio das partículas. Estes achados corroboram com estudo realizado por Calvo e colaboradores (1997). Além disso, a elevação observada no índice de polidispersão da formulação F1 (de 0,15 para 0,98), também é um indicativo de uma possível agregação ocorrida em função da interação entre a lisozima e as nanoesferas, o que pode caracterizar uma instabilidade das nanopartículas de PECL na presença da enzima (CALVO *et al.*, 1997). Cabe salientar que o aumento no desvio-padrão do diâmetro médio observado após a incubação, também sugere a agregação ocorrida entre as partículas.

Por outro lado, a incubação das nanoesferas recobertas com quitosana na presença de lisozima, não influenciou significativamente o diâmetro médio das nanopartículas ($p < 0,05$). A discreta diminuição observada no tamanho das nanopartículas revestidas com quitosana, apesar de não significativa, poderia ser atribuída a uma hidrólise parcial de algumas moléculas do biopolímero, causada pela lisozima. Resultados similares foram reportados por Campos e colaboradores (2003).

Após a incubação das nanopartículas com a solução de lisozima, o potencial zeta de ambas as formulações, F1 e F2, foi significativamente afetado ($p < 0,05$). A alteração, em módulo, no potencial zeta apresentado pela formulação F1, pode ser decorrente da interação da lisozima com as nanopartículas carregadas negativamente, devido ao caráter catiônico da enzima e sua capacidade de adsorver-se à superfície negativa das nanopartículas (CALVO *et al.*, 1997).

Em contrapartida, a alteração do potencial zeta detectado na formulação com quitosana é surpreendente, devido à natureza catiônica da lisozima, e, conseqüentemente, não seria esperada uma interação significativa com nanopartículas revestidas com o biopolímero catiônico. Em estudo realizado por Campos e colaboradores (2003), nanopartículas de quitosana não apresentaram modificações na sua carga de superfície após incubação com a lisozima, em condições de estudo semelhantes.

5.6 INTERAÇÃO *EX VIVO* DO 5-FU LIVRE E NANOENCAPSULADO COM O TECIDO CORNEAL

Com o objetivo de avaliar a interação do 5-FU livre e nanoencapsulado com a córnea e a sua capacidade de permear o tecido corneal, um estudo *ex vivo*, utilizando-se uma célula de difusão foi executado. Como descrito em 4.2.6, esta célula consiste de dois compartimentos, doador e receptor, cuja interface está desenhada especificamente para manter a curvatura do tecido corneal. Cada compartimento apresenta agitação magnética e aquecimento individual, o que garante a homogeneização das amostras e o controle rigoroso da temperatura durante todo o tempo de ensaio. Este estudo permite avaliar a influência da nanoencapsulação e estabelecer diferenças resultantes das características superficiais das nanopartículas sobre a sua interação com a córnea.

Para a realização desse estudo foram utilizadas córneas de porco, bastante utilizadas como modelo em ensaios *ex vivo* (VAN VREESWIJK & PAMEYER, 1998;

ALVIM *et al.*, 2003). Após o abate dos animais em frigorífico da região de Florianópolis, foi realizada a enucleação dos olhos e as córneas coletadas foram conservadas em TGR, em banho de gelo, até o início do estudo. Cabe destacar que os animais não foram sacrificados especificamente para a realização do estudo já que o abate é um procedimento de rotina do estabelecimento, portanto este estudo não foi submetido à apreciação da CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais).

Para a extração e quantificação do 5-FU retido nas córneas após o estudo, no qual o tecido corneal esteve em contato com as amostras por duas horas, foi necessário desenvolver e validar metodologia específica utilizando CLAE, devido à carência de estudos publicados contemplando uma metodologia que possibilitasse uma adequada extração do 5-FU do tecido corneal.

O método de extração desenvolvido, descrito em 4.2.7.2, foi resultante de diversos ensaios previamente realizados, nos quais foram avaliadas diferentes técnicas de extração. Parâmetros como diferentes concentrações de solvente, tempo de agitação por vórtex e comparação entre as técnicas de agitação por vórtex e ultra-som, foram empregados. Nesse sentido, uma melhor taxa de recuperação do 5-FU foi obtida a partir da técnica descrita.

A determinação da quantidade de 5-FU extraída do tecido corneal foi realizada por CLAE. Inicialmente, foi construída uma curva de calibração de 5-fluorouracil. As áreas dos picos, obtidas a partir dos cromatogramas, são apresentadas na Tabela 11. A curva de concentração de 5-fluorouracil *versus* área, bem como a equação da reta e o coeficiente de correlação, obtidos após análise da regressão linear, podem ser visualizados na Figura 7.

Tabela 11. Áreas de pico obtidas após análise das soluções padrão do 5-fluorouracil por CLAE.

Concentração de 5-fluorouracil ($\mu\text{g/mL}$)	Área do pico $\pm \sigma$	CV (%)
0,05	7502 \pm 2,16	0,02
0,1	10717 \pm 535,66	4,99
0,3	26622 \pm 1851	6,9
1	87905 \pm 133,85	0,15
3	240756 \pm 526,75	0,23

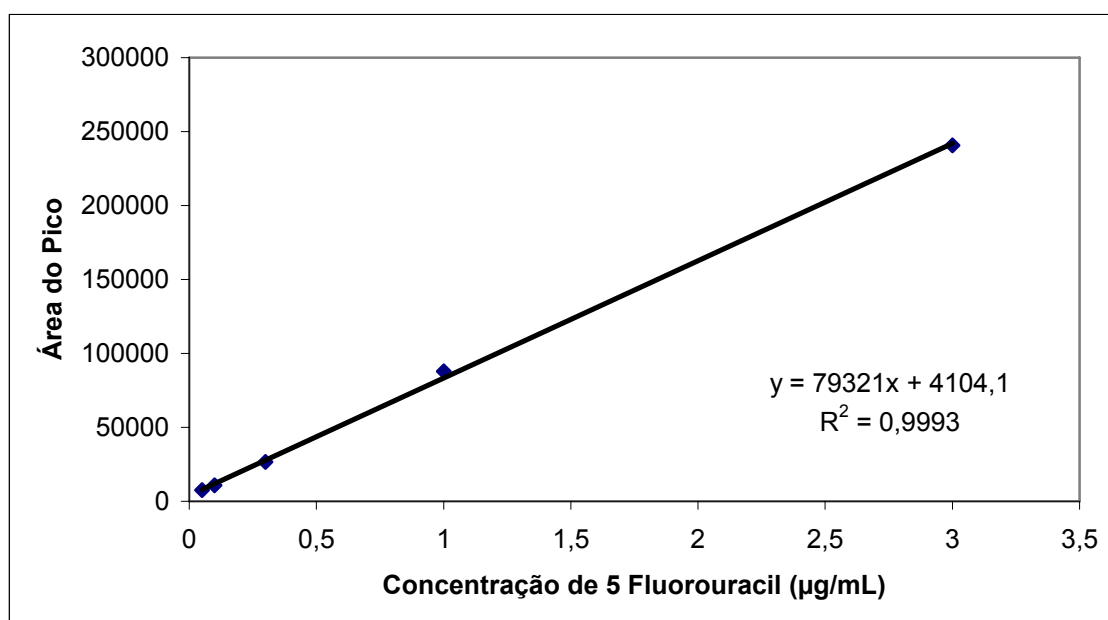


Figura 7. Curva de calibração do 5-fluorouracil em solução de acetonitrila/tampão acetato pH 4,4 (15:85) com metanol 4,0 % (V/V), obtida por CLAE.

A análise do ponto de intersecção e a determinação dos limites de confiança, da curva de calibração, demonstram a ausência de erro sistemático constante com o emprego da metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência estabelecida (ANEXO D).

A taxa de recuperação do 5-FU, extraído das córneas, foi calculada de acordo com a equação 3 apresentada em 4.2.7.2.

Os resultados obtidos no estudo prévio de determinação das condições de extração do 5-FU retido nas córneas demonstraram a eficiência do método desenvolvido, onde a taxa de recuperação do fármaco para a solução de fármaco livre, formulação F1 e formulação F2, foi de $98,40\% \pm 1,84$, $103,05\% \pm 0,53$ e $82,69\% \pm 2,47$, respectivamente. Na análise das amostras resultantes do processo de extração das córneas sem fármaco foi possível determinar a ausência da interferência dos componentes da córnea sobre o método de extração estabelecido. Portanto, com base nos resultados desse estudo preliminar, o método desenvolvido foi considerado válido para a condução dos ensaios de extração do 5-FU das córneas utilizadas no estudo *ex-vivo* em células de difusão.

5.6.1 Extração do 5-FU retido no tecido corneal após estudo nas células de difusão

Após a otimização da metodologia de extração do 5-FU do tecido corneal, o ensaio *ex vivo* em célula de difusão foi executado. Durante a realização do ensaio *ex vivo*, córneas foram submetidas à igual procedimento, porém sem a adição de nanopartículas ou de solução do fármaco no compartimento doador, que continha apenas TGR. O ensaio cromatográfico das amostras obtidas após a realização do processo de extração destas córneas não detectou interferências no tempo de retenção 5-FU, demonstrando que os componentes da córnea não exerceram influência na quantificação deste fármaco por CLAE.

Os resultados desse estudo estão demonstrados na Tabela 12. Cabe salientar que os altos valores de coeficiente de variação observados são característicos dos ensaios *ex vivo* devido a variações pertinentes à utilização de amostras biológicas. De acordo com a Resolução 899 de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os valores de coeficiente de variação obtidos em análises bioanalíticas não devem exceder os 15 %, portanto os valores de coeficiente de variação obtidos encontram-se dentro dos parâmetros exigidos pela legislação.

Tabela 12. Quantidade de 5-fluorouracil (mg/g) extraído das córneas de porco, em estudo *ex vivo* em células de difusão (CLAE).

Formulação contendo 5-FU	5-Fu (mg/g, M \pm σ , CV %)
5-FU livre	0,22 \pm 0,02 (12,5)
F1	0,34 \pm 0,03 (9,37)
F2	0,4 \pm 0,04 (11,67)

A diferença resultante na quantidade de 5-FU retida nas córneas proveniente das formulações F1 e F2 e solução de fármaco livre, demonstra a variação do comportamento das diferentes formulações avaliadas quanto à capacidade de interação com o tecido corneal. A análise de variância demonstrou uma diferença significativa entre todos os resultados obtidos ($p < 0,05$).

Possivelmente, esta diferença observada entre a solução de fármaco livre e as formas nanoestruturadas esteja relacionada com a natureza hidrofílica do 5-FU (SINGH *et al.*, 2005), que dificulta a retenção do fármaco livre no epitélio corneal. Devido às suas características lipofílicas, a camada epitelial da córnea representa a principal barreira para a penetração fármacos hidrossolúveis no tecido ocular (JÄRVINEN *et al.*, 1995).

A nanoencapsulação do 5-FU contribuiu para o aumento da quantidade de fármaco retida no tecido corneal. Nanopartículas de PECL apresentaram uma quantidade de 5-FU retida na córnea superior àquela obtida pelo fármaco livre. Esse fato pode estar relacionado com a capacidade dos sistemas nanoestruturados em atravessar o epitélio corneal levando consigo a molécula encapsulada. CALVO e colaboradores (1995), através de estudo com microscopia confocal de fluorescência, observaram que nanocápsulas de PECL marcadas com rodamina 6G atravessam o epitélio corneal segundo um mecanismo de transporte transcelular. Em outro estudo, o incremento da penetração ocular de indometacina encapsulada em nanopartículas de PECL foi observado em comparação a uma solução comercial do fármaco, utilizada como referência (CALVO *et al.*, 1996).

O desempenho da formulação F2 observado nesse estudo sugere que a nanoencapsulação causou um efeito promotor da retenção do fármaco na córnea e que a modificação das características de superfície das nanopartículas permitiu a essa formulação alcançar uma maior interação com a córnea, e conseqüentemente, apresentar uma maior capacidade de retenção no tecido corneal.

Dentre as inúmeras vantagens discutidas na literatura acerca da utilização da quitosana em sistemas coloidais destaca-se a sua propriedade mucoadesiva. Este polissacarídeo apresenta cargas positivas em pH fisiológico e seu caráter policatiônico permite estabelecer fortes atrações eletrostáticas com subestruturas aniônicas presentes no muco (LEHR *et al.*, 1992; CAMPOS, 2002; WANG *et al.*, 2005). Certamente, a mucoadesividade da quitosana é, em parte, responsável pela sua capacidade em aumentar a absorção de fármacos através das mucosas (WANG *et al.*, 2005), tornando-o um interessante polímero para a liberação de fármacos nesses tecidos (LEHR *et al.*, 1992). O potencial da quitosana para essa aplicação específica tem sido reforçado pela sua capacidade em abrir de forma transitória as uniões íntimas das células epiteliais, facilitando, portanto, o transporte de substâncias em superfícies mucosas (JANES *et al.*, 2001). A avaliação da penetração de nanopartículas de quitosana no tecido corneal por microscopia confocal de fluorescência, realizada por Campos e colaboradores (2003), indica que as nanopartículas de quitosana penetram no epitélio corneal por um mecanismo combinado paracelular/transcelular devido especificamente a esta capacidade da quitosana.

5.6.2 Permeação *ex vivo* do 5-FU

Após o ensaio *ex vivo* nas células de difusão, o 5-FU presente na solução do compartimento receptor foi quantificado por CLAE, visando avaliar a capacidade dos sistemas nanoestruturados desenvolvidos em incrementar a permeação corneal do fármaco nanoencapsulado comparado ao fármaco livre.

Surpreendentemente, não foi possível a detecção do fármaco no tampão do compartimento receptor quando ambas as formulações, F1 e F2, foram utilizadas, principalmente porque a presença de 5-FU foi detectada quando a solução de fármaco livre foi utilizada no ensaio de permeação. De acordo com trabalhos publicados previamente, quantidades superiores de fármaco são esperadas com a utilização dos sistemas coloidais em comparação às soluções de fármaco livre, na permeação em tecidos biológicos (CALVO *et al.*, 1997; FELT *et al.*, 1999).

Possivelmente algumas limitações, implícitas na realização desse ensaio *ex vivo* contribuíram para a obtenção dos resultados controversos. Dentre elas, cabe salientar uma provável variação nas diferentes amostras de córneas, decorrente do intervalo de tempo existente entre o abate de cada animal e o início do estudo de permeação. Além disso, o tempo relativamente curto empregado na realização do ensaio (duas horas), pode ter sido o responsável pela não permeação corneal do 5-FU liberado das nanopartículas.

Por outro lado, a combinação dos resultados obtidos nos estudos de retenção e permeação corneal, sugere que principalmente a formulação F2, revestida com quitosana, parece ser um importante veículo para a aplicação oftálmica de fármacos no tecido corneal. Deste modo, essa formulação pode ser considerada uma alternativa promissora no tratamento de patologias extra-oculares como a neoplasia intra-epitelial córneo-conjuntival, caracterizada por tumores benignos que acometem o epitélio da superfície ocular e que apresenta resultados favoráveis com a terapia tópica com 5-fluorouracil.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados experimentais e nas discussões demonstradas, são apresentadas a seguir as conclusões, que respondem aos objetivos propostos.

- A técnica da dupla-emulsão demonstrou-se eficiente para a obtenção das nanopartículas do fármaco hidrofílico, que apresentaram um aspecto leitoso e homogêneo e ausência de agregados.
- As formulações contendo quitosana e álcool polivinílico apresentaram uma quantidade elevada de precipitado. Possivelmente, a maior viscosidade da fase aquosa externa da dupla emulsão a/o/a tenha dificultado a difusão do solvente orgânico e, assim, comprometido a etapa de formação das partículas. Desse modo, estas formulações foram descartadas dos experimentos realizados na seqüência.
- A eficiência de encapsulação do 5-FU nas nanopartículas pareceu ser afetada pelo caráter hidrofílico do fármaco devido à sua tendência em se difundir para a fase aquosa externa da dupla-emulsão, variando entre 39,31 e 91,73 %.
- Fatores como a maior viscosidade das suspensões decorrentes da adição de quitosana ou PVA às formulações, e menores valores de pH das diferentes suspensões, proporcionaram maiores quantidades de fármaco encapsulado nas nanopartículas revestidas com quitosana e naquelas estabilizadas com PVA. Estes resultados indicam que tais fatores dificultaram a difusão do 5-FU para a fase aquosa externa da dupla emulsão.
- O tamanho nanométrico das nanopartículas obtidas pela técnica da dupla emulsão, apresentando diâmetro médio entre 195 e 500 nm, caracteriza um

resultado interessante, já que esse fator é determinante para a passagem dos sistemas coloidais através do epitélio corneal.

- O potencial zeta das nanopartículas estabilizadas com polaxâmero 188 variou entre $-6,13$ e -19 mV para as formulações sem quitosana e, entre $+ 58,96$ e $+ 60$ mV, para as nanopartículas revestidas com o biopolímero.
- A adição da quitosana às suspensões proporcionou um aumento no diâmetro médio das partículas e uma inversão da carga superficial das nanoesferas, resultados atribuídos à deposição do polímero catiônico na superfície das partículas, indicando que o revestimento das mesmas foi efetivado com o emprego da técnica da dupla emulsão. Cabe salientar que este é um resultado inédito, uma vez que até o momento não há relatos da utilização da quitosana para o revestimento de nanopartículas obtidas pelo método da dupla emulsão.
- Os resultados obtidos no estudo preliminar de formulação permitiram selecionar as formulações F1 e F2, ambas contendo 2,5 mg/mL de 5-FU e Polaxâmero 188 1 % como tensoativo, para a continuidade dos estudos. A diferença entre as duas formulações é o recobrimento das partículas com o polissacarídeo catiônico quitosana na formulação F2, ausente na formulação F1.
- Os resultados obtidos na cinética de liberação do 5-FU in vitro demonstraram que 95 % do fármaco contido nas nanopartículas da formulação F1 foram liberados após uma hora de ensaio. Porém, a capacidade da quitosana em promover uma liberação prolongada do 5-FU para o meio de liberação demonstrou-se superior quando, após doze horas de ensaio, 55 % do fármaco havia difundido através da membrana de diálise.
- A incubação das nanopartículas F1 e F2 com dispersão de mucina e nas proporções 0:100, 90:10, 50:50 e 10:90, demonstrou variações significativas nas medidas da viscosidade das amostras com relação às variáveis avaliadas no estudo, tempo de incubação e proporção dispersão de mucina:suspensão de nanopartículas ($p < 0,05$). Contudo, observa-se que quando utilizadas ambas as

formulações, os valores de viscosidade se mantiveram maiores ou iguais àqueles da dispersão de mucina ($0,98 \pm 0,001$ cP).

- A incubação da formulação F1 com a lisozima resultou em agregação das nanopartículas, possivelmente resultante das interações decorrentes entre as cargas positivas presentes na solução de lisozima e a carga superficial negativa das nanopartículas de PECL. Já com a formulação F2, não foram observadas alterações significativas no diâmetro médio das partículas.
- O desenvolvimento e a validação do método de extração do 5-FU a partir das córneas foi considerado um ponto relevante desse estudo devido à carência de publicações nesse sentido.
- A capacidade de retenção das nanopartículas no epitélio corneal foi observada no ensaio *ex vivo*, apontando a possibilidade de formação de um sistema reservatório para a liberação gradual de fármacos através da mucosa.
- O estudo de permeação *ex vivo* em células de difusão, utilizando as córneas de porcos deve ser redesenhado considerando as possíveis interferências das condições das amostras obtidas sobre a permeabilidade de fármaco através da córnea.

Desta forma, do ponto de vista biofarmacêutico, as suspensões de nanopartículas desenvolvidas neste trabalho apresentaram um potencial interessante como sistemas de liberação de fármacos na superfície ocular. Os resultados provenientes deste estudo, especialmente com a formulação contendo o biopolímero quitosana, apontam para novas perspectivas no campo da terapia tópica ocular de patologias extra-oculares.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G., FESSI, H. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): Formulation and process optimization. *Int J Pharm.* v. 309, p. 178-188, 2006.

ALONSO, M. J., LOSA, C., CALVO, P., VILA-JATO, J. L. Improvement of ocular penetration of amikacin sulphate by association to poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. *J Pharm Pharmacol.* v. 43, p. 548:552, 1991.

ALONSO, M. J. Las nanopáticas poliméricas: nuevos sistemas para mejorar la biodisponibilidad ocular de fármacos. *Arc Soc Esp Oftalm.* n. 8, p. 1-3, 2001.

ALONSO, M. J. SANCHEZ, A. The potencial of chitosan in ocular drug delivery. *J Pharm Pharmacol.* v. 55, n. 11, p. 1451-63, 2003.

ALSARRA, I. A., ALARIFI, M. N. Valited liquid chromatographic determination of 5-fluorouracil in human plasma. *J Chromat B.* v. 804, p. 435-39, 2004.

ALVIM, H. S., DINIZ, C. M., TZELIKIS, P. F. M., GONÇALVES, R. M., MAIA, J. A. C. 9Técnica para preparação e conservação de olhos de porco para cirurgia experimental. *Arq Brás Oftalmol.* v.66, n.5, 2003. Disponível em <http://www.scielo.com.br>. Acesso em abril de 2005.

ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., ALLEN JR, L. V. **Farmacotécnica – Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos.** 6 ed. EUA, Editora Premier, 2000.

ARTURSSON, P., LINDMARK, T., DAVIS, S. S., ILLUM, L. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells. *Pharm Res.* v. 11, p. 1358-1361, 1994.

AZEVEDO, M. M. M. Nanoesferas e liberação controlada de fármacos. Disponível em <http://lqes.iqm.unicamp.br>. Acesso em 13/02/06.

BAEYENS, V., GURNY, R. Chemical and physical parameters of tears relevant for the design of ocular drug delivery formulations. *Pharm Acta Helv.* v. 72, p. 191-202, 1997.

BALA, I., HARIBARAN, KUMAR, R. M. N. V. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Eur J.* v. 39, n. 5, p. 173-191, 2004.

BHAVSAR, M. D., TIWARI, S. B., AMIJI, M. M. Formulation optimization for nanoparticles-in-microsphere hybrid oral delivery system using factorial design. *J Controlled Release*. v. 110, p. 422-430, 2005.

BILATI, U., ALLEMANN, E., DOELKER, E. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) protein-loaded nanoparticles prepared by the double emulsion method-processing and formulation issues for enhanced entrapment efficiency. *J Microencapsul*. v. 22, n. 2, p. 205 -14, 2005.

BLANCO, M. D., ALONSO, M. J. Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. *Eur J Pharm Biopharm*. v. 43, p. 287-294, 1997.

BOONSONGRIT, Y., MITREVEJ, A., MUELLER, B. Chitosan drug binding by ionic interaction. *Eur J Pharm Biopharm*. v. 62, p. 267-274, 2005.

BOSKIR, A., SAKA, O. M. Formulation and investigation of 5-FU nanoparticles with factorial design-based studies. *IL Farmaco*. p. 2-6, 2005.

BOURLAIS, C. L., ACAR, L., ZIA, H., SADO, P. A., NEEDHAM, T., LEVERGE, R. Ophthalmic Drug Delivery Systems-Recent Advances. *Prog Retin Eye Res*. v. 17, n. 1, p. 33-58, 1998.

BRANNON-PEPAS, L., BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Del Rev*. p.1-11, 2004.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". In: VISALEGIS. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>. Acesso em junho/2004.

BRAVO-OSUNA, I., SCHMITZ, T., BERNKOP-SCHNURCH, A., VAUTHIER, C., PONCHEL, G. Elaboration and characterization of thiolated chitosan-coated acrylic nanoparticles. *Int J Pharm*. v. 316, p. 170-175, 2006.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Crown Copyright, 1999.

CALVO, M. P. S. *Desarrollo de nuevos sistemas coloidais y su aplicación en la administración tópica ocular de medicamentos*. Santiago de Compostella, 1995. Tese (Doutorado em Farmacia) – Departamento de Farmacologia y Tecnología Farmacêutica, Universidad de Santiago de Compostela, Espanha.

CALVO, P., SÁNCHEZ, A., MARTINEZ, A., LÓPEZ, M. I., CALONGE, M., PASTOR, J. C., ALONSO, M. J. Polyester nanocapsulas as new topical ocular delivery systems for cyclosporin A. *Pharmaceutical Research*. v. 13, n. 9, p. 1423, 1996.

CALVO, P., VILA-JATO, J. L., ALONSO, M. J. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsiones, as ocular drug carriers. *J Pharm Sci*. v. 85, p. 530-536, 1996.

CALVO, P., VILA-JATO, J. L., ALONSO, M. J. Effect of lysozyme on the stability of polyester nanocapsules and nanoparticles: stabilization approaches. *Biomaterials*. v. 18, n. 19, p. 1305-1310, 1997.

CALVO, P., VILA-JATO, J. L., ALONSO, M. J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carries. *Int J Pharm*. v. 153, p. 41-50, 1997.

CAMPOS, A. M. *Evaluación biofarmacéutica de sistemas coloidales para el transporte de medicamentos por vía ocular*. Santiago de Compostela, 2002. Tese (Doutorado em Farmacia) – Departamento de Farmacologia y Tecnologia Farmacéutica, Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.

CAMPOS, A. M., SÁNCHEZ, A., ALONSO, M. J. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Int J Pharm*. v. 224, p. 159-168, 2001.

CAMPOS, A. M., SANCHEZ, A., GREF, R. CALVO, P. ALONSO, M. J., The effect of PEG versus a chitosan coating on the interaction drug colloidal carriers with the ocular mucosa. *Eur J Pharm Sciences*. v. 20, p. 73-81, 2003.

CAMPOS, A. M., DIEBOLD, Y., CARVALHO, E. L., SANCHEZ, A., ALONSO, M. J. Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems: *in vitro* stability, *in vivo* fate, and cellular toxicity. *Pharm Res*. v. 21, p. 803-810, 2004.

CAPONE, A. J., LANCE, S. E., FRIEND, J., THOFT, R. A. *In vivo* effects of 5-FU on ocular surface epithelium following corneal wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. v. 28, n. 10, p. 1661-1667, 1987.

CARRIO, A., SCHWACH, G., COUDANE, J., VERT, M. Preparation and degradation of surfactant-free PLAGA microspheres. *J Controlled Release*. v. 37, p. 113-121, 1991.

CHIANG, C. H., TUNG, S. M., LU, D. W., YEH, M. K. *In vitro* and *in vivo* evaluation of an ocular delivery system of 5-fluorouracil microspheres. *J Ocul Pharmacol Ther*. v. 17, n. 6, p. 545-553, 2001.

CHRAI, S. S., PATTON, T. F., MEHTA, A., ROBINSON, J. R. Lachrymal and instilled fluid dynamics in rabbit eyes. *J Pharm Sci.* v. 62, p. 1112-1121, 1973.

Clarke's Analysis of Drug and Poisons (Book on CD-Room). London: Pharmaceutical Press, 2004.

DODANE, V., KHASN, M. A., MERWIN, J. R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int J Pharm.* v. 182, p. 21-32, 1999.

DUNNE, M., CORRIGAN, O. I., RAMTOOLA, Z. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation proprieties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials.* V. 21, p. 1659-1668, 2000.

ESPANA E. M., CHODOSH J., MATEO A. J., DI PASCUALE M. A., TSENG S. C. Retinoides tópicos como tratamento no invasivo de la neoplasia intraepitelial conjuntival. *Microcirurgia ocular*, n. 4, 2003. Disponível em [http:// www.scielo.com.br](http://www.scielo.com.br). Acesso em março de 2006.

FARIA, T. J. *Avaliação da passagem transcorneal do agente antitumoral metotrexato encapsulado em nanopartículas de poli-(D,L-lático) (PLA) e co-polímero dibloco do poli-(D,L-lático) e do polietilenoglicol (PLA-PEG)*. Florianópolis. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

FELT, O., FURRER, P., MAYER, J.M., PLAZZONET, B., BURI, P., GURNY, R. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. *Int J Pharm.* v. 180, p.185-193, 1999.

FELT, O., CARREL, A., BAEHNI, P., BURI, P., GURNY, R. Chitosan as tear substitute: a wetting agent endowed with antimicrobial efficacy. *J. Ocular Pharmacol. Ther.* v. 16, p. 261-270, 2000.

FIALHO, S. L., REGO, M. G. B., CARDILLO, J. A., SIQUEIRA, R. C., JORGE, R. JÚNIOR, A. S. C. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. *Arq. Bras. Oftalmol.* v. 66, n.6, p. 891-896, 2003.

FLORENCE, A. T., WHITEHILL, D. Stabilization of water/oil/water multiple emulsions by polymerization of the aqueous phases. *J Pharm Pharmacol.* v. 34, n. 11, p. 687-691, 1982.

FUNCK, W., DAMMANN, V., DONNEVERT, G. *Qualitätssicherung in der analutischen chemie*. Weinheim: VHC, 1992.

GAGO, F. Quimioterapia antineoplásica. In: Del Rio, J. Farmacología Básica. Madrid: Editorial Sintesis, 1996. p. 519-533.

GENNARO, A. A. R. *et al.* **Remington Farmacia**. 17. ed. Buenos Aires: Panamericana, 1987.

GENTA, I., CONTI, B., PERUGINI, P., PAVANETTO, F., SPADARO, A., PUGLISI, A. Bioadhesive microspheres for ophtalmic administration of acyclovir. *J Pharm Pharmacol.* v. 49, p. 737-742, 1997.

GEROSKI, D. H., EDELHAUSER, H. F. Transscleral drug delivery for posterior segment disease. *Adv Drug Del Rev.* v. 52, p. 37-48, 2001.

GILMAN, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill Interamericana Editores, 1996.

GRABOVAC, V., GUGGI, D., BERNKOP-SCNÜRCH. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Adv Drug Del Rev* v. 57, p.1713-1723, 2005.

GREAVES, J. L., WILSON, C. G., BIRMINGHAM, M. C., BENTLEY, H. Scintigraphic studies on the corneal residence of a New Ophthalmic Delivery System (NODS): rate of clearance of a solution marker in relation to duration of pharmacological action of pilocarpine. *Br J Clin Pharmacol.*, v. 33, p. 603-609, 1992.

HASSAN, E. E., GALO, J. M. A simple rheological method for the *in vivo* assessment of mucin polymer bioadhesive bond strenght. *Pharm Res.* v. 7, p. 491-495, 1990.

HE, P., DAVIS, S. S., ILLUM, L. *In vitro* valuation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int J Pharm.* v. 166, p. 68-75, 1998.

HENRIKSEN, I., GREEN, L., SMART, J. D., SMISTAD, G., KARLSEN, J. Bioadhesion oh hydrated chitosans: an *in vitro* and *in vivo* study. *Int J Pharm.* v. 145, p. 231-240, 1996.

HIRANO, S., SEINO, H., AKIYAMA, I., NONAKA, I. Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administration. In: Gebelein, C. G. e Dunn, R. L. (eds). **Progress in Biomedical Polymers**. New York: Pelnun Press, p. 283-289, 1990.

HOFFMANN, F., CINALT, J., KABICHOVA, H., KREUTER, J., STIENEKER, F. Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer

nanoparticles with a permanent positive surface charge. *Int J Pharm.* v. 157, n. 2, p. 189-198, 1997.

HOMBRERO-PEREZ, M., SIEPMANN, J., ZINUTTI, C., LAMPRECHT, A., UBRICH, N., HOFFMAN, M., BODMEIER, R., MAINCENT, P. Non-degradable microparticles containing a hydrophilic and/or a lipophilic drug: preparation, characterization and drug release modeling. *J Controlled Release.* v 88, p. 413-428, 2003.

JANES, K. A., CALVO, P., ALONSO, M.J. Polyssaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv Drug Del Rev.* v. 47, p. 83-97, 2001.

JÄRVINEN, K., JÄRVINEN, T., URTTI, A. Ocular absorption following topical delivery. *Adv Drug Del Rev.* v. 16, p. 3-19, 1995.

KAUR, I. P., KANWAR, M. Ocular preparations: the formulations approach. *Drug Dev Ind Pharm.* v. 28, p. 473-493, 2002.

KAUR, I. P., GARG, A., SINGLA, A. K., AGGARWAL, D. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. *Int J Pharm.* v. 269, p. 1-14, 2004.

KHANVILKAR, K., DONOVAN, M. FLANAGAN, D. Drug transfer through mucus. *Adv Drug Del Rev.* v. 48, p. 173-193, 2001.

KREUTER, J. Nanoparticle-based drug delivery systems. *J Controlled Release.* v. 16, n. 169-176, 1991.

KREUTER, J. Evaluation of Nanoparticles as Drug-Delivery Systems. I: Preparation Methods. *Pharm Acta Helv,* v. 58, n. 7, p. 196-208, 1983.

KUMAR, R. M. N. V., MUZZARELLI, R. A. A., MUZZARELLI, C., SASHIWA, H., DOMB, A. J. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chem Rev.* v. 104, p. 6017-6084, 2004.

LAMPRECHT, A., YAMAMOTO, H., TAKEUCHI, H., KAWASHIMA, Y. Microsphere design for the colonic delivery of 5-fluorouracil. *J Controlled Release,* v. 90, p. 313-322, 2003.

LANGER, K., ZIMMER, A., KREUTER, J. Acrylic nanoparticles for ocular drug delivery. *S T P Pharma Sciences.* v. 7, n. 6, p. 445-451, 1997.

LEE, V. H. L., ROBINSON, J. R. Topical ocular drug delivery: recent developments and future challenges. *J Ocul Pharmacol.* v. 2, p. 67-108, 1986.

LEE, V., BENTLEY, C.R., OLVER, J. M. Sclerosing canalculitis after 5-fluorouracil breast cancer chemotherapy. *Eye*, v. 12, p. 343-9, 1998.

LEHR, C., M., BOUWSTRA, J. A., ETIENNE, H. S., JUNGINGER, H. E. *In vitro* evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int J Pharm.* v. 78, p. 43-48, 1992.

Li, Y. P., Pei, Y. Y., Zhang, X. Y., Gu, Z. H., Zhou, Z. H., Yuan, W. F., Zhou, J. J., Zhu, J. H., Gao, X. J. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J Controlled Release.* v. 71, p. 203 -211, 2001.

LIU, M. DONG, J., YANG, Y., YANG. X., XU, H. Characterization and release of triptolide-loaded poly (D,L-lactic acid) nanoparticles. *Eur Polym J.* v. 41, p. 375-382, 2005.

LOSA, C., CALVO, P., CASTRO, E., VILA-JATO, J. L., ALONSO, M. J. Improvement of ocular penetration of amikacin sulphate by association to poly(butylcyanoacrylate)nanoparticles. *J Pharm Pharmacol.* v. 43, n. 8, p. 548-552, 1991.

LOSA, C., ALONSO, M. J., ORALLO, F., MARTINEZ J., Saavedra, J.A. y Pastor, J.C. Reduction of cardiovascular side effects associated with ocular administration of metipranolol by inclusion in polymeric nanocapsules. *J. Ocul. Pharmacol.* v. 8, 191-198, 1992.

LOSA, C., MARCHAL-HEUSSLER, L., ORALLO, F., VILA-JATO, J. L., ALONSO, M. J. Design of new formulations for topical ocular administration: polymeric nanocapsules containing metipranolol. *Pharm Res.* v. 10, p. 80-87, 1993.

LUDWIG, A., The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv Drug Del Rev.* v. 57, p. 1595-1639, 2005.

MAINARDES, R. M., URBAN, M. C. C., CINTO, P. O., KHALIL, N. M., CHAUD, M. V., EVANGELISTA, R. C., GREMIÃO, M. P. D. Colloidal Carriers for Ophthalmic Drug Delivery. *Current Drug Targets*, v. 6, p. 363-371, 2005.

MAINO, D. M., TRAN, S., MEHTA, F. Side effects of chemotherapeutic oculo-toxic agents: a review. *Clin Eye Vis Care.* v. 12, p. 113-117, 2000

MALVERN INSTRUMENTS. Disponível em:
<http://www.malvern.co.uk/labeng/ptproducts/iwtm.html>. Acesso: Dezembro de 2005.

MOSBY'S DRUG CONSULT, Mosby, Inc. An Imprint of Elsevier Scienc. St Louis, 2002.

MURAD, A M., KATZ, A. **Oncologia – Bases Clínicas do Tratamento**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1996.

MUZZARELI, R., BALDASSARE, V., CONTI, F., FERRARA, BIAGINI, G. Biological activity of chitosan: ultrasonical study. *Biomaterials*. v. 9, p.247-252, 1988.

PANGBURN, S. H., TRESCONY, V. Y., HELLER, J. Partially deacetylated chitin and its use in self-regulated drug delivery systems. Em: **Chitin, Chitosan and related enzymes**. London: Ed. Zikakis, J. P., Academic Press, p. 3-19, 1982.

PANYAN, J., DALI, M. M., SAHOO, S. K., MA, W., CHKRAVARTHI, S. S., AMIDON, G.L., LEVY, R. J., LABHASTWAR, V. Polymer degradation and *in vitro* release of a model protein from poly (D,L-lactide-co-glycolide) nano and microspheres. *J Controlled Release*. v. 92, p. 173-187, 2003.

PEPPAS, A. N., HUANG, Y. Nanoscale technology of monoadhesive interactions. *Adv Drug Del Rev*. v. 56, p. 1675-1687, 2004.

PEREZ, C., SANCHEZ, A., PUTNAM, D., TING, D., LANGER, R., ALONSO, M. J. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *J Controlled Release*. v. 75, p. 211-224, 2001.

PIZZARELLO L. D., JAKOBIEC F. A., 1978 apud ESPANA E. M., CHODOSH J., MATEO A. J., DI PASCUALE M. A., TSENG S. C. Retinoides tópicos como tratamento no invasivo de la neoplasia intraepitelial conjuntival. *Microcirurgia ocular*, n. 4, 2003. Disponível em [http:// www.scielo.com.br](http://www.scielo.com.br). Acesso em março de 2006.

PRASAD, S., KAMATH, G. G., PHILLIPS, R. Lacrimal canalicular stenosis associated with systemic 5-fluorouracil therapy. *Acta Ophthalmol. Scand.*, v. 78, p. 110 -113, 2000.

PRISTA, N. L., ALVES, A. C., MORGADO, R. **Tecnologia Farmaceutica**. 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Culbenkian, 1995.

RICHARDSON, S. C. W., KOLBE, H. V. J., DUNCAN, R. Potencial of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatible, body distribution y ability to complex and protect DNA. *Int J Pharm.* v. 178, p. 231-243, 1999.

ROSCA, I. D.; WATARI, F.; UO, M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *J Controlled Release*, v. 99, p. 271-280, 2004.

SANTOS, S. A. L., BARBOSA, R. L., SOUZA, L. B. Neoplasia intra-epitelial córneo-conjuntival (NIC) – Relato de um caso atípico. *Arq Bras Oftalmol.* v. 67, p. 819-821, 2004.

SCHAFFAZICK, S. R; GUTERRES, S. S., FREITAS, L. L., POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova.* v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SINGH, B. N., SINGH, R. B. SINGH, J. Effects of ionization and penetration enhancers on the transdermal delivery of 5-fluorouracil through excised human stratum corneum. *Int J Pharm.* v. 298, p.98-107, 2005.

SKEEL, R. T., LACHANT, N. A., **Handbook of Cancer Chemotherapy.** 4 ed., New York: Little Bronw and Company, 1995.

SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T. M., KULKARINI, A, R., RUDZINSK, M. C. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Controlled Release*, v. 70, p. 1-20, 2001.

STRUSZCZYK, H., NIEKRASZEWICZ, A., OCZAREK, K., WISNIEWSKA-WRONA, M. Biodegradation of chitosan. In: Karnicki, Z. S. (ed) Chitin world. *Proc Int. Conf. Chitin Chitosan*, p. 550-554, 1994.

TAKEUCHI, H., HIROMITSU, Y., KAWASHIMA, Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv Drug Del Rev.* v. 47, p. 39-54, 2001.

TOJO, K., ISOWAKI, A. Pharmacokinetic model for *in vivo/in vitro* correlation of intravitreal drug delivery. *Adv Drug Del Rev.* v. 52, p.17-24, 2001.

TOROPAINEN, E., RANTA, V. P. VELLONEN, K.S., PALMGREN, J., TALVITIE, A., LAAVOLA, M., SUHONEN, P., HAMALAINEM, K. M., AURIOLA, S., URTTI, A. Paracellular and passive transcellular permeability in immortalized human corneal epithelial cell culture model. *Eur J Pharm Sci.* v. 20, n.1, p. 99-106, 2003.

UBRICH, N., BOUILLOT, P., PELLERIN, C., HOFFMAN, M., MAINCENT, P. Preparation and characterization of propranolol hydrochloride nanoparticles: a comparative study. *J Controlled Release*. v. 97, p. 291-300, 2004.

UICC – União Internacional Contra o Câncer – **TNM Classificação dos Tumores Malignos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1998.

USP 26, United States Pharmacopeial Convention, Inc., 2003.

VAN VREESWIJK, H., PAMEYER, J. H. Inducing cataract in postmortem pig eyes for cataract surgery training purposes. *J Cataract Refract Surg*. v. 24, p. 17-18, 1998.

VANDERVOORT, J., LUDWIG, A. Preparation and evaluation of drug-loaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use. *Eur J Pharm Biopharm*. v. 57, n.2, p. 251-261, 2003.

VASIR, K. J., TAMBWEKAR, K., GARG, S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. *Int J Pharm*. v. 255, p. 13-32, 2003.

VELEZ, G., YUAN, P., SUNG, C., TANSEY, G., REED, G. F. CHN, C. C., NUSSENBLATT, R. B., ROBINSON, M. R. Pharmacokinetics and toxicity of intravitreal chemotherapy for primary ocular lymphoma. *Arch Ophthalmol*. v. 45, n. 5, p. 416-444, 2001.

VIEIRA, S., HOFFMANN, R. **Estatística Experimental**. São Paulo: Atlas, 1989.

VILA JATO, J. L. Nuevas formas de administración de medicamentos. In: **Tecnología Farmacêutica: Aspectos fundamentais dos sistemas farmacêuticos e operações básicas**. Ed. Sintesis, Madrid-Espanha, 1997.

WANG, L., GU, Y. SU, Z. MA G. Preparation and improvement of release behavior of chitosan microspheres containing insulin. *Int J Pharm*. v. 311, p. 187-195, 2006.

WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. *Int J Pharm*. v. 58, p. 1-12, 1990.

WATTS, P. J., DAVIES, M. C., MELIA, C. D., Microencapsulation Using Emulsification/Solvent Evaporation: An Overview of Techniques and Applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. v. 7, n. 3, p. 235-259, 1990.

WILSON, M. W., CZECHONSKA, G., FINGER, P. T., RAUSEN, A, HOOPER, B. S., BARRET, G. H. *Surv Ophthalmol.*, v. 45, n. 5, p. 416-444, 2001.

WOOD, R. W., KREUTER, R., LI, V. H., ROBINSON, J. R. Ocular disposition of poly-hexyl2-cyano-[3-14Cacrylate] nanoparticles in the albino rabbit. *Int J Pharm.* v. 23, p. 175-183, 1985.

YANG, Y., CHUNG, T., PING, N. Morphology, drug distribution, and *in vitro* release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*, v. 22, p. 231-241, 2001.

YEATTS, R. P., NICHOLAS, E. E., CURRY, C. D., FORD, J. G., WALTER, K. A. 5-Fluorouracil for the treatment of intraepithelial neoplasia of the conjunctiva and cornea. *Ophthalmology.* v. 107, p. 2190-2195, 2000.

YEH, M. K., TUNG, S. M., LU, D. W., CHEN, J. L., CHIANG, C. H. Formulation factors for preparing ocular biodegradable delivery system of 5-fluorouracil microparticles. *J Microencapsul.* v. 18, n. 4., p. 507-519, 2001.

ZAMBAUX, M. F., BONNEAUX, F., GREF, R., DELLACHERIE, E., VIGNERON, C. Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. *J Controlled Release.* v. 5, n. 60, p.179-88, 1999.

ZAMBAUX, M. F., BONNEAUX, F., GREF, R., MAINCENT, P., DELLACHERIE, E., ALONSO, M. J., LABRUDE, P., VIGNERON, C. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J Controlled Release.* v. 50, p. 31-40, 1998.

ZIMMER, A., KREUTER, J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. *Adv Drug Del Rev*, v.16, p. 61-73, 1995.

8 ANEXOS

ANEXO A - Análise do ponto de intersecção e determinação dos limites de confiança da curva de calibração do 5-FU por espectrofotometria de absorção no ultravioleta

Tabela 13. Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração do 5-FU por espectrofotometria de absorção no ultravioleta

Parâmetros de regressão	Valores
Intercepto (intervalo de confiança)	0,0838 (-0,0432 a 0,2110)
Inclinação (intervalo de confiança)	0,0582 (0,04 a 0,2236)
R^2	1,0

ANEXO B - Validação do método de doseamento do 5-FU por espectrofotometria de absorção no ultravioleta

Com a finalidade de avaliar a precisão do método de doseamento por espectrofotometria de absorção no ultravioleta em condições experimentais idênticas como equipamento, analista, temperatura e reagentes, o teste de repetibilidade foi aplicado com uma solução de 5-FU na concentração de 10 µg/mL em tampão acetato pH 4,74. A repetibilidade foi estimada em termos de coeficiente de variação (CV%). O resultado obtido no teste de precisão se mostrou adequado à análise, já que os valores de CV% encontrados foram inferiores a 5% para a concentração avaliada, conforme demonstrado na Tabela 14. Além disso, foi observada também a exatidão do método aplicado através do percentual de recuperação do analito, sendo que a concentração obtida deve ficar entre 98,0 a 102,0% do esperado.

Tabela 14. Valores de absorbância, concentração e recuperação de 5-FU obtidos após análise por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

Amostras	Absorbância (nm)	Concentração de 5-FU (µg/mL)	Recuperação (%)
Padrão 1	0,659	9,88	98,38
Padrão 2	0,661	9,91	99,17
Padrão 3	0,670	10,07	100,72
Padrão 4	0,664	9,96	99,70
Padrão 5	0,675	10,1	101,58
Média ± σ	0,67 ± 0,005	10,0 ± 0,10	100 ± 1,02
CV (%)	0,88%	1,01	1,02

ANEXO C - Análise do ponto de intersecção e determinação dos limites de confiança da curva de calibração do 5-FU em tampão fosfato pH 7.4, por CLAE.

Tabela 15. Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração do 5-fluorouracil por cromatografia líquida de alta eficiência.

Parâmetros de regressão	Valores
Intercepto (intervalo de confiança)	6555,6 (-1050,11 a 14161,31)
Inclinação (intervalo de confiança)	75006 (74225,06 a 75786,94)
R^2	0,9998

ANEXO D - Análise do ponto de intersecção e determinação dos limites de confiança da curva de calibração do 5-FU em solução de acetonitrila/tampão acetato pH 4,4 (15:85) adicionada de metanol a 4,0 % (V/V).

Tabela 16. Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração do 5-fluorouracil por cromatografia líquida de alta eficiência

Parâmetros de regressão	Valores
Intercepto (intervalo de confiança)	4104,7 (-215,80 a 8425,21)
Inclinação (intervalo de confiança)	79321 (75581,3 a 83060,67)
R^2	0,9993

ANEXO E - Determinação da taxa de recuperação do 5-FU no estudo das condições de extração do 5-FU retido nas córneas.

Tabela 17. Taxa de recuperação do 5-FU extraído de córneas de porco com solução metanólica em estudo preliminar.

Amostra	Quantidade de 5-FU (%) (n=3)		Quantidade de 5-FU (%) (M ± σ) CV (%)
	Amostra 1	Amostra 2	
Córnea + 5-FU livre	Amostra 1	97,10	98,4 ± 1,84 (1,87)
	Amostra 2	97,10	
	Amostra 3	101,00	
Córnea + F1	Amostra 1	103,06	103,5 ± 0,53 (0,51)
	Amostra 2	103,7	
	Amostra 3	102,4	
Córnea + F2	Amostra 1	80,00	82,69 ± 2,47 (3,0)
	Amostra 2	82,10	
	Amostra 3	85,97	
Córnea sem fármaco	Amostra 1	ausente	
	Amostra 2	ausente	
	Amostra 3	ausente	