



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

**Tatiane Sartori**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO  
METOTREXATO. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E VIABILIDADE DO TECIDO  
CORNEAL APÓS ADMINISTRAÇÃO TÓPICA OCULAR**

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angela  
Machado de Campos**

**Florianópolis - SC  
2007**

“As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos”.

*(Clarice Lispector)*

*Aos meus pais Silvino e Achilina  
que são os maiores responsáveis  
por essa conquista.*

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Ângela Machado de Campos pelo carinho com que me acolheu desde o início, sempre pronta a ajudar, sempre me incentivando e dividindo comigo seus conhecimentos.

Aos professores Danilo Wilhelm Filho, Pedro Cardoso, Edson Luiz da Silva, Márcio Alvarez Silva, Cláudia Maria Oliveira Simões, César Augusto Souza de Andrade e Celso Pinto de Melo por gentilmente disponibilizarem os recursos de seus laboratórios, possibilitando a realização deste trabalho.

Ao colega Edison Carvalho pela grande contribuição nas análises realizadas na UFRGS.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Farmacêuticas em especial ao Nilson, Sandra e Solange pela amizade e contribuição para a realização dos experimentos.

Às colegas de laboratório Taty, Geci, Françoise, Márcia, Juju (Juliana), Carine e Letícia pela ajuda, amizade e carinho.

À minha querida amiga Andréa com quem compartilhei todos os momentos finais da dissertação, obrigada pelo ombro amigo, por tornar mais leve as horas difíceis. Pela amizade, apoio e companherismo.

Ao amigo Zucão (Professor Marcos Segatto) que carinhosamente me acolheu em seu laboratório. Obrigada por ceder seus equipamentos e principalmente pela amizade e pelos ensinamentos que entre uma brincadeira e outra você me passou.

Ao meu querido amigo Japa (Fábio) que conheci no primeiro dia do mestrado e desde então tornou-se um grande amigo com quem compartilhei bons momentos, risadas, fofocas, conselhos, sempre me incentivando a acreditar mais em mim e me ajudando em tudo que precisei.

Aos verdadeiros amigos que fiz no laboratório de controle de qualidade, amigos para a vida toda: Monika (Mu) e Gis (belezinha!) pelas conversas, risadas, desabafos, festas, enfim por poder contar com vocês sempre. Rafael e Bruno, amigos para todas as horas, com quem sempre me diverti e compartilhei bons momentos. As amigas Charise, Helen, Regina e Ariane pela disponibilidade, amizade e companherismo.

À minha querida amiga Ale, com quem convivo há tanto tempo, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida, rindo, chorando, aconselhando, sempre com muito carinho e paciência.

Aos meus queridos pais, Silvino e Achilina, maiores responsáveis por mais essa conquista, por todos os sacrifícios que fizeram, pelos valores que me ensinaram,



pelo exemplo de caráter e honestidade, pelo amor incondicional, sempre me incentivando e acolhendo em todos os momentos da minha vida.

À minha segunda mãe Moma (Norma) que ajudou a me criar com tanto amor, sempre tão doce, me cercando de mimos e carinho.

Ao meu amado sobrinho Yuri que veio a esse mundo para nos trazer alegria e felicidade. Que com um simples sorriso ilumina meu dia.

À minha maninha tão amada (Rosane) um exemplo de generosidade, caráter e força. Meu porto seguro, meu orgulho. É em você que me espelho para tentar ser uma pessoa melhor.

Ao meu cunhado Artêmio, que a sua maneira, sempre me ajudou e incentivou, acreditando no meu potencial.

Ao meu amor Beto (Roberto) por ser durante todos esses anos um companheiro incondicional, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e incentivando. Tua força, calma, generosidade e amor me fazem querer seguir em frente sempre ao seu lado.

## RESUMO

A instilação tópica ocular é a forma mais comum de tratamento de patologias oftálmicas, sendo a córnea a principal barreira no transporte de fármacos pela via ocular. O potencial das nanopartículas poliméricas em aumentar as oportunidades de absorção corneal após a administração tópica na superfície ocular tem sido alvo de intensas pesquisas nos últimos anos. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi preparar e caracterizar nanocápsulas e nanoesferas de poli-(DL-lático) (PLA) e poli-(DL-lático)-co-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG) contendo o agente antitumoral metotrexato (MTX) para administração tópica ocular. As nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado. A eficiência de encapsulação do fármaco foi em torno de 20 % para ambas as formulações de PLA e PLA-PEG. A análise calorimétrica (DSC) evidenciou uma interação entre o fármaco e o polímero. A estabilidade física e química dos sistemas foi estudada durante 45 dias de armazenamento a 25 e 4-8 °C, sendo que todas as nanocápsulas sofreram aumento no diâmetro médio das partículas durante o período de armazenamento. As nanoesferas, por sua vez, foram obtidas pela técnica da dupla emulsão (a/o/a)/evaporação do solvente, sob agitação ultrassônica. As formulações de PLA e PLA-PEG obtiveram um diâmetro médio de 250 e 100 nm e potencial zeta de -31 e -11 mV, respectivamente. A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) através de metodologia devidamente validada, sendo obtidos 42 e 40 % de EE nas formulações de PLA e PLA-PEG, respectivamente. A análise termoanalítica das nanoesferas demonstrou, da mesma forma que nas nanocápsulas, uma interação do fármaco com o sistema. O perfil de liberação do MTX a partir dos sistemas evidenciou 100 % de liberação do fármaco após 8 horas para as nanoesferas de PLA e após 4 horas para as de PLA-PEG. Estes resultados demonstraram que a presença da cobertura hidrofílica do PEG favorece a difusão do fármaco a partir das nanoesferas. Na avaliação da interação entre as nanopartículas e componentes do muco ocular, mucina e lisozima, não foram observadas modificações na viscosidade de uma dispersão de mucina após incubação com ambos os sistemas. No entanto, o diâmetro médio e o índice de polidispersão das nanoesferas de PLA aumentaram após incubação com a lisozima. A viabilidade do tecido corneal foi examinada após instilação *in vivo* das nanoesferas brancas de PLA e PLA-PEG. As córneas de coelhos foram removidas e coradas com iodeto de propídio, um marcador fluorescente capaz de diferenciar células viáveis de não viáveis. As imagens das córneas pré-tratadas por microscopia de fluorescência evidenciaram poucos sinais de fluorescência, sugerindo assim que a administração dos sistemas não foi associada à lise celular. Estes resultados evidenciam o interesse das nanoesferas de PLA e PLA-PEG como alternativa promissora para a administração tópica de fármacos por via ocular.

**Palavras-chave:** nanopartículas; metotrexato; poli(DL-lático); poli(DL-lático)-co-poli(etilenoglicol); ocular; sistemas de liberação.

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF METHOTREXATE-LOADED NANOPARTICLES. EVALUATION OF STABILITY AND VIABILITY OF CORNEAL TISSUE AFTER OCULAR ADMINISTRATION

Topical drug delivery to the eye is the most common treatment of ophthalmic diseases, and the cornea provides the dominant barrier to drug transport. 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. Hence, the aim of the present study was to prepare and the characterize nanocapsules and nanospheres of poly(DL-lactic acid) (PLA) and poly(DL-lactic acid)-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) containing antitumoral agent methotrexate (MTX) for ocular drug delivery. The nanocapsules were prepared by the interfacial deposition polymer method. The entrapment efficiency of the MTX was around 20 % for both PLA and PLA-PEG nanocapsules. Calorimetric analysis (DSC) showed a interaction between the drug and the polymer. Their physical and chemical stabilities were studied during 45 days storage at 25 and 4-8 °C and the mean particle size of all nanocapsules increased throughout this study. The nanospheres were obtained by a double emulsion (a/o/a) solvent evaporation technique, under ultrasonic stirring. PLA and PLA-PEG formulations presented mean size of 250 and 100 nm and zeta potential of -31 and -11 mV, respectively. The drug entrapment efficiency was determined by validated high-performance liquid chromatography (HPLC) method and the results obtained were 42 and 40 % for PLA and PLA-PEG, respectively. The nanospheres DSC analysis showed, as well as for the nanocapsules, a interaction between the drug and the systems. The MTX release profile from PLA and PLA-PEG nanospheres showed that 100 % of drug was released after 8 and 4 hours of study, respectively. The results demonstrated that the presence of hydrophilic PEG coating favors drug diffusion by the particles. The evaluation of interaction between nanoparticles and components of the ocular mucous, mucin and lysozyme, showed no modification in the viscosity of the mucin dispersion after incubation with both systems. However, the mean diameter and polydispersion index of PLA nanospheres increased upon incubation with lysozyme. The corneal viability tissue was examined after *in vivo* instillation of the blank PLA and PLA-PEG nanospheres. The rabbit corneas were removed and then stained with propidium iodide, a fluorescent dye which distinguishes viable from non-viable cells. Surface imaging of the pretreated corneas by fluorescence microscopy displayed few fluorescence signal suggesting that nanospheres administration could not be association with cellular lysis. These results suggest that PLA and PLA-PEG nanospheres present potential as ocular drug delivery system and it represents a promising alternative to the treatment of ocular diseases.

**Keywords:** nanoparticles; methotrexate; poly(DL-lactic acid) (PLA); poly(DL-lactic acid)-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG); ocular and drug delivery.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	15
2.1 Aspectos relacionados à absorção ocular de fármacos .....	16
2.1.1 Córnea.....	17
2.1.2 Fluido Lacrimal.....	19
2.1.3 Humor aquoso .....	20
2.2 Nanopartículas poliméricas.....	21
2.2.1 Nanopartículas poliméricas destinadas à administração ocular:.....	22
2.2.1.1 Utilização de coelhos como modelo animal .....	27
2.3 Metotrexato .....	28
2.3.1 Patologias intraoculares tratadas com MTX.....	31
2.3.2 Desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos contendo metotrexato...33	
3. OBJETIVOS .....	35
3.1 OBJETIVO GERAL .....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 MATERIAIS.....	39
4.1.1 Matérias-primas .....	39
4.1.2 Solventes e reagentes .....	39
4.1.3 Equipamentos.....	40
4.1.4 Material biológico e animais.....	41
4.2 MÉTODOS .....	42
4.2.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo metotrexato .....	42
4.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e teor de metotrexato nas suspensões de nanocápsulas .....	43
4.2.2.1 Validação do método de doseamento de metotrexato por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	43
4.2.2.1.1 Condições Cromatográficas.....	43
4.2.2.1.2 Linearidade .....	43
4.2.2.1.3 Precisão .....	44

4.2.2.1.4 Especificidade .....	44
4.2.2.1.5 Exatidão .....	44
4.2.2.1.6 Limite de quantificação .....	45
4.2.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação e taxa de recuperação de metotrexato.....	45
4.2.3 Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG.....	46
4.2.4 Termogravimetria e Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	47
4.2.5 Determinação do coeficiente de partição o/a do metotrexato .....	48
4.2.6 Preparação das suspensões de nanoesferas de PLA e PLA-PEG contendo metotrexato.....	49
4.2.7 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e taxa de recuperação de metotrexato nas suspensões de nanoesferas.....	50
4.2.8 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das suspensões de nanoesferas .....	50
4.2.9 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	51
4.2.10 Determinação do perfil de liberação do metotrexato a partir das nanoesferas de PLA e PLA-PEG .....	51
4.2.10.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	51
4.2.10.1.1 Condições cromatográficas .....	51
4.2.10.1.2 Linearidade .....	52
4.2.10.1.3 Especificidade .....	52
4.2.10.1.4 Limite de quantificação .....	52
4.2.10.2 Perfil de liberação do metotrexato a partir das nanoesferas .....	52
4.2.11 Estudo da interação e estabilidade das nanoesferas de PLA e PLA-PEG frente a componentes do muco ocular .....	53
4.2.11.1 Interação com a mucina .....	53
4.2.11.2 Estabilidade frente a lisozima .....	54
4.2.11.2.1 Tamanho de partícula e caracterização morfológica dos sistemas .....	54
4.2.12 Avaliação da viabilidade celular do tecido corneal após administração tópica ocular das suspensões de nanoesferas .....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
5.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo metotrexato .....	57

5.2 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e taxa recuperação de metotrexato nas suspensões de nanocápsulas .....	58
5.2.1 Validação do método de doseamento de metotrexato por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	58
5.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação e taxa de recuperação de metotrexato .....	62
5.3 Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG.....	64
5.4 Termogravimetria (TG) e Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	69
5.5 Determinação do coeficiente de partição o/a do metotrexato .....	73
5.6 Preparação das suspensões de nanoesferas de PLA e PLA-PEG contendo metotrexato .....	75
5.7 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e taxa de recuperação de metotrexato nas suspensões de nanoesferas .....	76
5.8 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das suspensões de nanoesferas .....	77
5.9 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	80
5.10 Determinação do perfil de liberação do metotrexato a partir das nanoesferas de PLA e PLA-PEG .....	81
5.10.1 Quantificação do fármaco no meio de liberação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	82
5.10.1.1 Linearidade .....	83
5.10.1.2 Especificidade .....	84
5.10.1.3 Limite de quantificação .....	84
5.10.2 Perfil de liberação do metotrexato a partir das nanoesferas .....	85
5.11 Estudo da interação e estabilidade das nanoesferas de PLA e PLA-PEG frente a componentes do muco ocular .....	87
5.11.1 Interação com a mucina .....	88
5.11.2 Estabilidade frente a lisozima .....	90
5.11.2.1 Tamanho de partícula e caracterização morfológica dos sistemas .....	90
5.12 Avaliação da viabilidade celular do tecido corneal após a administração <i>in vivo</i> das suspensões de nanoesferas .....	95
6. CONCLUSÕES.....	100
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
8. ANEXOS.....	116

## ***1. INTRODUÇÃO***

---

A maioria das patologias oculares é tratada através da administração tópica de colírios aquosos. No entanto, apenas uma pequena fração da dose instilada topicamente (1-3 %) consegue penetrar na córnea e alcançar os tecidos intraoculares, devido aos eficientes mecanismos de proteção do olho, como a renovação lacrimal, drenagem nasolacrimal, absorção não-produtiva pela conjuntiva, a possibilidade de metabolização e união a proteínas do fluido lacrimal, além da relativa impermeabilidade da córnea (CHRAI *et al.*, 1973; LEE e ROBINSON, 1979; URTTI, 2006).

A dificuldade encontrada em aumentar a biodisponibilidade de fármacos após sua administração tópica ocular conduziu pesquisadores da área da oftalmologia a buscar novas alternativas, entre elas obter sistemas capazes de permitir uma dosificação precisa, uma liberação controlada, uma maior eficiência em atingir os tecidos intra-oculares, uma diminuição da dose administrada e, em consequência, uma diminuição dos efeitos colaterais dos fármacos incorporados nos mesmos (DING, 1998).

Entre as estratégias desenvolvidas, os sistemas coloidais têm-se revelado eficientes como sistemas de liberação ocular de fármacos. Dentre os sistemas, o uso de nanopartículas tem conduzido à melhoria da eficácia terapêutica da administração tópica ocular devido ao aumento da penetração (LOSA *et al.*, 1991; ALONSO *et al.*, 1991; CALVO *et al.*, 1996; CAMPOS, 2001; URTTI, 2006), diminuição dos efeitos secundários sistêmicos decorrentes da absorção não-produtiva do fármaco (LOSA *et al.*, 1991), redução da metabolização resultante da degradação enzimática e maior retenção da preparação no local da administração (WOOD *et al.*, 1983; CALVO *et al.*, 1997; BARBAULT-FOUCHER *et al.*, 2002). Cabe salientar que as melhorias observadas na absorção de fármacos estão relacionadas principalmente ao tamanho nanométrico dos sistemas, independente da estrutura matricial ou reservatório do sistema empregado (CALVO *et al.*, 1996).

Os poliésteres alifáticos têm sido empregados com sucesso como material polimérico devido as suas características de baixa toxicidade e degradabilidade. Pertencem a esse grupo o ácido poli-(D,L-lático) (PLA), ácido poliglicólico (PLGA) e seus copolímeros (MOHANRAJ e CHEN, 2006). Vários estudos descritos na literatura utilizam o PLA para a preparação de nanopartículas destinadas ao tratamento de doenças oculares através da via tópica ocular (CAMPOS *et al.*, 2003; GIANNAVOLA *et al.*, 2003), via intravenosa (SAKAI *et al.*, 2006) ou intravítrea (BOURGES *et al.*, 2003).



As características de superfície das nanopartículas podem ter uma notável influência sobre sua interação com as superfícies mucosas, o que pode ser aproveitado para delinear sistemas que facilitem a penetração de moléculas bioativas direcionadas para determinadas regiões do organismo, isto é, a veiculação seletiva das moléculas nanoencapsuladas. Um dos recursos mais utilizados neste sentido é o recobrimento das partículas com cadeias de polietilenoglicol (PEG), um polímero hidrossolúvel, não imunogênico e não tóxico para uso interno (BAZILE *et al.*, 1995, GREF *et al.*, 1995, PERACCHIA *et al.*, 1999, MOSQUEIRA *et al.*, 2001, LI *et al.*, 2001), que conduz à obtenção de nanopartículas de revestimento hidrofílico, capazes de apresentar maior estabilidade nas superfícies mucosas (TOBÍO *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos com os sistemas nanoestruturados - a capacidade de transportar fármacos através da córnea, a menor afinidade pela conjuntiva, além de uma boa tolerância pelos tecidos oculares – podem ser considerados excelentes no que diz respeito à biodisponibilidade ocular. Desta forma, estes sistemas têm potencial para melhorar o tratamento das patologias intraoculares, especialmente aquelas cujo tratamento sistêmico resulta em efeitos secundários importantes (BRIGGER *et al.*, 2002).

O uso de metotrexato no tratamento de doenças oftálmicas vem crescendo consideravelmente nos últimos anos (HARDWIG *et al.*, 2006). Além de ser o principal fármaco utilizado no tratamento do linfoma intraocular primário (PIOL), é amplamente utilizado no tratamento de uveítes resistentes à terapia convencional com corticosteróides. De modo geral, o MTX é administrado via oral ou parenteral, porém a administração sistêmica do fármaco pode causar considerável citotoxicidade associada. Por isso, atualmente, vem-se utilizando a administração local de metotrexato através de injeções intravítreas apresentando bons resultados clínicos. Por outro lado, as injeções trazem dor e desconforto ao paciente, além de sérios efeitos colaterais que incluem epitelioptia corneal, catarata, hemorragia vítrea, maculopatia e atrofia óptica, além de prurido, irritação e xerofthalmia, que resultam numa menor adesão do paciente ao tratamento (DOROSHOW *et al.*, 1981; WEISS *et al.*; 1998, SAMSON *et al.*; 2001, SMITH *et al.*, 2002; PRAS *et al.*; 2005, HARDWIG *et al.*; 2006).

Considerando os riscos e complicações da administração sistêmica e intravítrea, entende-se como relevante o desenvolvimento de um sistema nanoestruturado contendo metotrexato visando uma melhora da biodisponibilidade ocular do fármaco a partir da

administração tópica destes sistemas. Portanto, este trabalho propõe-se a desenvolver e caracterizar suspensões de nanopartículas utilizando o ácido poli-D,L-lático (PLA) e seu copolímero dibloco, o ácido poli-(D,L-lático)-co-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG) contendo metotrexato. A proposta compreende também a avaliação *in vivo* da viabilidade celular do tecido corneal após administração tópica ocular dos sistemas.

## ***2. REVISÃO DA LITERATURA***

---

## 2.1 Aspectos relacionados à absorção ocular de fármacos

As patologias que envolvem o segmento anterior do olho (córnea, conjuntiva, esclera e úvea anterior) são tratadas principalmente com colírios, sendo esta a forma farmacêutica mais utilizada na terapêutica. Apesar disso, o medicamento é rapidamente drenado da superfície ocular, sendo o tempo de residência do fármaco muito curto resultando numa baixa biodisponibilidade de menos de 5 % da dose instilada (GEROSKI e EDELHAUSER, 2000).

Já patologias do segmento posterior do olho (retina, vítreo, coróide) são tratadas principalmente através de altas doses de fármaco via intravenosa ou pela administração de injeções intravítreas. Muitas doenças do segmento posterior não podem ser tratadas com os métodos convencionais disponíveis devido à dificuldade das substâncias de atravessar a barreira hemato-retinal e o epitélio pigmentar da retina (GEROSKI e EDELHAUSER, 2000).

Os colírios disponíveis comercialmente são administrados num volume de 25-56  $\mu\text{L}$  por gota (LEDERER e HAROLD, 1986). Quando uma gota é instilada, o olho humano consegue momentaneamente conter um volume de 30  $\mu\text{L}$ , mas rapidamente a solução é removida do saco conjuntival pelo “pisar de olhos” e pela *drenagem lacrimal* retornando ao volume inicial médio de 10  $\mu\text{L}$ . A velocidade de drenagem inicial de colírios da superfície ocular é de 1,5  $\mu\text{L} / \text{min}$  (LEE e ROBINSON, 1986; ZAKI *et al.*, 1986; CHRAI *et al.*, 1973), sendo que essa taxa decresce com o aumento da viscosidade e aumenta com o aumento da quantidade instilada na superfície ocular (ZAKI *et al.*, 1986; CHRAI *et al.*, 1973).

O excesso de volume instilado na superfície corneal é drenado para os ductos nasolacrimais podendo ocorrer uma absorção sistêmica do fármaco, denominada *absorção não-produtiva*, diretamente no saco conjuntival, via capilares sanguíneos, ou após drenagem para a cavidade nasal (URTTI *et al.*, 1985; URTTI e SALMINEN, 1993; URTTI *et al.*, 1994). A fração do fármaco absorvida sistemicamente pode causar efeitos secundários indesejáveis, como é o caso dos severos efeitos cardiovasculares e pulmonares causados por  $\beta$ -bloqueadores após administração tópica ocular, conforme descrito por Nelson e colaboradores (1986).

Além da interferência da drenagem nasolacrimal, a possibilidade de *ligação do fármaco às proteínas* existentes no fluido lacrimal constitui uma importante limitação na biodisponibilidade ocular, já que somente as moléculas livres são capazes de alcançar seu local alvo (CALVO, 1995).

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

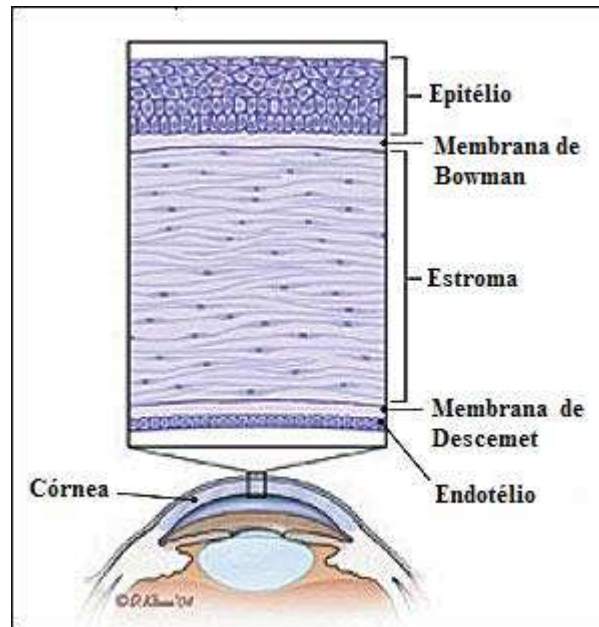
Além dos processos fisiológicos acima citados - eliminação do fluido lacrimal por drenagem, lacrimejamento, união a proteínas plasmáticas e absorção não produtiva pela conjuntiva e/ou mucosa nasal - o principal fator que limita a absorção ocular de fármacos é a relativa impermeabilidade do epitélio corneal, resultante de sua estrutura estratificada (URTTI e SALMINEN, 1993; LEE *et al.*, 1993). No entanto, apesar das dificuldades de ultrapassar a córnea, a permeação transcorneal é a principal via de entrada de substâncias do fluido lacrimal para o humor aquoso (HORNOF *et al.*, 2005).

### **2.1.1 Córnea**

A córnea (figura 1), 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 apresenta um diâmetro médio de 11,7 mm, uma espessura média de 0,5-0,7 mm, sendo composta por três camadas, o epitélio, o estroma e o endotélio, além das membranas de Descemet's e de Bowman (JARVINEN *et al.*, 1995).

O *epitélio corneal* é constituído de uma múltipla camada de células colunares, compactadas como um pavimento, formando uma efetiva barreira não somente contra microorganismos, mas também em relação à absorção de fármacos. Devido a sua histologia, o epitélio apresenta uma natureza lipofílica, constituindo a principal barreira para a passagem de substâncias hidrofílicas. Já o *estroma* apresenta uma natureza hidrofílica e é constituído de fibras de colágeno entrelaçadas, representando 90 % da espessura da córnea. Por fim, o

*endotélio* é uma camada monocelular de células hexagonais que apresenta característica lipofílica e é responsável pela manutenção da hidratação da córnea (VAUGHAN *et al.*, 1998; EDWARDS e PRAUSNITZ, 2001).



**Figura 1.** Desenho esquemático da estrutura da córnea.

Fonte: [http://www.cornea.org/study\\_transplant.html](http://www.cornea.org/study_transplant.html)

Para a maioria dos princípios ativos instilados no olho, a principal via de penetração para os tecidos intraoculares é através da córnea. Os fatores que contribuem para a eficácia da penetração corneal de fármacos estão relacionados à estrutura da córnea e às características físico-químicas, tanto do princípio ativo como da forma farmacêutica administrada. A estrutura trilaminar da córnea, composta por uma grossa camada hidrofílica (estroma) entre duas camadas lipofílicas, condiciona a penetração corneal do princípio ativo à sua lipofilicidade. A contribuição do estroma na resistência corneal é inversa a do epitélio devido ao seu caráter hidrofílico, sendo de 50 % para moléculas lipofílicas e 5 % para hidrofílicas. Além da lipofilicidade, características dos fármacos como solubilidade, peso e estrutura molecular, carga e grau de ionização afetam a permeação através da córnea (CALVO, 1995).

Os fármacos penetram através da córnea pela via transcelular ou paracelular. De modo geral, o endotélio e o epitélio, como a maioria das membranas, permitem a passagem de

fármacos lipofílicos pela via transcelular. Por outro lado, o estroma, por seu elevado conteúdo aquoso, constitui um obstáculo à difusão de fármacos lipofílicos. Assim, uma certa lipofilia com um mínimo de hidrofília são características que o fármaco deve apresentar para que seja capaz de atravessar a córnea. As substâncias hidrofílicas, por sua vez, podem penetrar o epitélio pela via paracelular por mecanismos de difusão passiva ou facilitada através dos espaços intracelulares (JARVINEN *et al.*, 1995).

### **2.1.2 Fluido Lacrimal**

O fluido lacrimal recobre a córnea e a conjuntiva desempenhando um papel ótico, metabólico, imunológico e de limpeza corneal fundamentais para o funcionamento normal do olho. Apresenta uma espessura de cerca de 3-10  $\mu\text{m}$ , um volume residente de em média 10  $\mu\text{L}$  e é composto por três camadas, uma camada lipídica superficial, uma aquosa central e uma mucosa interna. A camada lipídica superficial forma uma barreira hidrofóbica cujo papel principal é retardar a evaporação da fração aquosa do fluido lacrimal e reter as partículas estranhas. A camada aquosa intermediária é o componente majoritário do fluido e seus componentes fundamentais são proteínas, eletrólitos e mucina. Por fim, a camada mucosa interna é composta fundamentalmente pela mucina e glicocálix, além de sais, leucócitos, imunoglobulinas e enzimas, tais como a lisozima (CALVO, 1995; LUDWIG, 2005).

A lisozima é o elemento protéico mais abundante nas lágrimas, sendo liberada continuamente do saco conjuntival, mantendo-se numa concentração constante no fluido lacrimal. Esta proteína apresenta um caráter catiônico e uma importante atividade enzimática hidrolítica podendo, desta forma, interagir com os sistemas instilados topicamente e, conseqüentemente, alterar a absorção ou inativar uma fração do fármaco instilado, alterando sua biodisponibilidade (VAN HOFF, 1983; IBRAHIM *et al.*, 1988).


A mucina e o glicocálix, que compõem majoritariamente a camada mucosa interna, são glicoproteínas hidrofílicas aniônicas capazes de alterar suas propriedades físicoquímicas, como viscosidade e grau de hidratação, dependendo da composição do meio. Esta camada mucosa pode ser considerada como uma barreira para a penetração corneal de macromoléculas, que ficarão retidas nesta camada devido a seu tamanho, e de moléculas

carregadas, devido à possibilidade de união destas às cargas negativas da mucina (KHANVILKAR *et al.*, 2001).

### **2.1.3 Humor aquoso**

O humor aquoso é um líquido claro e transparente produzido pelo corpo ciliar que preenche a câmara anterior e posterior do olho, permitindo a regulação da pressão ocular. A câmara anterior, limitada pela córnea, íris e cristalino, contém a maior parte do humor aquoso, cerca de 200  $\mu\text{L}$ . A câmara posterior, limitada pela íris, cristalino e corpo ciliar, apresenta um volume muito menor (70  $\mu\text{L}$ ). As câmaras anterior e posterior se comunicam entre si através da pupila (CALVO, 1995; VAUGHAN *et al.*, 1998; RITTENHOUSE e POLLACK, 2000).

O humor aquoso, formado nos capilares do corpo ciliar, contém menos de 1 % da concentração protéica do plasma e forma uma espécie de barreira hemato-aquosa para o olho. Sua eliminação do globo ocular ocorre através do ducto de Schelmm a uma velocidade de aproximadamente 1 %/min (CALVO, 1995; VAUGHAN *et al.*, 1998; RITTENHOUSE e POLLACK, 2000; URTTI, 2006).

Após alcançar o humor aquoso, o fármaco tem fácil acesso à íris e ao corpo ciliar, onde pode ligar-se à melanin  formar um reservatório do princípio ativo, que é liberado lentamente para as células circundantes, prolongando seu tempo de ação (MAURICE e MISHIMA, 1984).

Em resumo, a biodisponibilidade ocular de um fármaco é um processo complexo dependente de fatores relacionados ao princípio ativo e à estrutura anátomo-fisiológica do olho. O conjunto desses fatores explica porque menos de 5 % do fármaco instilado topicamente alcança os tecidos intraoculares. Por este motivo, nas últimas décadas, estão sendo desenvolvidos novos sistemas de liberação com o intuito de aumentar o tempo de residência do fármaco na região pré-corneal e/ou favorecer a permeação através da córnea para, conseqüentemente, melhorar a biodisponibilidade ocular dos mesmos.



## **2.2 Nanopartículas poliméricas**

Nanopartículas podem ser definidas como dispersões coloidais ou partículas sólidas, com tamanho entre 10-1000 nm, onde um fármaco encontra-se dissolvido, associado, encapsulado ou ligado a uma matriz nanoestruturada. Dependendo de fatores como método de preparação e composição, é possível a obtenção de sistemas estruturalmente diferentes, chamados nanoesferas ou nanocápsulas. Nanocápsulas são sistemas vesiculares heterogêneos em que o fármaco encontra-se confinado em uma cavidade aquosa ou oleosa, a qual encontra-se envolvida por uma única membrana polimérica. As nanoesferas, por sua vez, são sistemas matriciais homogêneos constituídos por uma rede polimérica em que o fármaco se encontra dissolvido, distribuído na forma de cristais ou adsorvido na superfície das partículas (COUVREUR *et al.*, 2002; LANGER, 2000; KOMMAREDDY *et al.*, 2005).

Dentre as inúmeras vantagens do uso de nanopartículas como sistemas de liberação de fármacos, podemos citar (i) o tamanho e as características de superfície das partículas podem ser modulados para uma determinada via de administração ou tecido alvo, (ii) a possibilidade de controlar a liberação do fármaco, sendo este liberado apenas no local alvo, com conseqüente aumento do efeito terapêutico e redução dos efeitos colaterais, (iii) as características de degradação e liberação das partículas podem ser moduladas através da escolha dos constituintes da matriz, (iv) os sistemas podem ser utilizados através de muitas vias de administração incluindo oral, nasal, parenteral e intra-ocular (MOHANRAJ e CHEN, 2006).

Os métodos de preparação de nanopartículas podem ser divididos em três principais grupos: polimerização de monômeros, dispersão de polímeros pré-formados e coacervação ou gelificação iônica. Contudo, mais recentemente outros métodos, como a tecnologia de fluidos supercríticos, vêm sendo descritos pela literatura (MOHANRAJ e CHEN, 2006).

As primeiras nanopartículas elaboradas segundo um método de polimerização foram desenvolvidas por Birrenbach e Speiser (1976), mas, apesar do interesse inicial pela técnica, sua utilização na terapêutica foi bastante limitada devido à lenta velocidade de degradação desses sistemas. Considerando as limitações das técnicas de polimerização, foram propostos os métodos de preparação de nanopartículas usando polímeros pré-formados, como os poliésteres, entre eles a poli- $\epsilon$ -caprolactona (PECL), poli-ácido láctico (PLA) e copolímeros

como o poli-ácido-lático-co-glicólico (PLAGA). Estes métodos baseiam-se na formação de emulsões de uma solução orgânica de polímero em uma fase aquosa ou na precipitação espontânea do polímero sem nenhum processo de emulsificação (CALVO, 1995).

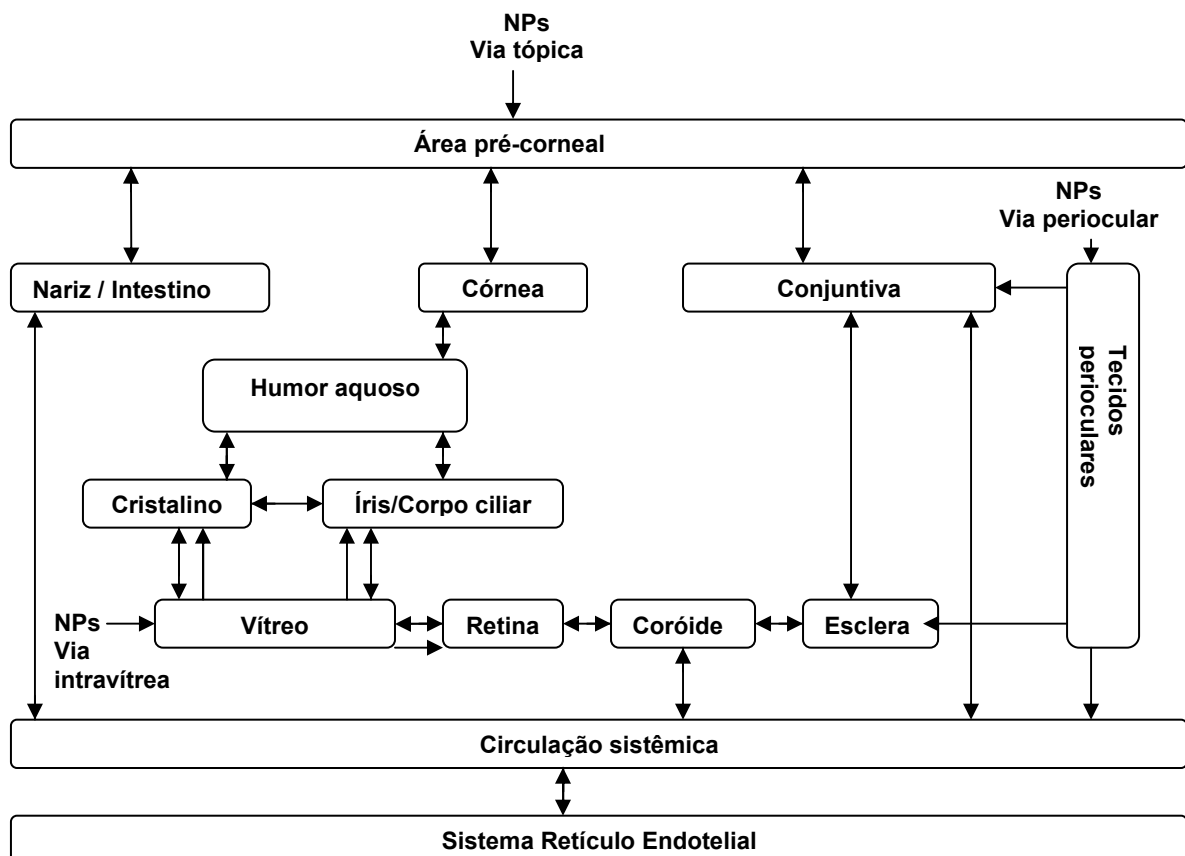
A técnica de nanoprecipitação ou nanodeposição do polímero pré-formado consiste na precipitação do polímero após adição de uma solução orgânica do mesmo, em um não solvente como a água. A utilização de solventes orgânicos hidromiscíveis, tais como a acetona e o etanol, conduz à difusão rápida e espontânea do mesmo na água, gerando uma turbulência interfacial entre as duas fases (SOPPIMATH *et al.*, 2001), que resulta na formação espontânea e imediata de nanopartículas. A adição de um óleo à solução orgânica do polímero resulta na formação de nanocápsulas, devido à deposição do polímero na interface entre o óleo e a água da emulsão formada. As partículas formadas por este método apresentam um tamanho de partícula reduzido. Esta metodologia permite a encapsulação de substâncias hidrofóbicas mediante a sua prévia dissolução na fase orgânica da formulação (FESSI *et al.*, 1989; CALVO, 1995; COUVREUR *et al.*, 2002).

Em contrapartida, o método da dupla emulsão apresenta-se bastante adequado para a nanoencapsulação de fármacos de caráter hidrofílico. O método consiste 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 consiste na fase interna da segunda emulsão, também preparada por sonicação, cuja fase externa é uma solução aquosa do tensoativo (WATTS *et al.*, 1990; BLANCO e 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) (ZAMBAUX *et al.*, 1999). O agente emulsificante, 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 o álcool polivinílico e a metilcelulose, o polisorbato 80, dodecil sulfato, poloxâmico, entre outros.

### **2.2.1 Nanopartículas poliméricas destinadas à administração ocular**

Os sistemas nanoestruturados desenvolvidos para a via ocular visam obter uma liberação controlada do fármaco e proporcionar uma atividade terapêutica prolongada. Para

que isso ocorra, as partículas devem permanecer retidas na superfície ocular, e o fármaco encapsulado ser liberado em uma velocidade apropriada. Para aumentar a retenção das partículas na superfície ocular é necessário que os sistemas sejam desenvolvidos com materiais bioadesivos, caso contrário, sem bioadesividade, as nanopartículas são rapidamente eliminadas da área pré-corneal quase na mesma velocidade em que as soluções aquosas convencionais (DING, 1998). O uso de nanopartículas como carreadores de fármacos para a via ocular vem demonstrando ser uma estratégia bastante promissora tanto para fármacos hidrofílicos como lipofílicos (ZIMMER e KREUTER, 1995; LE BOURLAIS *et al.*, 1998). Os maiores desafios na fabricação de nanopartículas para via ocular incluem a estabilidade da formulação, o controle do tamanho de partícula, o controle da liberação do fármaco e a obtenção de preparações estéreis em escala industrial (DING, 1998). A figura 2 apresenta as possíveis rotas seguidas pelas nanopartículas após administração tópica ocular, periocular ou intravítrea



**Figura 2.** Possíveis rotas seguidas pelas nanopartículas (NPs) após administração tópica, periocular ou intravítrea. As setas de sentido único representam os tecidos em que as NPs penetram logo após a administração, enquanto as setas de duplo sentido representam rotas alternativas percorridas pelas NPs.

Fonte: BU *et al.*, 2007, p. 95.

No que diz respeito à composição química, vários polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, de origem natural ou sintética, têm sido utilizados na preparação de sistemas de liberação para a via ocular. As policianocrilatos, polianidridos, poli- $\epsilon$ -caprolactona (PECL), poli-ácido-lático (PLA) e poli-ácido-lático-co-glicólico (PLAGA) são exemplos de polímeros utilizados com sucesso para a via ocular, devido às suas características de baixa toxicidade. Em meio aquoso estes polímeros sofrem degradação hidrolítica pelo rompimento das ligações ésteres, sendo convertidos em metabólitos não tóxicos e facilmente eliminados pelo organismo. Sistemas terapêuticos preparados a partir destes polímeros podem ser aplicados sobre a superfície ocular ou utilizados na forma de implantes, sendo estes potencialmente benéficos no tratamento de várias doenças como infecções, úlceras corneais, endoftalmite e tumores intraoculares, como melanomas e retinoblastomas (MERKLI *et al.*, 1998).

Além da biodegradabilidade e biocompatibilidade, é desejável que os polímeros utilizados no desenvolvimento de sistemas para administração ocular apresentem características mucoadesivas, sendo, portanto, capazes de promover um contato íntimo com a camada mucosa da superfície ocular. Desta forma, a escolha do polímero determina importantes propriedades físico-químicas do sistema obtido, como carga de superfície das partículas e tipo de interação fármaco/sistema, que são em grande parte responsáveis pela absorção do fármaco (MARCHAL-HEUSSLER *et al.*, 1990).

O potencial uso de partículas coloidais poliméricas como sistemas carreadores de fármacos para a via ocular tem sido investigado desde meados de 1970. Inicialmente, dois sistemas nanoestruturados para administração ocular foram desenvolvidos. O primeiro consistia em nanopartículas de acetofalato de celulose nas quais foi adsorvida pilocarpina, visando a liberação prolongada do fármaco na superfície ocular. O outro sistema, denominado Piloplex, consistia numa dispersão aquosa polimérica de pilocarpina e um co-polímero de laurilmetacrilato e ácido acrílico (LEE e ROBINSON, 1986). Nenhum destes sistemas foi desenvolvido comercialmente, devido a não-degradabilidade, toxicidade local e dificuldade de transposição para escala industrial. Tendo em vista tais limitações, os estudos que se seguiram foram focados na biodegradabilidade e/ou bioadesividade das nanopartículas (DING, 1998).

Wood e colaboradores (1985) desenvolveram nanopartículas de poli-hexilcianoacrilato (PHCA) marcadas radioativamente e avaliaram o tempo de permanência das partículas na

área pré-corneal, bem como a biodegradabilidade do polímero no fluido lacrimal. Os resultados promissores - a capacidade de adesão das partículas à superfície da córnea e conjuntiva e a biodegradabilidade do polímero no filme lacrimal - chamaram a atenção sobre o potencial das nanopartículas como nova forma de administração oftálmica.

Alguns anos mais tarde, estudos realizados com nanocápsulas também apresentaram resultados excelentes, obtendo não somente um aumento nos efeitos terapêuticos dos fármacos encapsulados como também uma diminuição da sua absorção sistêmica. Assim, Marchal-Heussler e colaboradores (1990 e 1992) observaram que o betaxolol e o carteolol encapsulados em nanocápsulas de poli-isobutilcianoacrilato (PBCA), polilático-co-glicólico (PLAGA) e poli- $\epsilon$ -caprolactona (PECL) diminuíram significativamente a pressão intraocular quando comparados a uma solução aquosa dos fármacos. Ainda, os efeitos adversos cardiovasculares sistêmicos foram significativamente menores com a nanoencapsulação, indicando uma redução da absorção não corneal do fármaco.

Calvo e colaboradores (1996) investigaram a habilidade de diferentes carreadores em aumentar a biodisponibilidade ocular da indometacina em olhos de coelhos albinos. O estudo avaliou o desempenho de suspensões de nanopartícula, nanocápsula, nanoemulsão e micropartícula, além de uma solução do fármaco livre. Os resultados demonstraram que os três sistemas nanoestruturados foram capazes de aumentar em até 300 vezes a concentração do fármaco na córnea e humor aquoso quando comparados à solução de fármaco livre. Além disso, os sistemas coloidais aumentaram em 3 vezes a biodisponibilidade ocular da indometacina quando comparados às micropartículas. Estes resultados permitiram concluir que a natureza coloidal dos três sistemas é o principal fator responsável pelo aumento da biodisponibilidade ocular do fármaco, independente da estrutura dos mesmos.

Atualmente, além da aplicação tópica ocular, as nanopartículas também são utilizadas no tratamento de patologias do segmento posterior do olho, através de injeções intravítreas. Bourges e colaboradores (2003) desenvolveram nanopartículas de PLA contendo rodamina e vermelho nilo e estudaram sua localização nos tecidos intraoculares, bem como a capacidade de liberação prolongada do marcador após uma única injeção intravítrea. Os resultados demonstraram que as nanopartículas de PLA não causaram nenhum sinal de irritação ou toxicidade e os marcadores foram encontrados em grande parte nas células do epitélio

pigmentar retinal, sugerindo assim a capacidade de liberação de fármacos a partir de nanopartículas elaboradas com o PLA em um tecido alvo.

Com o intuito de melhorar a biodisponibilidade ocular de fármacos, estratégias vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de nanopartículas visando o aumento do tempo de permanência na área pré-corneal e o incremento da absorção de fármacos. Dentre elas, destaca-se o recobrimento das partículas com polímeros bioadesivos de carga positiva, como a quitosana, que através de sua capacidade de ligação com as cargas negativas do muco ocular aumentam o tempo de residência do fármaco, melhorando assim sua biodisponibilidade. Outra estratégia amplamente descrita é o recobrimento das partículas com polímeros hidrofílicos que conferem características anfífilas aos sistemas facilitando sua passagem pelo tecido corneal (LUDWIG, 2005).

Um dos recursos mais utilizados neste sentido é o recobrimento das partículas com cadeias de polietilenoglicol (PEG), um polímero hidrossolúvel, não imunogênico e não tóxico para uso interno. A incorporação do PEG aos sistemas pode ser efetivada por meio de adsorção física ou ligações covalentes na superfície das partículas (BAZILE *et al.*, 1995, GREF *et al.*, 1995, PERACCHIA *et al.*, 1999, MOSQUEIRA *et al.*, 2001, LI *et al.*, 2001), e conduz à obtenção de nanopartículas de revestimento hidrofílico, de menor reconhecimento pelos macrófagos. Tobío e colaboradores (1998 e 2000) demonstraram que o recobrimento de nanocápsulas com PEG aumentou o transporte dos sistemas e, portanto, das moléculas bioativas encapsuladas, através das mucosas nasal e intestinal, atribuindo estes resultados a uma melhora da estabilidade do sistema frente aos fluidos biológicos. Em relação à via ocular, Campos e colaboradores (2003) ao estudar comparativamente nanocápsulas elaboradas com poli- $\epsilon$ -caprolactona (PECL) contendo o marcador fluorescente rodamina 6G como molécula-modelo, com diferentes tipos de revestimento, comprovaram a notável influência das características de superfície sobre a interação com a córnea. Estas partículas (PECL-PEG) são capazes de interagir com o epitélio corneal e atravessá-lo segundo um mecanismo de transporte transcelular, com uma maior velocidade de transporte quando comparado ao sistema sem recobrimento.

Da mesma forma, Giannavola e colaboradores (2003) desenvolveram nanoesferas de PLA e PLA-PEG para a administração tópica ocular do agente antiviral aciclovir, com o intuito de avaliar a tolerância ocular dos sistemas, bem como seu perfil farmacocinético. Os

resultados demonstraram boa tolerância ocular dos sistemas, além da capacidade de promover uma liberação controlada do fármaco e aumentar consideravelmente os níveis de aciclovir no humor aquoso quando comparados a uma solução do fármaco livre. As nanoesferas revestidas com PEG obtiveram os melhores resultados de aumento dos níveis de aciclovir em humor aquoso.

As vantagens do recobrimento de nanopartículas com polietilenoglicol também são descritas por Kozak e colaboradores (2004). Este estudo demonstra a eficácia de injeções intravítreas de tamoxifeno encapsulado em nanopartículas revestidas com PEG no tratamento de uveoretinite autoimune (EUA). Enquanto a injeção de tamoxifeno livre não alterou o curso da doença, a injeção das nanopartículas reduziu significativamente a EUA, sendo estes resultados atribuídos à progressiva liberação do fármaco e à prevenção de sua rápida metabolização e degradação.

Por fim, conforme descrito na literatura, os resultados obtidos com os sistemas nanoestruturados permitem concluir que sua capacidade de transportar fármacos através da córnea, a menor afinidade pela conjuntiva, além da boa tolerância dos tecidos oculares, podem ser excelentes no que se refere à biodisponibilidade ocular, permitindo a diminuição da dose necessária para alcançar o efeito terapêutico desejado (CAMPOS, 2002).

### **2.2.1.1 Utilização de coelhos como modelo animal**

A maioria dos estudos com animais realizados na área de oftalmologia utiliza coelhos como modelo experimental por possuírem olhos relativamente grandes, além de anatomia e fisiologia amplamente descritas na literatura (URTI E SALMINEN, 1993; WILHELMUS, 2001). Apesar disso, não existe uma correlação bem estabelecida entre o desempenho das preparações oftálmicas em coelhos e em humanos, principalmente devido à diferença na frequência do piscar de olhos (LUDWIG, 2005). Além de algumas semelhanças com os olhos humanos, a facilidade de manuseio e o baixo custo são algumas das vantagens associadas ao uso destes animais. A tabela 1 apresenta a comparação das dimensões físicas de algumas estruturas de olhos humanos e de coelhos (URTI E SALMINEN, 1993; WILHELMUS, 2001).

**Tabela 1.** Dimensões físicas de algumas estruturas dos olhos humanos e de coelhos.

<b>Estrutura</b>	<b>Humanos (mL)</b>	<b>Coelhos (mL)</b>
Câmara anterior	0,3	0,3
Câmara posterior	0,06	0,06
Lente (volume)	0,2	0,2
Vítreo (volume)	3,9	1,5

Fonte: GUM *et al.*, 1999. p. 169.

A maioria das publicações que estudam sistemas coloidais para a administração tópica ocular ou intravítrea de fármacos utilizam nos estudos *in vivo* coelhos como modelo animal. Dentre elas, Campos e colaboradores (2001) avaliaram a penetração corneal de nanopartículas de quitosano com fluoresceína em coelhos albinos machos da raça Nova Zelândia. Os resultados demonstraram que a concentração de fluoresceína tanto na córnea como na conjuntiva foram maiores após administração das nanopartículas quando comparadas a fluoresceína livre.

### 2.3 Metotrexato

Metotrexato (MTX), também chamado de ametofterina, é um fármaco citotóxico que vem sendo utilizado desde 1940 no tratamento de tumores sólidos e leucemias e, mais recentemente, como um agente imunossupressor em transplantes de órgãos e no tratamento de doenças autoimunes, tais como reumatismo e psoríase (RUBINO, 2001).

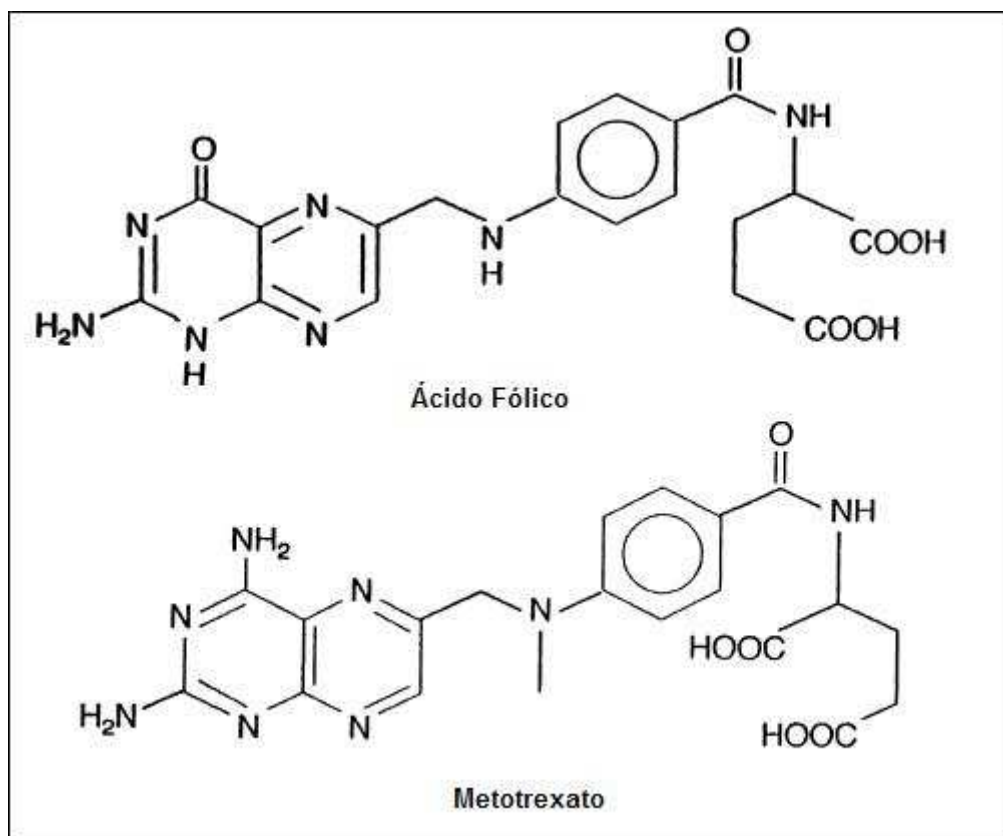
O MTX é um análogo do ácido fólico (figura 3) que atua inibindo a ação da enzima dihidrofolato redutase (DHFR). Esta enzima é responsável pela conversão de dihidrofolatos a tetrahidrofolatos e sua inibição causa a falta de folatos na forma reduzida, os quais são doadores de uma unidade de carbono para a biossíntese dos ácidos nucleicos e alguns aminoácidos, tais como purinas, pirimidinas e poliaminas (ESPINOSA-MANSILLA *et al.*, 2002; JIRI, *et al.*, 2003). Desta forma, a razão da utilização deste fármaco na quimioterapia reside no fato de que as células malignas tornam-se carentes de precursores da purina e pirimidina requeridos na síntese do DNA e RNA. Como resultado da incapacidade de sintetizar DNA e RNA, a proliferação e divisão celular das células malignas caem



rapidamente em condições terapêuticas. Em doses baixas, o MTX também possui propriedade imunossupressora e antiinflamatória. Com relação à atividade imunossupressora, o fármaco tem sido utilizado pela sua capacidade de inibir a proliferação de linfócitos CD<sub>3</sub> e CD<sub>4</sub> e outras células imunocompetentes, como neutrófilos polimorfonucleares (JIRI *et al.*, 2003).

Quanto às suas propriedades físicas, o fármaco é caracterizado por ser um pó cristalino amarelado, com ponto de fusão entre 182 a 189 °C e peso molecular de 454,4. É praticamente insolúvel em água, etanol, clorofórmio e éter, e bastante solúvel em soluções diluídas de hidróxidos de álcalis e carbonatos (CLARKE'S, 2006). Quimicamente, como demonstrado na figura 3, é constituído por uma porção heterocíclica (anel pterínico 2,4-diamino-substituído) ligada a uma porção *p*-aminobenzoil que, por sua vez, está ligada a uma unidade de ácido glutâmico. A molécula é um polieletrólito com dois grupos carboxílicos cujas constantes de dissociação (pKa) são de 3,36 ( $\alpha$ -carboxil) e 4,70 ( $\gamma$ -carboxil), além de uma variedade de funções nitrogenadas, onde a mais básica é provavelmente o grupamento N-1 guanídico do anel pterina (pKa 5,71). Sua solubilidade aquosa é pH dependente, variando de 0,9 mM em pH 5 até 20 mM em pH 7. A principal diferença estrutural do MTX em relação ao seu análogo ácido fólico é a substituição de uma hidroxila por uma amina no C<sup>2</sup> e uma metilação no N<sup>10</sup> (RUBINO, 2001).

Em baixas doses (< 25 mg/m<sup>2</sup> de superfície corporal), o metotrexato é completamente absorvido pelo trato gastrointestinal, enquanto que em doses acima de 3 g/m<sup>2</sup> a absorção gastrointestinal não é completa, por isso ele deve ser administrado via parenteral. Sua distribuição nos tecidos corporais é rápida e sua eliminação da circulação sanguínea ocorre através de um perfil farmacocinético trifásico, com t<sub>1/2</sub> de absorção de 10 minutos, de distribuição de aproximadamente 2 horas e de eliminação de cerca de 8 horas. Devido a sua alta polaridade, em pH neutro dos fluídos biológicos está presente principalmente nas espécies aniônicas, por isso atravessa a membrana celular com dificuldade e, portanto, é transportado para dentro das células através de um sistema de transporte específico (RUBINO, 2001).



**Figura 3.** Estrutura química do ácido fólico e do metotrexato.

Fonte: RUBINO, 2001, p. 219-220.

Sua administração é realizada tanto por via oral como parenteral. No caso da administração oral, os esquemas posológicos mais utilizados são: dose única oral semanal de 10-25 mg ou 2,5 mg de 12/12h três vezes por semana. Na administração parenteral 10-25 mg dose única semanal via endovenosa ou intramuscular. Quando a resposta terapêutica é alcançada, na medida do possível, a dose deve ser ajustada e diminuída devido ao grande número de efeitos colaterais que o fármaco pode causar, tais como: hepatotoxicidade, depressão da medula óssea, leucopenia, trombocitopenia, anemia, estomatite ulcerativa, náuseas, distensão abdominal, entre outros (VANDOOREN-GREEBE *et al.*, 1994; PRASAD *et al.*, 2007).

Considerando os importantes efeitos colaterais associados a doses elevadas de metotrexato e sua limitada capacidade de atravessar as barreiras biológicas, torna-se

interessante a incorporação deste em novos sistemas de liberação de fármacos, tais como micropartículas, nanopartículas e lipossomas.

### **2.3.1 Patologias oculares tratadas com MTX**

O uso de MTX no tratamento de doenças oftálmicas vem crescendo consideravelmente nos últimos anos (HARDWIG *et al.*, 2006). A administração do fármaco pode ser realizada por via sistêmica ou local, através de injeções intravítreas. A via sistêmica é a comumente utilizada, porém, devido aos limites impostos pela barreira hemato-ocular à penetração de agentes quimioterápicos para o interior do olho, é necessário a administração de uma dose muito elevada do fármaco para alcançar o efeito terapêutico desejado, aumentando, desta forma, a citotoxicidade associada. Considerando os problemas associados à via sistêmica, atualmente, vem-se utilizando a administração local através de injeções intravítreas. Esta modalidade de administração vem demonstrando ser bastante eficiente no controle e até mesmo cura de patologias intraoculares tratadas com metotrexato. Entretanto, essas injeções trazem dor e desconforto ao paciente, além de sérios efeitos colaterais que incluem epitelopatia corneal, catarata, hemorragia vítrea, maculopatia e atrofia óptica, além de prurido, irritação e xerofalmia, sintomas que normalmente resultam em uma menor adesão do paciente ao tratamento (DOROSHOW *et al.*, 1981; SMITH *et al.*, 2002).

A principal patologia ocular tratada com metotrexato é o linfoma intraocular primário (PIOL), que se caracteriza como um sub-tipo de linfoma primário do sistema nervoso central que ocorre em 20-25 % dos pacientes, e pode apresentar comprometimento da retina, nervo óptico e vítreo. Os sintomas abrangem perda indolor da visão, olhos vermelhos, fotofobia, dor ocular, além de casos assintomáticos. Devido ao início silencioso e à variedade de manifestações clínicas, a doença normalmente demora a ser diagnosticada podendo existir neste período uma severa perda da visão (GILL e JAMPOL, 2001). Um estudo realizado por Smith e colaboradores (2002) demonstrou que, após a administração de no máximo doze injeções intravítreas de metotrexato (400 µg), 100 % de 26 olhos tratados somente com as injeções ou associados à quimioterapia sistêmica e/ou cranial (no caso de envolvimento do SNC) obtiveram remissão clínica do tumor ocular.

Recentemente, um estudo de casos realizado por Hardwig e colaboradores (2006) descreve a utilização de injeções intravítreas de metotrexato no tratamento de outras doenças além do PIOL. Pacientes com uveíte, retinopatia diabética proliferativa, proliferação fibrovascular idiopática, entre outras, receberam injeções de 400 ou 200 µg de metotrexato, sendo que 75 % dos olhos tratados obtiveram uma resposta clínica esperada, enquanto 25 % apresentaram significativa perda da acuidade visual.

A uveíte, definida como uma inflamação da úvea, é a forma mais comum de doença inflamatória ocular, capaz de causar importantes danos oculares podendo, inclusive, levar a cegueira. A uveíte pode ser anatomicamente dividida em anterior, intermediária, posterior e panuveítica, sendo a uveíte anterior, que atinge o segmento anterior do olho, a de maior incidência mundial (CHANG *et al.*, 2005). O metotrexato é amplamente utilizado no tratamento de uveíte resistente à terapia convencional com corticosteróides. De modo geral, baixas doses de MTX são administradas semanalmente, via oral ou parenteral, resultando em uma diminuição significativa da inflamação e, em muitos casos, levando a cura completa do paciente. Porém, a administração sistêmica do fármaco, mesmo que em baixas doses, pode causar efeitos colaterais importantes como toxicidade hepática e estomatites com significativa perda de peso associada (WEISS *et al.*; 1998, SAMSON *et al.*; 2001, PRAS *et al.*; 2005, HARDWIG *et al.*; 2006).

Guttman (1998) realizou um estudo de casos utilizando metotrexato para o tratamento de 16 pacientes (29 olhos) com uveíte crônica, resistentes à terapia com corticosteróides. Através de administrações semanais, via oral ou intramuscular, a inflamação ocular diminuiu consideravelmente em 50 % dos casos, e em 40 % dos casos o quadro permaneceu estável. Contudo, efeitos colaterais importantes tais como náuseas, exantema, elevação das enzimas hepáticas e pancitopenia. Por sua vez, Samson e colaboradores (2001) descreveram a utilização de metotrexato (via oral) em 160 pacientes que apresentavam uveíte crônica não infecciosa resistente à terapia convencional. O controle da inflamação foi alcançado em 76 % dos casos, porém 18 % dos pacientes interromperam o tratamento devido aos efeitos colaterais associados.

### **2.3.2 Desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos contendo metotrexato**

Existem poucos estudos focados no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos contendo metotrexato. Dentre eles, Kumar e Rao (1998) desenvolveram e caracterizaram microesferas proteínóides de MTX para administração oral, visando à diminuição da irritação gástrica provocada pelo fármaco. Os sistemas apresentaram-se adequados à administração oral de metotrexato, uma vez que não ocorreu liberação do fármaco em pH ácido durante os estudos de liberação *in vitro* das microesferas. Por sua vez, Modi e colaboradores (2006) desenvolveram, utilizando um copolímero de ácido D-L-lático e ácido sebácio, microesferas de MTX destinadas à administração subcutânea. As formulações foram testadas em ratos e após estudo histopatológico dos tecidos observou-se que as microesferas não causaram danos significativos aos tecidos após injeção subcutânea dos sistemas.

A incorporação do metotrexato em sistemas coloidais, tais como lipossomas e nanopartículas, também vem sendo estudada nos últimos anos. Dentre as poucas publicações existentes, Trotta e colaboradores (2004) prepararam lipossomas deformáveis de MTX com o objetivo de aumentar a penetração cutânea do fármaco, utilizado no tratamento da psoríase. Através do estudo de permeação *in vitro* realizado com pele de orelhas de porcos observou-se que os lipossomas deformáveis foram capazes de aumentar a quantidade de metotrexato absorvido pela pele quando comparados aos lipossomas normais e a uma solução do fármaco.

Em relação à incorporação em nanopartículas, Cascone e colaboradores (2002) produziram nanopartículas de gelatina contendo MTX, preparadas através da técnica de evaporação do solvente, baseada numa emulsão simples a/o. Os autores incorporaram diferentes quantidades de MTX ao sistema, e avaliaram a influência dessa variação sobre diferentes parâmetros, tais como tamanho de partícula, eficiência de encapsulação e liberação do fármaco. Este artigo assemelha-se à proposta do presente trabalho por utilizar como matéria prima para preparação das nanopartículas o metotrexato sódico que, ao contrário da base, é hidrossolúvel e, por isso, é a forma utilizada nas preparações injetáveis comercialmente disponíveis. Mais recentemente, Gao e Jiang (2006) desenvolveram nanopartículas de poli-butilcianocrilato contendo metotrexato, e estudaram a influência de diferentes tamanhos de partículas no transporte do fármaco através da barreira hematoencefálica. De maneira geral, as publicações citadas acima obtiveram resultados promissores

que justificam a continuidade de estudos que buscam o desenvolvimento de sistemas que possibilitem a liberação controlada do metotrexato, objetivando aumentar a biodisponibilidade do fármaco, diminuir a dose administrada e, conseqüentemente, reduzir os importantes efeitos adversos associados.

Por fim, não foram encontradas na literatura publicações referentes ao desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos contendo metotrexato destinados à administração tópica ocular. Por outro lado, de forma inédita, foram desenvolvidas em nosso laboratório por Faria (2005), nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo metotrexato, objetivando desenvolver um sistema carreador do fármaco para os tecidos intraoculares. Esses sistemas nanoestruturados foram avaliados quanto às características físico-químicas e estabilidade frente a componentes do muco ocular, mostrando-se compatíveis com a via ocular de administração quanto a estes parâmetros. Através de um estudo *ex vivo* realizado em célula de difusão, utilizando córneas de porco, pode-se constatar que as nanocápsulas de PLA foram mais eficientes tanto na permeação do fármaco através da córnea como na capacidade de retenção do fármaco no tecido corneal, quando comparadas com a suspensão de PLA-PEG e com a solução de metotrexato utilizada como controle. Por outro lado, não houve diferença significativa entre as nanocápsulas de PLA-PEG e o controle, tanto no estudo de retenção como de transporte transcorneal. Entretanto, na interpretação destes resultados devem ser consideradas as condições não fisiológicas deste estudo, e também que o papel do PEG na superfície das partículas está associado à estabilização frente à interação com proteínas das superfícies mucosas, ausentes nestas condições experimentais.

Os resultados descritos, considerados promissores para a via ocular, motivaram a continuidade do estudo, visando confirmar o potencial destes sistemas como carreadores do metotrexato aos tecidos intra-oculares a partir de uma administração tópica.

### ***3. OBJETIVOS***

---

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo central deste trabalho foi aprofundar a avaliação do potencial de sistemas nanoestruturados preparados a partir do ácido poli-D,L-lático (PLA) e de seu copolímero dibloco, o ácido poli-(D,L-lático)-co-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG) como carreadores para administração ocular do agente antitumoral metotrexato, considerando as peculiaridades desta via de administração.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

O presente trabalho foi realizado em duas partes: em uma primeira etapa foram avaliadas nanocápsulas previamente desenvolvidas e, a seguir, foi realizado um estudo de formulação e caracterização de nanoesferas. Os objetivos específicos para cada uma das etapas foram os seguintes:

#### **PARTE I**

- Preparar e caracterizar nanocápsulas de metotrexato pela técnica de deposição interfacial do polímero, utilizando o ácido poli-(D,L-lático) (PLA) ou o ácido poli-(D,L-lático)-co-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG) como matriz polimérica.
- Desenvolver e validar metodologia para cromatografia líquida de alta eficiência a fim de avaliar a eficiência de encapsulação do metotrexato nos sistemas.
- Avaliar a estabilidade física dos sistemas preparados em diferentes condições de temperatura.
- Estudar a presença de interações entre o fármaco e a matriz polimérica através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).



**PARTE II**

- Desenvolver nanoesferas de metotrexato pela técnica de evaporação/extração do solvente a partir de dupla emulsão, utilizando o ácido poli-(D,L-lático) (PLA) ou o ácido poli-(D,L-lático)-co-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG) como matriz polimérica.
- Caracterizar as propriedades físico-químicas dos sistemas desenvolvidos, bem como estudar a eficiência de encapsulação do metotrexato nos mesmos.
- Investigar a presença de interações entre o fármaco e a matriz polimérica através da calorimetria exploratória diferencial (DSC).
- Estudar o perfil de liberação *in vitro* do metotrexato a partir das nanoesferas, utilizando fluido lacrimal simulado como meio de liberação.
- Avaliar a estabilidade *in vitro* das nanoesferas em presença dos componentes do muco ocular, a mucina e a lisozima.
- Investigar preliminarmente a potencial toxicidade dos sistemas desenvolvidos, através do ensaio de viabilidade celular com iodeto de propídio.

## ***4. MATERIAIS E MÉTODOS***

---

## **4.1 MATERIAIS**

### **4.1.1 Matérias-primas**

- Ácido poli-(D,L-lático) 90000-120000 kD (PLA) (Sigma-Aldrich - EUA);
- Ácido poli-(D,L-lático)-co-polietilenoglicol 49 kD (PLA-PEG) – 20% de PEG com massa molar de 5 kD (Alkermes Inc – EUA).
- Metotrexato sódico (Biometrox<sup>®</sup>, Biosintética – Brasil);
- Miglyol 812 N (Sasol – EUA);
- Monooleato de sorbitano (Span 80, Bereca – Brasil);
- Monooleato de sorbitano polioxietilenado (Tween 80, Delaware – Brasil);

### **4.1.2 Solventes e reagentes**

- Acetona (Vetec - Brasil);
- Acetato de amônia (Vetec - Brasil);
- Acetato de etila (Vetec - Brasil);
- Acetonitrila grau CLAE (Tedia Company Inc - EUA);
- Ácido fosfotúngstico (Sigma - Espana);
- Ácido perclórico (Vetec – Brasil);
- Bicarbonato de sódio (Vetec - Brasil);
- Carbonato de sódio (Synth - Brasil);
- Cloreto de cálcio dihidratado (Vetec - Brasil);
- Cloreto de magnésio hexahidratado (Synth - Brasil);
- Cloreto de potássio (Vetec - Brasil);
- Cloreto de sódio (Vetec - Brasil);
- Fosfato de sódio dibásico monohidratado (Synth - Brasil);
- Fosfato de potássio monobásico (Synth - Brasil);
- D-glicose anidra (Synth - Brasil);
- Hidróxido de sódio (Cinética Química - Brasil);
- Iodeto de propídio (Sigma-Aldrich - EUA);

- L-Glutationa (Akrós - EUA);
- Lisozima (Sigma-Aldrich - EUA);
- Mucina (Sigma-Aldrich - EUA);
- Metanol grau CLAE (Vetec - Brasil);
- Quetamina (Vetbrands - Brasil);
- Tetrahidrofurano grau CLAE (Vetec - Brasil);
- Xilazina (Vetbrands - Brasil).

Todos os solventes, com exceção dos utilizados para CLAE, possuíam grau de pureza para análise (P.A).

#### **4.1.3 Equipamentos**

- Agitador magnético Are-Velp Scientifica;
- Analisador Termogravimétrico TGA-50 (Shimadzu);
- Aquecedor Elt4-basic Ika Labor Technik;
- Balança analítica Ohaus Corporation AS200S;
- Banho de ultrassom Ultrasonic Cleaner Unique 1400 USC;
- Bomba de vácuo Marconi;
- Calorímetro diferencial de varredura DSC-60 (Shimadzu);
- Capela de fluxo laminar vertical Pachane;
- Centrífuga Sigma 2-15;
- Centrífuga Sigma 4K 15;
- Coluna RP C<sub>18</sub> Shimadzu Shim-pack CLC-ODS (150 mm x 4.6 mm, 5 µm);
- Coluna RP-C<sub>18</sub> Agilent Zorbax ODS (150 mm x 4.6 mm, 5 µm);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-10A system (Kyoto, Japão) equipado com LC-10AD bomba, SPD-10AV, Class-VP;
- Dissolutor Nova Ética (Modelo 299, Brasil);
- Evaporador rotatório Quimis Q-344B2;
- Microscópio de epifluorescência Olympus (Modelo IX71);
- Microscópio eletrônico de transmissão JEM-1200 ExII (JEOL);
- pHmetro Oakton Acorns series;

- Ponta de ultrassom (Fisher – EUA);
- Sacos de diálise (Spectra/Por® membrana MWCO 10000);
- Sistema de purificação Milli-Q® (Millipore, USA);
- Unidades de ultra-filtração e centrifugação Ultrafree-MC 10000 NMWL (Millipore, EUA);
- Viscosímetro Cannon Fenske AS 350 (Schott);
- Vortex Mixer, modelo VS – 1300 V;
- Zetasizer Nano Series (Malvern, Inglaterra).

#### **4.1.4 Material biológico e animais**

##### ➤ **Córneas de porco**

Para a realização de testes preliminares foram utilizadas córneas frescas isoladas de porcos obtidas no Frigorífico Antônio Carlos, situado em Antônio Carlos, Santa Catarina – Brasil.

##### ➤ **Coelhos**

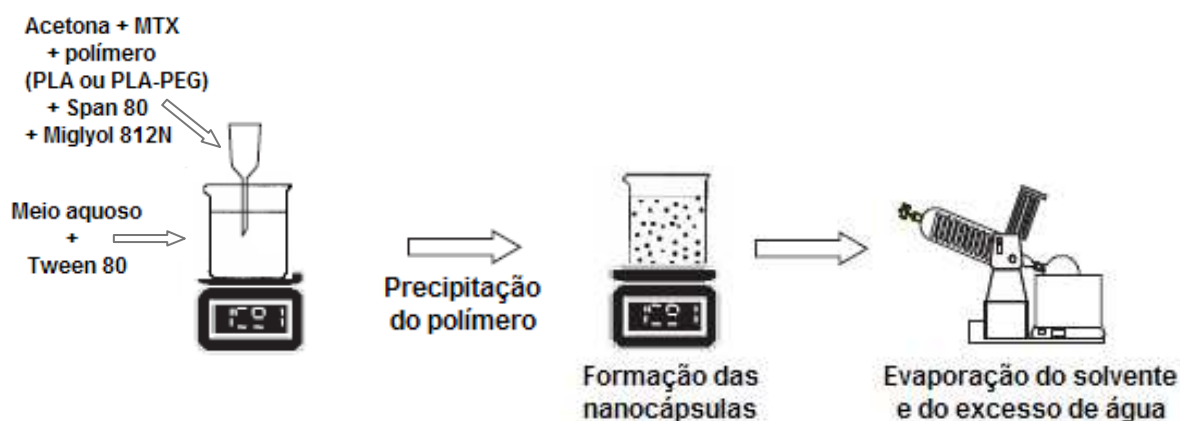
Os coelhos da raça Nova Zelândia, pesando entre 1,5 e 2,5 kg, utilizados no estudo de microscopia de fluorescência foram obtidos da Agropecuária Ingleses, situada em Florianópolis, Santa Catarina – Brasil.

## 4.2 MÉTODOS

### PARTE I

#### 4.2.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo metotrexato

As nanocápsulas foram preparadas segundo as condições estabelecidas por Faria (2005) utilizando a técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado descrita por Fessi e colaboradores (1989). A técnica consiste na preparação de uma solução acetônica contendo 40 mg de polímero (PLA ou PLA-PEG), 125  $\mu$ L de Miglyol 812N e 40 mg de monooleato de sorbitano (Span 80). A esta solução foram adicionados 100  $\mu$ L de solução injetável de metotrexato sódico comercialmente disponível (Biometrox<sup>®</sup> - 25 mg/mL), correspondendo a 2,5 mg do fármaco, e o volume final completado até 10 mL com o mesmo solvente. Esta fase orgânica foi vertida, sob agitação magnética, em 20 mL de uma solução aquosa contendo 0,15 % (p/V) de polisorbato 80 (Tween 80), previamente ajustada a pH 5,0 com ácido perclórico. Por fim, a acetona foi eliminada e o volume da suspensão reduzido a 10 mL em rotaevaporador. A figura 4 apresenta uma ilustração esquemática do método de obtenção das nanocápsulas contendo o metotrexato.



**Figura 4.** Ilustração esquemática do método de precipitação interfacial do polímero pré-formado ou nanoprecipitação utilizado na preparação das nanocápsulas contendo metotrexato.

Fonte: Modificado de SCHAFFAZICK *et al.*, 2003, p. 727.

## **4.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e teor de metotrexato nas suspensões de nanocápsulas**

### **4.2.2.1 Validação do método de doseamento de metotrexato por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A validação da metodologia analítica foi realizada conforme critérios estabelecidos pelo ICH (2005) através dos parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão e limite de quantificação.

#### **4.2.2.1.1 Condições Cromatográficas**

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japão), equipado com bombas LC-10AD, detector UV/VIS SPD-10AV, unidade de controle SCL-10Avp e injetor Rheodyne 7125. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Shimadzu Shim-pack CLC-ODS (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) e o sistema foi mantido a temperatura de 40 ± 1 °C.

A fase móvel, adaptada da metodologia descrita por Faria (2005), consiste numa mistura de água:acetona:tetrahidrofurano (65:30:5 v/v) ajustada a pH 3,0 com ácido perclórico. As análises foram realizadas em modo isocrático, com fluxo de 0,8 mL/min, detecção UV a 313 nm e volume de injeção de 20 µL.

Os dados foram obtidos utilizando o programa CLASS-VP, através da área dos picos detectados.

#### **4.2.2.1.2 Linearidade**

A linearidade foi avaliada através da construção de três curvas de calibração, em diferentes dias, contemplando concentrações de 10 a 50 µg/mL. A partir de uma solução mãe de metotrexato 500 µg/mL foram preparadas diluições de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL utilizando a fase móvel como diluente. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear.

#### **4.2.2.1.3 Precisão**

A repetibilidade do método foi avaliada através da análise de seis amostras de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo 30 µg/mL de metotrexato em um mesmo dia. A precisão intermediária, por sua vez, foi determinada pela análise de seis amostras na mesma concentração realizadas em três dias distintos. A precisão foi expressa através dos desvios padrões relativos obtidos.

#### **4.2.2.1.4 Especificidade**

Amostras de nanocápsulas brancas de PLA e PLA-PEG foram injetadas no cromatógrafo a fim de garantir que os componentes das nanocápsulas não interferem na detecção e quantificação do metotrexato.

#### **4.2.2.1.5 Exatidão**

A exatidão foi avaliada através de um teste de recuperação. Nanocápsulas brancas de PLA e PLA-PEG foram contaminadas com concentrações conhecidas de metotrexato: 12,5, 25 e 37,5 µg/mL. Foram injetadas em triplicata amostras das nanocápsulas brancas, das nanocápsulas contaminadas e das soluções de metotrexato 12,5, 25 e 37,5 µg/mL. As porcentagens de recuperação foram calculadas conforme a equação:

**(Equação 1)**

$$R\% = \frac{C_{NC} - B_{NC}}{S_{MTX}}$$

Em que:

R % = porcentagem de recuperação

C<sub>NC</sub> = nanocápsulas contaminadas

B<sub>NC</sub> = nanocápsulas brancas

S<sub>MTX</sub> = soluções de metotrexato



#### **4.2.2.1.6 Limite de quantificação**

O limite de quantificação foi calculado através da fórmula matemática preconizada pelo ICH (2005), sendo utilizados os valores de desvio padrão e de inclinação das curvas de calibração construídas no item 4.2.2.1.2. O limite de quantificação pode ser expresso pela equação:

**(Equação 2)**

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC}$$

Em que:


LQ = limite de quantificação

DP = desvio padrão do intercepto com o eixo de Y

IC = inclinação da curva de calibração

#### **4.2.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação e taxa de recuperação de metotrexato**

Para a determinação da concentração total de MTX nas formulações, alíquotas de 1 mL das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG (n=3) foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume final completado com acetonitrila para completa dissolução das nanocápsulas. A taxa de recuperação de fármaco nas suspensões foi expressa em concentração percentual (%).

Em seguida, alíquotas de 500 µL das nanocápsulas (n=3) foram transferidas para unidades de ultrafiltração/centrifugação (Ultrafree-MC 100000 NMWL; Milipore – EUA) e centrifugadas a 9170 x g  20 minutos. Após a separação, 20 µL do filtrado foi retirado e diluído em 120 µL de acetonitrila para determinação da eficiência de encapsulação. As amostras foram analisadas por CLAE, conforme condições cromatográficas descritas em 4.2.2.1.1. A EE foi calculada como sendo a diferença percentual entre a quantidade de

fármaco presente na suspensão após dissolução das partículas em acetonitrila e aquela encontrada no filtrado, empregando-se a seguinte equação:

(Equação 3)

$$EE\% = CI - \frac{(CF \times 100)}{CI}$$

Em que:

CI = Concentração total de MTX

CF = Concentração de MTX no filtrado

#### **4.2.3 Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG**

Amostras dos sistemas nanoestruturados foram estocadas a temperatura ambiente e em geladeira (4-8 °C) durante 45 dias. Nos tempos 3, 7 e 21 dias, alíquotas das suspensões foram retiradas e avaliadas quanto ao aspecto macroscópico, pH e concentração total de fármaco. Nos tempos zero e 45 dias foram avaliados, além dos parâmetros citados acima, a viscosidade, tamanho de partícula, índice de polidispersão e eficiência de encapsulação.

O aspecto macroscópico foi avaliado pela observação da coloração, presença de sedimentação, floculação e/ou agregação. Os valores de pH foram determinados utilizando pHmetro Oakton Acorns series.

As medidas de viscosidade foram realizadas em viscosímetro Cannon Fenske AS 350 (Schott) através da técnica de viscosimetria capilar. Para a determinação propriamente dita, alíquotas de 6 mL das nanocápsulas foram transferidas para o viscosímetro termostatizado a 37 °C, sendo utilizado o capilar número 100 (constante igual a 0,015) para a realização das medidas. De acordo com o tempo de escoamento de cada amostra, a viscosidade relativa foi determinada através da equação:

(Equação 4)

$$V = k(t - \mathcal{G})$$

Em que:

V = viscosidade cinemática (cSt)

K = constante do viscosímetro

t = tempo de passagem da amostra

$\mathcal{G}$  = correção da energia cinemática

O diâmetro médio e o índice de polidispersão das partículas foram determinados em equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern, Inglaterra) através da técnica de espectroscopia de correlação fotônica. Por fim, as análises de concentração de fármaco total e encapsulado foram realizadas conforme previamente descrito no item 4.2.2.2.

#### **4.2.4 Termogravimetria e Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

A caracterização termogravimétrica dos polímeros foi realizada em uma termobalança TG-50 da Shimadzu. Para os ensaios foram utilizados cadinhos de platina com massa de amostra de aproximadamente 4 mg sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min), com razão de aquecimento de 5 °C/min, na faixa de temperatura de 25 a 450 °C. O equipamento foi previamente calibrado com oxalato de cálcio monohidratado com perdas de massa bem definidas.

Para a caracterização termoanalítica, as curvas de DSC foram obtidas em uma célula DSC-60 Shimadzu utilizando cápsulas de alumínio fechadas com aproximadamente 2 mg de amostra sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min). O equipamento foi previamente calibrado com índio (PF 156,6 °C;  $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54$  J/g) e zinco (PF 419,6 °C). A faixa de temperatura utilizada para os polímeros e para as suspensões de nanopartículas brancas e com fármaco foi de -40 a 400 °C, enquanto que para o fármaco puro foi de 25 a 400 °C. A razão de aquecimento para todas as amostras foi de 5 °C/min.

#### **4.2.5 Determinação do coeficiente de partição o/a do metotrexato:**

A determinação do coeficiente de partição do metotrexato em Miglyol 812N/água foi realizada conforme metodologia descrita por Mayorga e colaboradores (1996). Em tubos de ensaio foram adicionados 2 mL de Mygliol 812N previamente saturado com água, 100 µL de metotrexato (2,5 mg) e 2 mL de água destilada ajustada com ácido perclórico a pH 3,0, 5,0 e 7,0. Após a mistura, os tubos foram vortexados durante 1 minuto e em seguida centrifugados por 15 minutos a 1830 x g. Após a centrifugação, 100 µL da fase oleosa e 100 µL da fase aquosa foram colocadas em balão de 10 mL e o volume final completado com fase móvel (água:acetonitrila:tetrahydrofurano; 65:30:5 v/v/v; pH 3.0). Em seguida, as amostras foram analisadas por CLAE conforme descrito em 4.2.2.1. O coeficiente de partição ( $K_p$ ) foi calculado como sendo a razão entre a concentração de metotrexato na fase oleosa e na fase aquosa.

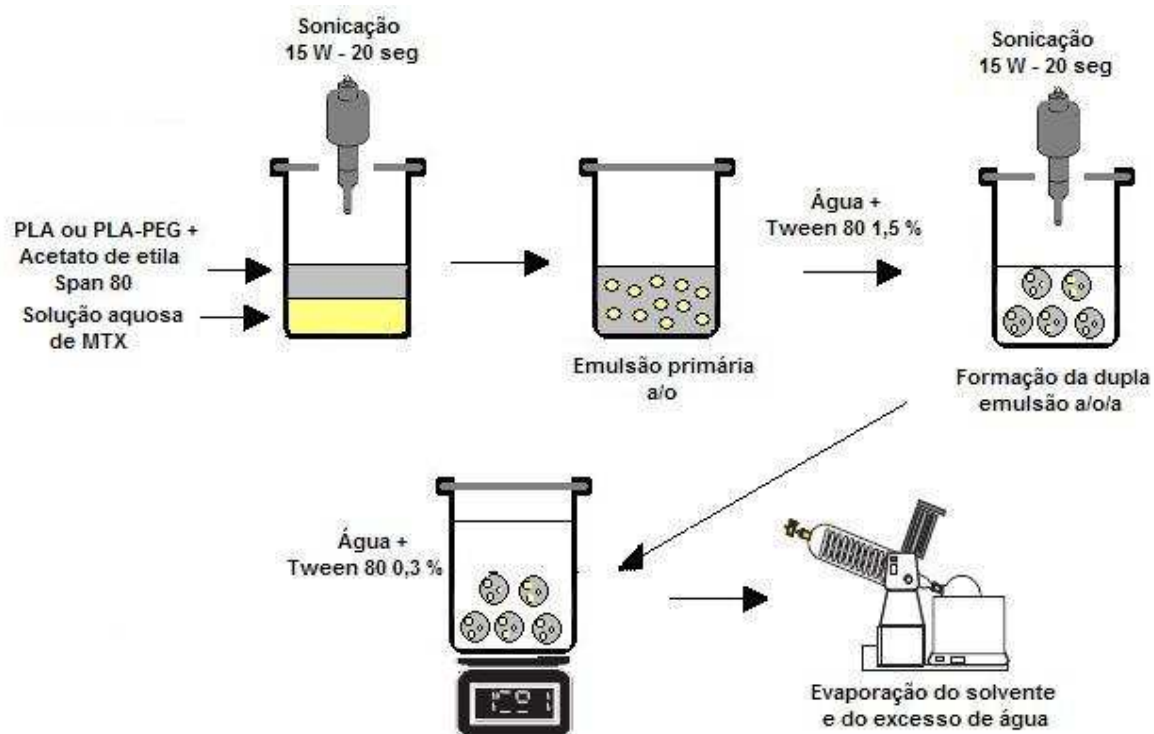
## **PARTE II**

### **4.2.6 Preparação das suspensões de nanoesferas de PLA e PLA-PEG contendo metotrexato**

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 e Alonso (1997).

Em tubos de ensaio, 40 mg do polímero (PLA ou PLA-PEG) e 20 mg de monooleato de sorbitano (Span 80) foram solubilizados em 2 mL de acetato de etila em banho de ultra-som. A esta solução adicionou-se 100 µL de solução aquosa injetável de metotrexato sódico comercialmente disponível (Biometrox<sup>®</sup>), correspondendo a 2,5 mg do fármaco, e 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. Em seguida, adicionou-se a emulsão primária 2 mL de uma solução aquosa 1,5 % (p/V) de polisorbato 80 (Tween 80). A mistura foi submetida novamente à agitação por ponta de ultra-som, nas mesmas condições acima descritas, formando-se então a dupla emulsão a/o/a. Para favorecer a partição da dupla emulsão formada, foram adicionados sob agitação magnética 96 mL de uma solução de Tween 80 0,3 % (p/V). A suspensão resultante permaneceu sob agitação magnética por 30 minutos e, em seguida, o volume da suspensão reduzido a 10 mL em rotaevaporador.

Com a evaporação do solvente orgânico, o polímero, insolúvel na fase aquosa, solidifica, formando as nanoesferas que contém o fármaco. A figura 5 apresenta uma ilustração esquemática do método de obtenção das nanoesferas contendo MTX.



**Figura 5.** Ilustração esquemática do método de dupla emulsão utilizado na preparação das nanoesferas contendo metotrexato.

#### 4.2.7 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e taxa de recuperação de metotrexato nas suspensões de nanoesferas

A eficiência de encapsulação e taxa de recuperação de metotrexato nas suspensões de nanoesferas foram determinados da mesma forma que descrito no item 4.2.2.2.

#### 4.2.8 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das suspensões de nanoesferas

Os experimentos foram realizados em um equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern, Inglaterra). O tamanho de partícula e índice de polidispersão foram determinados através da técnica de espectroscopia de correlação fotônica. O potencial zeta das suspensões, por sua vez, foi determinado a partir da mobilidade eletroforética por Anemometria Laser Doppler num campo elétrico de 150 V/cm.

#### 4.2.9 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O DSC das suspensões de nanoesferas foram realizadas conforme descrito no item 4.2.4, utilizando uma faixa de temperatura de 25 – 400 °C.

#### 4.2.10 Determinação do perfil de liberação do metotrexato a partir das nanoesferas de PLA e PLA-PEG

##### 4.2.10.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

###### 4.2.10.1.1 Condições cromatográficas

A concentração de metotrexato no meio de liberação foi determinada por CLAE utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japão), equipado com bomba LC-10AD, detector UV/VIS SPD-10AV, unidade de controle SCL-10Avp e injetor Rheodyne 7125. As condições cromatográficas utilizadas neste estudo foram adaptadas da metodologia descrita por Gao e Jiang (2006) e seguem especificadas na tabela abaixo.

**Tabela 2.** Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação de MTX por CLAE.

<b>Condições</b>	<b>Descrição</b>
Coluna	RP-C <sub>18</sub> Agilent Zorbax ODS (4,6 x 150 mm, 5 µ)
Fase móvel	Tampão acetato de amônio 50 mM pH 6,0 : metanol (77:23)
Fluxo	1 mL/min
Modo	isocrático
Temperatura	40 °C
Deteção	UV ( $\lambda = 313$ nm)
Volume de injeção	20 µL

A fim de garantir a confiabilidade dos resultados do estudo de liberação, alguns parâmetros de validação foram analisados conforme descritos abaixo.

#### **4.2.10.1.2 Linearidade**

A linearidade foi avaliada através da construção de três curvas de calibração, em diferentes dias, contemplando concentrações de 0,15 a 1,0 µg/mL. A partir de uma solução mãe de metotrexato 50 µg/mL foram preparadas diluições de 0,15, 0,30, 0,40, 0,60, 0,80 e 1,0 µg/mL utilizando o meio de liberação como diluente. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear.

#### **4.2.10.1.3 Especificidade**

Amostras de nanoesferas brancas de PLA e PLA-PEG foram injetadas em triplicata no cromatógrafo a fim de garantir que os componentes das nanoesferas não interferem na detecção e quantificação do metotrexato.

#### **4.2.10.1.4 Limite de quantificação**

O limite de quantificação foi calculado através da fórmula matemática preconizada pelo ICH (2005), demonstrada no item 4.2.2.1.6, sendo utilizados os valores de desvio padrão e de inclinação das curvas de calibração construídas.

#### **4.2.10.2 Perfil de liberação do metotrexato a partir das nanoesferas**

O meio de liberação selecionado para este estudo foi o fluido lacrimal simulado (VAN HAERINGEN *et al.*, 1981). Para cada litro de fluido preparado foram pesados 1,789 g de KCl, 6,312 g de NaCl, 0,0672 g de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0,1579 g de MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O e o volume final completado com água mili-Q. Uma solução de NaHCO<sub>3</sub> (2,184 g/L) foi preparada para ajustar o pH a 7,4.



A liberação do metotrexato a partir das nanoesferas foi avaliada através da técnica de diálise. Uma alíquota de 2 mL das suspensões de nanoesferas ou de uma solução aquosa de MTX a 0,25 mg/mL foi transferida para o interior do saco de diálise (Spectra/Por® membrana MWCO 10000). O experimento foi realizado em um Dissolutor Nova Ética (Modelo 299, Brasil) utilizando 400 mL de meio de liberação, USP aparato II (pá), velocidade de 100 rpm e temperatura de 37 °C. Alíquotas de 2 mL do meio de liberação foram coletadas nos tempos zero, 15, 30, 60, 120, 240, 480 e 720 minutos. O volume de amostra retirado foi imediatamente repostado com o mesmo meio de liberação. As amostras foram analisadas por CLAE conforme condições descritas no item 4.2.10.1. A concentração de metotrexato foi determinada através da equação da reta média obtida no item 4.2.10.1.2. A partir dos resultados obtidos, a liberação do MTX foi expressa em porcentagem (%) de fármaco liberado *versus* tempo (minutos).

#### **4.2.11 Estudo da interação e estabilidade das nanoesferas de PLA e PLA-PEG frente a componentes do muco ocular**

##### **4.2.11.1 Interação com a mucina**

A interação das nanoesferas 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 nas proporções 0:100, 10:90, 50:50, 90:10 e 100:0 (V/V) foram preparadas. Para a realização do estudo, alíquotas de 6 mL das misturas foram transferidas para um viscosímetro capilar Cannon Fenske AS 350 (Schott) termostaticado a 37 °C, sendo utilizado o capilar número 100 (constante 0,015). As medidas de viscosidade foram realizadas no tempo zero e após 60 e 120 minutos de incubação da mistura. De acordo com o tempo de escoamento de cada amostra, a viscosidade relativa foi determinada através da equação 4 descrita no item 4.2.3.

#### **4.2.11.2 Estabilidade frente a lisozima**

##### **4.2.11.2.1 Tamanho de partícula e caracterização morfológica dos sistemas**

O estudo foi realizado em equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern, Inglaterra) através da técnica de espectroscopia de correlação fotônica. As medidas de tamanho de partícula e índice de polidispersão foram utilizadas para avaliar a influência da lisozima sobre a estabilidade das nanoesferas. Alíquotas de 200  $\mu$ L das suspensões foram misturadas a 1 mL de uma solução de lisozima 1 mg/mL. Em seguida, foram realizadas as medidas de tamanho de partícula e índice de polidispersão das nanoesferas puras e da mistura nanoesferas/lisozima no tempo zero e após 2 horas de incubação em banho termostatizado a 37 °C. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram analisados estatisticamente empregando análise de variância (ANOVA).

A morfologia das nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo metotrexato foi analisada através de microscopia eletrônica de transmissão (MET; modelo JEM-1200 ExII). Foram examinadas morfologicamente nanoesferas puras e após incubação com uma solução de lisozima 1 mg/mL nos tempos 2 e 4 horas. As amostras foram colocadas em grids por 2 minutos, e em seguida, coradas durante 1 minuto com 2 % (p/V) de ácido fosfotúngstico. Após a coloração, as amostras foram lavadas por 30 segundos e analisadas por microscopia.

#### **4.2.12 Avaliação da viabilidade celular do tecido corneal após administração tópica ocular das suspensões de nanoesferas**

A fim de avaliar a toxicidade das nanoesferas de PLA e PLA-PEG sobre o tecido corneal foi realizada uma análise microscópica das córneas de coelhos albinos Nova Zelândia após a administração tópica ocular das nanoesferas brancas, do metotrexato puro e de uma solução controle.

Para otimização das condições do estudo, como concentração de corante utilizado e tempo de exposição deste com a córnea, foram utilizados olhos de porcos enucleados logo após o abate dos animais e conservados em tampão Ringer glutationizado até a realização dos experimentos. As córneas foram cuidadosamente removidas do globo ocular mediante corte

na esclera e mergulhadas em soluções de iodeto de propídio nas concentrações de 1 e 2,5 µg/mL e mantidas nestas soluções por 15, 30, 60 e 120 minutos, sendo posteriormente analisadas em um microscópio de epifluorescência (Olympus).

O estudo propriamente dito foi realizado utilizando 7 coelhos albinos Nova Zelândia, pesando entre 1,5 e 2,0 quilos, sendo 2 coelhos (n= 4 córneas) utilizados para cada formulação e para o fármaco puro e 1 coelho (n= 2 córneas) utilizado como controle, sendo administrado apenas soro fisiológico 0,9 % (p/V). Foram instiladas topicamente 25 µL das amostras, com intervalos de 5 minutos entre as instilações do olho esquerdo para o direito, sendo este procedimento repetido após 15 minutos. Decorridos 60 minutos da última administração, os coelhos foram anestesiados utilizando uma mistura de quetamina (35 mg/Kg) e xilazina (5 mg/Kg) IV através da veia marginal da orelha e , em seguida a eutanásia foi realizada com injeção de cloreto de potássio 20 % (p/V) IV, conforme protocolo (anexo B) aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). Rapidamente as córneas foram retiradas do globo ocular mediante corte na esclera, mergulhadas em uma solução de iodeto de propídio 1 µg/mL em tampão Ringer a 37 °C durante 15 minutos e levadas posteriormente ao microscópio para observação da viabilidade das células do tecido corneal (ROJANASAKUL *et al.*, 1990; CALVO *et al.*, 1994; NANAVATY *et al.*, 2006).

## ***5. RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

## **PARTE I**

### **5.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo metotrexato**

A técnica utilizada para a preparação das nanocápsulas foi a deposição interfacial do polímero pré-formado ou nanoprecipitação, descrita por Fessi e colaboradores (1989). O princípio de formação das nanocápsulas por esta técnica tem sido explicado pela turbulência interfacial gerada durante o deslocamento do solvente, permitindo que gotas submicrométricas do óleo, previamente adicionado à fase orgânica, sejam formadas e estabilizadas por uma camada de polímero que se deposita na interface, fornecendo uma barreira mecânica para a coalescência (MOSQUEIRA *et al.*, 2000; COUVREUR *et al.*, 2002; BILATI *et al.*, 2005). A utilização desta técnica apresenta inúmeras vantagens, tais como rapidez e facilidade, não sendo necessários longos períodos de agitação ou sonificação das amostras, nem tampouco a utilização de altas temperaturas. Além disso, a nanoprecipitação é capaz de produzir partículas de tamanhos bastante reduzidos, com baixos índices de polidispersão (BILATI *et al.*, 2005).

A nanoprecipitação pode ser utilizada para a encapsulação de substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas. Porém, a eficiência de encapsulação de substâncias hidrofílicas é geralmente baixa, devido à migração destas para a fase aquosa (LEO *et al.*, 2004). Vários estudos têm sido realizados com o intuito de melhorar a nanoencapsulação de fármacos hidrofílicos. A variação de parâmetros como o pH da fase aquosa e a adição de novos excipientes às formulações vem sendo explorada com sucesso na melhoria da encapsulação destes fármacos (GOVENDER *et al.*, 1999; BARICHELLO *et al.*, 1999; LEO *et al.*, 2004).

Considerando as vantagens da nanoprecipitação, bem como a possibilidade de encapsulação de fármacos com caráter hidrofílico, como é o caso do metotrexato sódico, esta técnica foi selecionada para o desenvolvimento de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo metotrexato sódico. A seleção dos componentes e o desenvolvimento das formulações foram realizados em nosso laboratório por Faria (2005). O presente trabalho dá continuidade à caracterização e avaliação físico-química dos sistemas previamente desenvolvidos.

## **5.2 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e taxa recuperação de metotrexato nas suspensões de nanocápsulas**

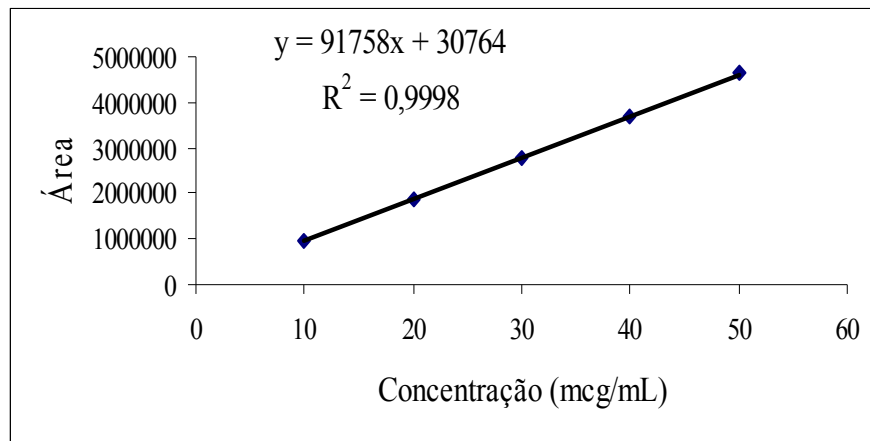
### **5.2.1 Validação do método de doseamento de metotrexato por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Diversas técnicas de detecção podem ser utilizadas para a quantificação de metotrexato por CLAE: espectrofotometria UV-Vis, fluorimetria, oxidação eletroquímica e espectrometria de massa. Dentre as técnicas mencionadas, a mais utilizada é a espectrofotometria UV, onde o MTX apresenta uma forte absorção devido à presença do grupo cromóforo heteroaromático pterina. Em condições cromatográficas que empregam a fase reversa, o MTX pode ser eluído em modo isocrático pelo emprego de misturas de tampões aquosos, em valores de pH variando entre 2,5 e 6,7, com vários solventes orgânicos, como acetonitrila, metanol e, menos freqüentemente, tetrahydrofurano (RUBINO, 2001).

As condições cromatográficas do método de doseamento do MTX foram escolhidas considerando as informações descritas na literatura. A fase móvel utilizada consiste na mistura de água:acetonitrila:tetrahydrofurano (65:30:5 v/v/v) ajustada a pH 3,0 com ácido perclórico. As análises foram realizadas em modo isocrático e com detecção UV a 313 nm.

Em seguida, a validação da metodologia analítica foi realizada conforme critérios estabelecidos pelo ICH (2005) através dos parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão e limite de quantificação. A validação deve garantir por meio de estudos experimentais que o método atenda às exigências das aplicações analíticas assegurando assim a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2004).

A *linearidade* de método analítico é a habilidade com que os dados apresentam-se diretamente proporcionais às concentrações de um analito na amostra (CHIAP *et al.*, 2000). Dentro da faixa de trabalho especificada (10-50 µg/mL) o método demonstrou-se linear, apresentando um coeficiente de correlação de 0,9998. A figura 6 representa a equação da reta obtida por regressão linear, bem como a curva de calibração média utilizada na conversão entre as áreas dos picos dos cromatogramas obtidas e a concentração dos analitos.



**Figura 6.** Curva de calibração média do metotrexato obtida por CLAE e sua respectiva equação da reta.

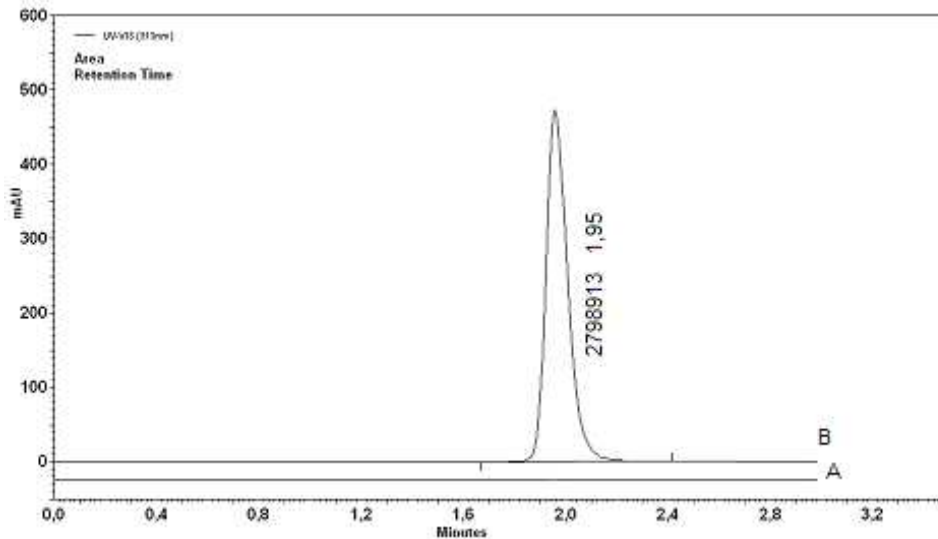
Na tabela 3, estão representados os valores experimentais médios obtidos das áreas absolutas utilizadas para a construção da curva de calibração.

**Tabela 3.** Áreas dos picos médios obtidas após análise das soluções de metotrexato por CLAE (n=3).

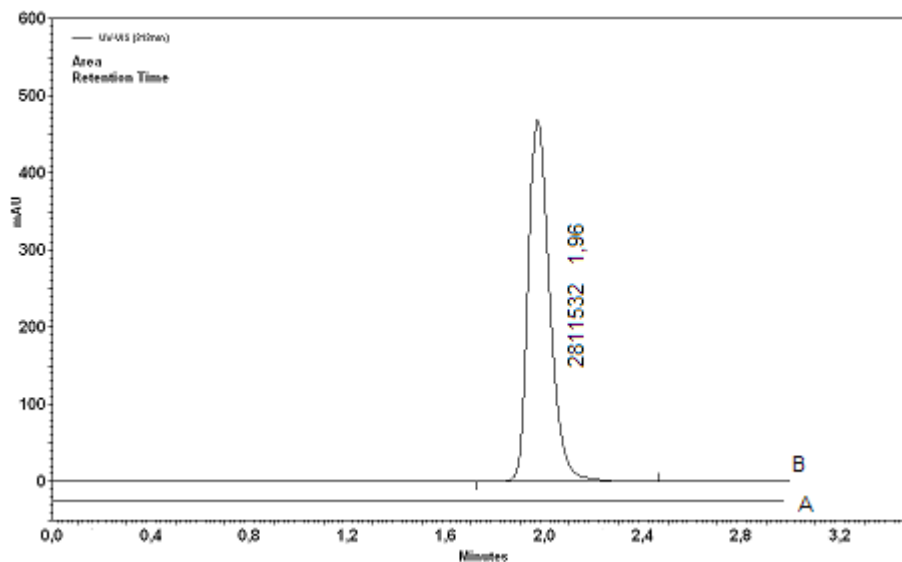
Faixa de linearidade (µg/mL)	Área do pico (Média ± σ)	C.V (%)
10	959133,33 ± 3195,5	0,33
20	1874552,22 ± 43505,5	1,12
30	2758222,78 ± 17818,5	0,65
40	3682658,67 ± 5135,6	0,14
50	4642992,67 ± 23594,8	0,51

A *especificidade* de um método analítico é a sua capacidade em atribuir valor quantitativo inequívoco à substância a ser analisada na presença de componentes de uma formulação que poderiam interferir na sua determinação em uma mistura complexa (BRASIL, 2004). Portanto, para a avaliação da especificidade do método, foram injetadas nanocápsulas brancas de PLA e PLA-PEG, a fim de demonstrar que nenhum dos componentes dos sistemas absorve no mesmo comprimento de onda utilizado para as análises do metotrexato ( $\lambda=313$

nm). Conforme apresentado na figura 7 (A) e 8 (A), o método demonstrou-se específico, sendo que nenhum componente da formulação interferiu na quantificação do fármaco.



**Figura 7.** Cromatogramas típicos obtidos por CLAE. (A) Nanocápsulas brancas de PLA. (B) Nanocápsulas de PLA contendo 30 µg/mL de MTX.



**Figura 8.** Cromatogramas típicos obtidos por CLAE. (A) Nanocápsulas brancas de PLA-PEG. (B) Nanocápsulas de PLA-PEG contendo 30 µg/mL de MTX.



A *precisão* do método é o grau de concordância entre os resultados das análises individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de teste (BRASIL, 2004). A repetibilidade e a precisão intermediária obtiveram coeficientes de variação menores que 0,72 %, demonstrando que o método proposto é preciso. Os cromatogramas típicos obtidos com a concentração de 30 µg/mL utilizada para o estudo da precisão estão demonstrados nas figuras 7 (B) e 8 (B). Os resultados das análises intra e inter-dia são apresentados na tabela 4.

**Tabela 4.** Valores experimentais médios obtidos durante o estudo da precisão do método (n=6).

Amostra (30 µg/mL)		Quantidade experimental (µg/ml; Média ± C.V.)	Recuperação (%)
Nanocápsulas PLA	Dia 1	29,75 ± 0,37	99,18
	Dia 2	29,95 ± 0,14	99,84
	Dia 3	30,23 ± 0,22	100,78
	Inter-dia	29,92 ± 0,72	99,75
Nanocápsulas PLA-PEG	Dia 1	29,96 ± 0,56	99,87
	Dia 2	30,21 ± 0,88	100,71
	Dia 3	30,43 ± 1,49	101,45
	Inter-dia	30,20 ± 0,79	100,67

A *exatidão* de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2004). A taxa de recuperação é a relação entre o resultado experimental obtido depois da análise de uma amostra contaminada com uma quantidade conhecida do analito e o valor teórico desta quantidade contaminada (ABRANTES, 2003). O teste de recuperação foi utilizado para a verificação da exatidão do método proposto, sendo que todos os valores experimentais obtidos encontravam-se dentro dos limites aceitáveis (95-105%) de recuperação (tabela 5), demonstrando assim, que o método é exato.

**Tabela 5.** Valores de recuperação (%) obtidos após contaminação das nanocápsulas (n=3) com diferentes concentrações de metotrexato ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Amostras	Níveis ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%; Média $\pm$ $\sigma$ )
Nanocápsulas PLA	12,5	100,36 $\pm$ 0,23
	25	99,54 $\pm$ 0,13
	37,5	101,23 $\pm$ 0,32
Nanocápsulas PLA-PEG	12,5	96,74 $\pm$ 0,43
	25	98,11 $\pm$ 0,10
	37,5	100,33 $\pm$ 0,37

O *limite de quantificação* do fármaco, calculado empregando-se os valores de desvio padrão e da inclinação da curva de calibração, foi de 2,61  $\mu\text{g/mL}$ . Considerando que a faixa de concentração utilizada para a quantificação do metotrexato foi de 10-50  $\mu\text{g/mL}$  conclui-se que o fármaco é seguramente quantificável na faixa de trabalho escolhida.

Por fim, os resultados obtidos durante o estudo de validação permitem concluir que o método proposto é adequado e seguro para a quantificação do metotrexato nos sistemas nanocapsulados.

### 5.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação e taxa de recuperação de metotrexato

A determinação da quantidade de fármaco associada às nanopartículas é especialmente complexa devido ao tamanho reduzido destas, que dificulta a separação da fração de fármaco livre da fração associada. Uma técnica amplamente utilizada para este fim é a ultrafiltração/centrifugação, na qual uma membrana é empregada para separar a fase aquosa dispersante da suspensão coloidal. A concentração livre do fármaco é determinada no ultrafiltrado, enquanto a concentração total de fármaco é geralmente determinada pela completa dissolução das nanopartículas em um solvente adequado. Por conseguinte, a fração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada pela diferença entre as concentrações de fármaco total e livre (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais destacam-se as características físico-químicas do fármaco, o pH do meio, as características de superfície ou a natureza do polímero, a quantidade de fármaco adicionada à formulação, natureza do óleo utilizado e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A tabela 6 apresenta os valores de eficiência de encapsulação e taxa de recuperação de metotrexato encontrados nas nanocápsulas de PLA e PLA-PEG obtidos através da técnica de nanoprecipitação. A eficiência de encapsulação média de ambos os polímeros foi de aproximadamente 22 %, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles (teste t de student,  $p < 0,05$ ). A baixa eficiência de encapsulação de substâncias hidrofílicas é amplamente descrita na literatura (GOVENDER *et al.*, 1999; BARICHELLO *et al.*, 1999; LEO *et al.*, 2004), principalmente devido à facilidade de migração do fármaco para a fase externa. Govender e colaboradores (2000) estudaram as propriedades de incorporação do cloridrato de procaína em nanopartículas de PLA-PEG preparadas por nanoprecipitação, e encontraram valores de eficiência que variaram de 6,44 a 10,67 %. Estes baixos valores de eficiência foram atribuídos à ampla área de superfície das partículas devido à presença do copolímero PLA-PEG que, juntamente com a natureza hidrossolúvel do fármaco, acelera a perda do fármaco para a fase aquosa durante a nanoprecipitação.

Em relação às nanocápsulas de PLA, Leo e colaboradores (2004) encontraram valores de eficiência de encapsulação menores que 10 % em nanocápsulas de PLA contendo cloricromene na forma de sal preparadas pela técnica de nanoprecipitação, demonstrando que características como a hidrofobicidade e a menor área de superfície do PLA nem sempre são suficientes para aumentar a eficiência de encapsulação de fármacos hidrofílicos.

**Tabela 6.** Valores de eficiência de encapsulação e taxa de recuperação de metotrexato nas nanocápsulas de PLA e PLA-PEG (n=3) preparadas através da técnica de nanoprecipitação.

<b>Formulação</b>	<b>Eficiência de encapsulação (%, Média <math>\pm</math> <math>\sigma</math>)</b>	<b>Taxa de recuperação (%, Média <math>\pm</math> <math>\sigma</math>)</b>
Nanocápsulas PLA	22,38 $\pm$ 0,94	103,52 $\pm$ 1,03
Nanocápsulas PLA-PEG	22,35 $\pm$ 1,63	102,18 $\pm$ 1,36

Vários estudos vêm demonstrando que a variação de parâmetros como o pH da fase aquosa e a adição de novos excipientes às formulações podem melhorar significativamente a encapsulação de fármacos hidrofílicos (GOVENDER *et al.*, 1999; BARICHELLO *et al.*, 1999; LEO *et al.*, 2004). Desta forma, na tentativa de aumentar a eficiência de encapsulação do metotrexato e, considerando os resultados obtidos por Faria (2005), no qual melhores eficiências de encapsulação foram conseguidas através da acidificação da fase aquosa, nanocápsulas foram preparadas com a fase aquosa ajustada a pH 3,0.

A tabela 7 apresenta os resultados de eficiência de encapsulação e taxa de recuperação de metotrexato das nanocápsulas de PLA e PLA-PEG preparadas com a fase aquosa acidificada a pH 3,0. Apesar de relatado na literatura que a mudança de pH da fase aquosa pode melhorar a eficiência de encapsulação de fármacos (UEDA e KREUTER, 1997; VANDERVOORT e LUDWIG, 2001), não foi observada uma mudança significativa nos valores de encapsulação do metotrexato em ambos os sistemas.

**Tabela 7.** Valores de eficiência de encapsulação e taxa de recuperação de metotrexato nas nanocápsulas de PLA e PLA-PEG (n=3) preparadas com a fase aquosa ajustada a pH 3,0.

<b>Formulação</b>	<b>Eficiência de encapsulação (%, Média <math>\pm</math> <math>\sigma</math>)</b>	<b>Taxa de recuperação (%, Média <math>\pm</math> <math>\sigma</math>)</b>
Nanocápsulas PLA	24,40 $\pm$ 0,47	101,55 $\pm$ 0,17
Nanocápsulas PLA-PEG	24,75 $\pm$ 1,50	102,45 $\pm$ 0,02

Considerando que a acidificação do pH não melhorou significativamente os resultados de eficiência de encapsulação, os estudos seguintes foram realizados com as nanocápsulas preparadas a pH 5,0, uma vez que formulações com pH 3,0 não seriam adequadas para a administração tópica ocular.

### **5.3 Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG**

As suspensões coloidais normalmente não apresentam tendência à separação de fases durante alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é lento para

partículas submicrométricas, sendo minimizado pelo movimento Browniano. No entanto, com o tempo, pode ocorrer a aglomeração das partículas e, conseqüentemente, a sedimentação. Vários fatores influenciam a estabilidade das suspensões coloidais como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de tensoativo adsorvido. Além disso, a avaliação da estabilidade química dos polímeros formadores dos colóides, sob diferentes condições de armazenamento, é de fundamental importância (MAGENHEIM e BENITA, 1991; MOLPECERES *et al.*, 1997). O tamanho de partícula, o potencial zeta, a distribuição de massa molar do polímero, o teor de fármaco e o pH são geralmente os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas. Poucos estudos referentes à estabilidade de nanopartículas contendo diferentes fármacos são encontrados na literatura (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Considerando a importância do estudo de estabilidade dos sistemas coloidais, nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo metotrexato foram armazenadas a temperatura ambiente e a 4-8 °C (geladeira) sendo avaliados, em tempos pré-determinados, os parâmetros de concentração total e eficiência de encapsulação do metotrexato, pH das suspensões, avaliação macroscópica, tamanho de partícula, índice de polidispersão e viscosidade. As tabelas 8 e 9 apresentam os resultados de estabilidade das formulações no decorrer de 45 dias do estudo.

O diâmetro médio de partícula das suspensões foi avaliado no tempo zero e após 45 dias da preparação das formulações, mantidas à temperatura ambiente e em geladeira (4-8 °C). Na tabela 8, que apresenta os resultados deste estudo, observa-se que as nanocápsulas de PLA-PEG apresentaram tamanhos significativamente menores quando comparados aos sistemas preparados com PLA. Ameller e colaboradores (2003) relatam que a presença de cadeias de PEG tende a reduzir o diâmetro médio das nanocápsulas, independente da natureza da cadeia poliéster do copolímero. Este efeito pode ser atribuído às propriedades anfífilas do copolímero que contribuem para a redução da tensão superficial durante a formação das nanocápsulas resultando na obtenção de partículas de tamanho reduzido.

**Tabela 8.** Diâmetro médio e índice de polidispersão de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG obtidos durante estudo de estabilidade (Média;  $\sigma$ ).

Formulação	Diâmetro médio (nm)				Índice Polidispersão (I.P.)			
	Tempo zero		Tempo 45dias		Tempo zero		Tempo 45 dias	
	Amb.	Gelad.	Amb.	Gelad.	Amb.	Gelad.	Amb.	Gelad.
Nanocápsulas PLA	279 (4,28)	274 (7,64)	350 (5,36)	340 (7,81)	0,216 (0,019)	0,216 (0,019)	0,259 (0,025)	0,219 (0,013)
Nanocápsulas PLA-PEG	153 (4,08)	162 (8,04)	166 (1,07)	180,6 (2,86)	0,126 (0,006)	0,134 (0,008)	0,247 (0,026)	0,245 (0,003)

Após os 45 dias de armazenamento, todas as formulações, independente da natureza do polímero, à temperatura ambiente e geladeira, apresentaram um aumento significativo no tamanho de partícula, sendo esse aumento mais pronunciado nas nanocápsulas de PLA. O aumento do diâmetro médio das nanocápsulas após o armazenamento pode estar relacionado com a diminuição do pH das formulações, conforme proposto por Calvo (1995). As modificações de pH podem provocar uma diminuição no potencial zeta das suspensões e, como conseqüência, diminuir as forças repulsivas entre as partículas favorecendo a coalescência. Outro fator que pode estar relacionado ao aumento do tamanho de partícula é a degradação do polímero. O processo de degradação diminui o efeito estabilizador da cobertura polimérica, facilitando assim os processos de agregação e coalescência que conseqüentemente aumentam o tamanho médio das partículas. Através da avaliação macroscópica das formulações, durante todo o período de armazenamento, foi possível observar que após os 45 dias todas as formulações apresentaram aglomerados e precipitados, o que certamente contribuiu para o aumento do tamanho médio das partículas e do índice de polidispersão, que sofreu um aumento estatisticamente significativo após os 45 dias em todas as formulações testadas (teste t de student,  $p < 0,05$ ).

A concentração total de metotrexato foi verificado nos tempos zero, 3, 7, 21 e 45 dias, sendo que as médias dos valores dosados ( $\mu\text{g/mL}$ ) encontram-se na tabela 9.

**Tabela 9.** Resultados do estudo de estabilidade das nanocápsulas de PLA e PLA-PEG mantidas à temperatura ambiente e a 4-8° C (geladeira) durante 45 dias ( Média;  $\sigma$ ).

<b>Estabilidade Nanocápsulas PLA</b>										
	t zero		t 3 dias		t 7dias		t 21 dias		t 45 dias	
	Amb	Gelad	Amb	Gelad	Amb	Gelad	Amb	Gelad	Amb	Gelad
[ ] MTX ( $\mu\text{g/mL}$ )	267,75 (1,95)	266,60 (2,53)	260,50 (0,78)	263,48 (0,13)	257,74 (0,30)	257,59 (0,48)	238,70 (0,96)	239,96 (0,93)	180,66 (9,04)	179,74 (8,78)
pH	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	3,5	4,0	3,5	3,5
EE (%)	21,73 (0,59)	22,62 (1,35)	-	-	-	-	-	-	29,84 (4,12)	38,30 (0,80)
Viscos. (cSt)	0,98 (0,009)	0,98 (0,009)	-	-	-	-	-	-	0,95 (0,021)	0,95 (0,023)

<b>Estabilidade Nanocápsulas PLA-PEG</b>										
	t zero		t 3 dias		t 7dias		t 21 dias		t 45 dias	
	Amb	Gelad	Amb	Gelad	Amb	Gelad	Amb	Gelad	Amb	Gelad
[ ] MTX ( $\mu\text{g/mL}$ )	263,99 (1,96)	261,05 (2,12)	259,09 (2,29)	258,62 (1,10)	254,19 (1,65)	255,03 (1,34)	215,16 (12,82)	219,46 (12,98)	172,77 (1,72)	173,33 (1,26)
pH	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	3,5	3,5
EE (%)	23,70 (1,80)	21,73 (0,60)	-	-	-	-	-	-	46,32 (4,91)	52,62 (2,70)
Viscos. (cSt)	1,01 (0,005)	1,00 (0,014)	-	-	-	-	-	-	1,00 (0,003)	0,99 (0,017)

Em relação às nanocápsulas de PLA, é possível concluir através de uma análise da variância ( $p < 0,05$ ) que não há diferença significativa nas concentrações totais de metotrexato entre as formulações mantidas sob temperatura ambiente e geladeira, do tempo zero até os 45 dias de armazenamento. As concentrações do fármaco diminuíram gradativamente com o passar do tempo, chegando a uma redução significativa de cerca de 32 %, em ambas as formulações, após os 45 dias do estudo. Da mesma forma, as nanocápsulas de PLA-PEG não

apresentaram diferença significativa entre a temperatura ambiente e geladeira, enquanto que os valores de doseamento sofreram, em ambas as temperaturas, uma redução significativa de cerca de 33 % após 45 dias de armazenamento. Por outro lado, quando comparadas as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG, observa-se que não há diferença estatisticamente significativa entre os polímeros (ANOVA,  $p < 0,05$ ), sendo a redução da concentração total de metotrexato similar durante todo o período, a temperatura ambiente e geladeira, sem a interferência da natureza do polímero.

Informações relevantes sobre a estabilidade dos sistemas nanoestruturados podem ser obtidas mediante monitoramento do pH em função do tempo. As nanocápsulas de PLA, mantidas à temperatura ambiente, sofreram uma diminuição nos valores de pH de 4,0 para 3,5 após 21 dias de armazenamento, enquanto que, para as formulações mantidas na geladeira, a diminuição do pH foi registrada somente no 45º dia. Esta diminuição de pH é atribuída por diversos autores à formação de ácidos graxos livres como consequência de processos oxidativos e hidrolíticos que componentes oleosos, como o Miglyol, sofrem em meio aquoso (WASHINGTON e DAVIS, 1987; HERMAN e GROVES, 1993; CALVO, 1995). A diminuição do pH também pode ser atribuída à ionização ou hidrólise dos grupos carboxílicos terminais presentes no PLA. Os resultados de Lopes e colaboradores (2000) corroboram com essa hipótese, sendo que a diminuição de pH de nanocápsulas de poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila) monitorado durante os primeiros 45 dias após a preparação foi também atribuída à dissociação dos grupos carboxílicos presentes como grupos pendentes do polímero que, em função do tempo, se posicionam na interface partícula/água devido à relaxação das cadeias carboxílicas poliméricas. Por fim, a diminuição do pH nas formulações mantidas na geladeira ocorreu de forma tardia (45 dias) quando comparadas às formulações mantidas à temperatura ambiente (21 dias), provavelmente porque a baixa temperatura proporciona um ambiente mais favorável para a conservação do polímero e do óleo, retardando assim seus processos de oxidação e degradação.

A diminuição do pH das formulações de PLA-PEG ocorreu, em ambas as temperaturas, após os 45 dias de armazenamento. Esse retardo na diminuição do pH, quando comparado às formulações de PLA, pode ser atribuído à presença do PEG, que possui característica hidrofílica, ligando-se as cadeias carboxílicas do PLA, dificultando assim a hidrólise dos grupos carboxílicos (HEALD *et al.*, 2003).



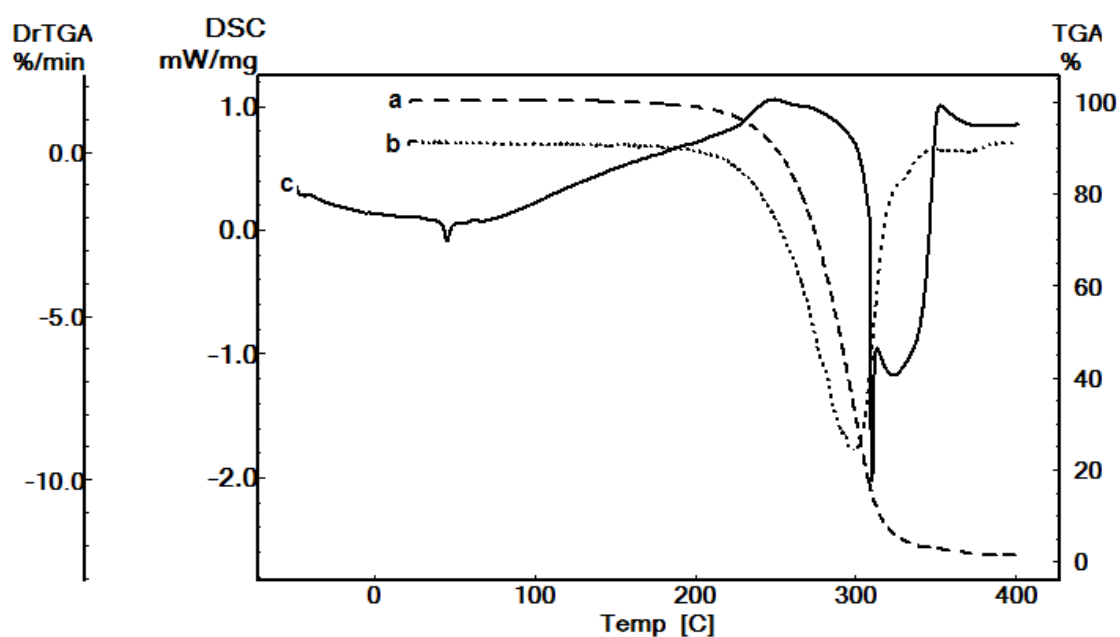
Surpreendentemente, os valores de eficiência de encapsulação de todos os sistemas, em ambas as temperaturas, aumentaram após os 45 dias de armazenamento, sendo este aumento mais pronunciado nas nanocápsulas de PLA-PEG. Isto ocorreu provavelmente devido à presença de agregados nas formulações que durante o processo de ultrafiltração/centrifugação ficam retidos no filtro dificultando a passagem do fármaco e, conseqüentemente, o doseamento das concentrações reais de metotrexato.

Por fim, através de uma análise estatística observou-se que as formulações não apresentam diferença significativa (teste t student,  $p < 0,05$ ) de viscosidade entre as temperaturas analisadas, independente da natureza do polímero empregado. Da mesma forma, a viscosidade não variou significativamente em função do tempo tanto para as formulações de PLA como para as formulações de PLA-PEG (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Sendo assim, é possível concluir que o aumento do tamanho médio das partículas, bem como, os possíveis processos de degradação que ocorreram durante o armazenamento não interferem de forma significativa na viscosidade das formulações.

#### **5.4 Termogravimetria (TG) e Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

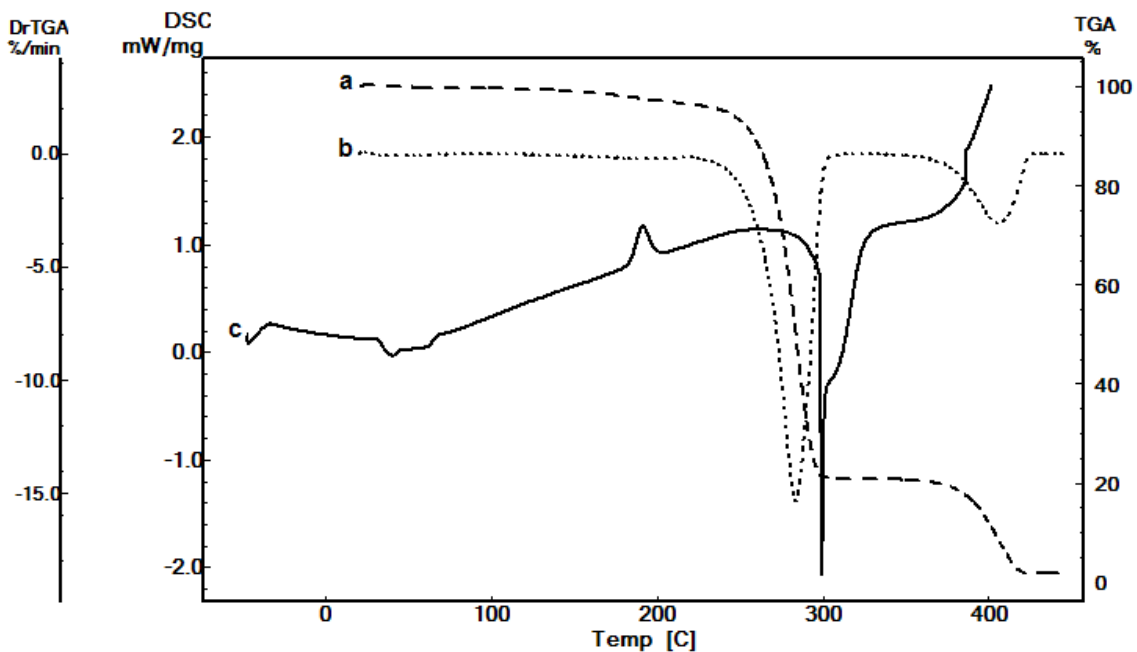
A análise térmica engloba um grupo de técnicas nas quais uma propriedade da amostra é analisada em função do tempo ou temperatura, enquanto ela é aquecida ou resfriada, em uma atmosfera específica, numa proporção fixa de mudança de temperatura ou temperatura constante. A aplicação de métodos térmicos de análise, em especial a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a termogravimetria (TG) tem sido de fundamental importância no estudo de caracterização das matérias-primas e desenvolvimento de produtos farmacêuticos (GIRON, 2002).

Na área de micro e nanoencapsulação, os métodos termoanalíticos vêm sendo amplamente utilizados para a análise dos polímeros, principalmente através da avaliação do grau de cristalinidade, bem como, para verificar a presença de interações entre o fármaco e a matriz polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).



**Figura 9.** Curvas referentes ao polímero PLA (a) TG, (b) DTG e (c) DSC.

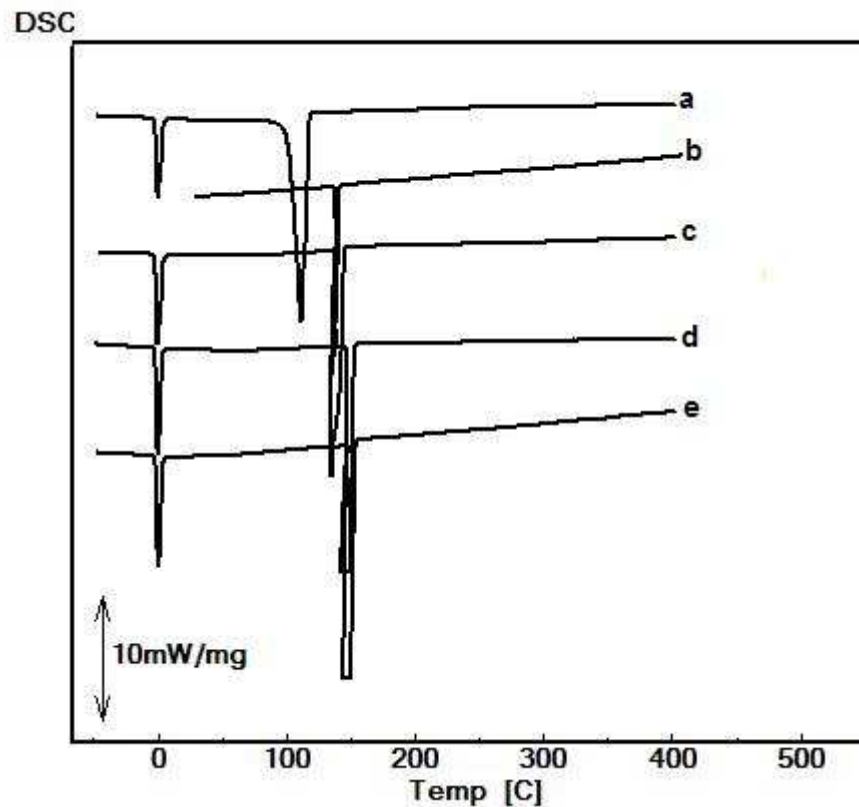
As curvas DSC e TG dos polímeros PLA e PLA-PEG, utilizados na preparação dos sistemas nanoestruturados, encontram-se demonstradas nas figuras 9 e 10, respectivamente. A curva DSC obtida para o PLA (Figura 9) evidenciou a transição vítrea ( $T_g$ ) do polímero na temperatura de 43,36 °C, apresentando-se um pouco abaixo da  $T_g$  de 48 °C descrita na literatura (ROUZES *et al.*, 2003). Além disso, não foi observado evento endotérmico característico de fusão, sugerindo assim que o polímero não apresenta um estado cristalino definido, o que sugere sua natureza amorfa. Na curva termogravimétrica (TG) foi observado na faixa de temperatura entre 200 e 400 °C o processo de decomposição térmica do PLA em um único evento de forma definida, apresentando variação de massa de 97,36 % e DTG pico em 299 °C. A decomposição foi confirmada uma vez que na curva DSC foram evidenciados dois eventos endotérmicos consecutivos na mesma faixa de temperatura que a curva TG.



**Figura 10.** Curvas referentes ao polímero PLA-PEG (a) TG, (b) DTG e (c) DSC.

As curvas termoanalíticas obtidas para o copolímero PLA-PEG estão apresentadas na figura 10. A partir da curva DSC foi observado um deslocamento da transição vítrea, na ordem de 10 °C, para temperatura inferior (33 °C) em relação ao PLA puro. Na faixa de temperatura entre 184 – 198 °C foi observado evento exotérmico ( $T_{\text{pico}} = 191$  °C;  $\Delta H = 39,03$  J/g) característico da temperatura de cristalização ( $T_c$ ). A diminuição na Tg do copolímero e a exoterma referente à cristalização são descritas na literatura, sendo atribuídas ao efeito plastificante do PEG sobre as cadeias do PLA (MARTIN *et al.*, 2001; HU *et al.*, 2003; KULINSKI, *et al.*, 2005; PIORKOWSKA *et al.*, 2006).

A curva termogravimétrica do PLA-PEG apresentou dois eventos consecutivos de decomposição. O primeiro evento ocorreu entre 215 e 310 °C com variação de massa de 75,63 %, já o segundo, ocorreu entre 311°C e 430 °C com variação de massa de 19,13 %. Considerando que as proporções do copolímero são de 75 % de PLA e 25 % de PEG, pode-se sugerir que o primeiro evento com variação de massa de 75,63 % refere-se à decomposição do PLA, e o segundo evento trata-se possivelmente da decomposição do PEG.



**Figura 11.** Curvas DSC referentes as (a) nanocápsulas de PLA com fármaco, (b) metotrexato puro, (c) nanocápsulas de PLA-PEG com fármaco, (d) nanocápsulas de PLA brancas e (e) nanocápsulas de PLA-PEG brancas.

As curvas DSC referentes à solução de metotrexato puro e às nanocápsulas brancas e com fármaco estão representadas na figura 11, e os dados obtidos a partir destas curvas encontram-se sumarizados na tabela 10. A solução de metotrexato caracterizada termicamente apresentou um evento endotérmico na faixa de temperatura entre 137 – 141 °C, característico do processo de fusão do fármaco ( $T_{\text{pico}} = 137,06 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\Delta H_{\text{fusão}} = -773\text{J/g}$ ). Em relação as nanocápsulas brancas, foi possível observar que ocorreu um evento endotérmico a 148 °C tanto nas formulações de PLA como nas de PLA-PEG, demonstrando assim, que a natureza do polímero não influenciou significativamente no perfil termoanalítico das nanocápsulas brancas. Por outro lado, as nanocápsulas contendo metotrexato apresentaram comportamentos distintos, sendo observados eventos endotérmicos nas temperaturas de 112,61 °C na formulação de PLA e 139,79 °C na de PLA-PEG. Portanto, a presença do metotrexato nas nanocápsulas deslocou o evento endotérmico ocorrido em 148 °C nas formulações brancas

para temperaturas mais baixas, sugerindo a presença de interação entre o fármaco e os sistemas. Cabe salientar que, no caso dos sistemas nanoestruturados, a interação entre o fármaco e o sistema é esperada, demonstrando assim que o fármaco encontra-se encapsulado ou ligado de certa forma ao sistema. Por fim, em todas as curvas obtidas a partir das nanocápsulas, observou-se um evento endotérmico em torno de 0 °C, correspondente ao ponto de congelamento da água (USP, 2003), já que as análises foram realizadas com amostras líquidas dos sistemas que possuem grande quantidade de água.

**Tabela 10.** Resultados obtidos a partir das curvas DSC das nanocápsulas de PLA e PLA-PEG brancas, com fármaco.

	Nanocápsulas PLA		Nanocápsulas PLA-PEG	
	T pico ( °C)	$\Delta H$ (J/g)	T pico ( °C)	$\Delta H$ (J/g)
<b>Brancas</b>	0,50	- 326,20	0,76	- 350,52
	148,28	- 891	148,96	- 1040
<b>Com MTX</b>	0,82	- 288,80	0,53	- 323,61
	112,61	- 1840	139,79	- 1080

### 5.5 Determinação do coeficiente de partição o/a do metotrexato

Considerando que os valores de eficiência de encapsulação permaneceram baixos mesmo após a acidificação da fase aquosa, foi realizada a determinação do coeficiente de partição do metotrexato entre o Miglyol 812N/água em diferentes pHs, a fim de avaliar se a partição do fármaco em favor do componente oleoso da preparação é realmente favorecida em pH ácido. As concentrações de metotrexato encontradas no Miglyol e na fase aquosa, bem como o coeficiente de partição do fármaco em diferentes valores de pH são encontrados na tabela 11.

**Tabela 11.** Concentração de metotrexato na fase aquosa e oleosa (mg/mL; Média  $\pm$   $\sigma$ ) e valores de coeficiente de partição Miglyol 812N/água em diferentes valores de pH.

	<b>Concentração de MTX na fase aquosa</b>	<b>Concentração de MTX no Miglyol</b>	<b>Coeficiente partição (Kp)</b>
pH 3,0	1,37 $\pm$ 0,40	0,0016 $\pm$ 0,00003	0,0012
pH 5,0	1,35 $\pm$ 0,001	0,0015 $\pm$ 0,00002	0,0011
pH 7,0	1,35 $\pm$ 0,015	0,0028 $\pm$ 0,00003	0,0021

Como pode ser observado na tabela 11, a acidificação do pH não favoreceu a partição do metotrexato em favor da fase oleosa, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre os valores de Kp encontrados, independente do pH analisado. Em pH 3,0, a concentração de fármaco presente no Miglyol foi cerca de 850 vezes menor que a concentração encontrada na água, chegando a 900 vezes em pH 5,0, demonstrando claramente que a partição do fármaco não é pH dependente.

Desta forma, compreende-se que os valores de eficiência de encapsulação encontrados nas formulações após ajuste da fase aquosa a pH 3,0 não foram significativamente maiores porque a hidrofília do fármaco não é afetada pela variação do pH. Sendo assim, os baixos valores de eficiência de encapsulação, aliados aos resultados que demonstram certa instabilidade das formulações após 45 dias de armazenamento, permitem concluir que a técnica de nanoprecipitação não se mostrou adequada para nanoencapsulação do metotrexato sódico. Por esse motivo, um novo estudo de formulação foi conduzido, utilizando uma técnica mais adequada para a encapsulação de fármacos hidrofílicos. A técnica selecionada foi a evaporação do solvente a partir de uma dupla emulsão (a/o/a), adaptada da metodologia desenvolvida por Blanco e Alonso (1997), sendo esta formulação utilizada nos experimentos que se seguem.

## PARTE II

### 5.6 Preparação das suspensões de nanoesferas de PLA e PLA-PEG contendo metotrexato

A preparação de nanoesferas pelo método de evaporação-emulsificação do solvente pode ser realizada de duas maneiras diferentes, dependendo da natureza do fármaco que será encapsulado, sendo elas, a técnica de emulsão simples (a/o) para fármacos lipofílicos e dupla emulsão (a/o/a) para fármacos hidrofílicos e proteínas (AVGOUSTAKIS, 2004). A técnica da dupla emulsão é amplamente descrita na literatura, sendo considerada por alguns autores a técnica mais adequada para a nanoencapsulação de fármacos hidrofílicos (YANG *et al.*, 2001).

Na técnica de dupla emulsão, o fármaco é dissolvido em um pequeno volume de fase aquosa contendo uma quantidade apropriada de tensoativo e, em seguida, é emulsificado à alta velocidade em uma fase orgânica contendo o polímero. A fase orgânica deve ser composta de um solvente volátil e imiscível em água, sendo o diclorometano e o acetato de etila os mais utilizados. Após a formação da emulsão a/o, um grande volume de fase aquosa é adicionada para a formação da dupla emulsão a/o/a (AVGOUSTAKIS, 2004).

Blanco e Alonso (1997) desenvolveram e caracterizaram nanoesferas de PLGA utilizando a técnica da dupla emulsão, modificando alguns procedimentos originais, a fim de minimizar a quantidade de solvente orgânico utilizado e obter partículas de tamanho reduzido utilizando a sonicação nos dois passos da emulsificação. Considerando os resultados promissores encontrados neste estudo, a técnica desenvolvida por Blanco e Alonso foi devidamente adaptada e utilizada, no presente trabalho, para a preparação das nanoesferas de PLA e PLA-PEG contendo metotrexato.

Com o intuito de manter a composição das nanoesferas semelhante a das nanocápsulas, o estudo de formulação para o desenvolvimento dos sistemas por dupla emulsão foi realizado utilizando os mesmos polímeros e a mesma solução aquosa de metotrexato sódico, nas mesmas quantidades anteriormente utilizadas. Os tensoativos Tween 80 e Span 80 também foram mantidos, porém as quantidades foram aumentadas para facilitar a formação da dupla emulsão.

### **5.7 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e taxa de recuperação de metotrexato nas suspensões de nanoesferas**

A eficiência de encapsulação e a taxa de recuperação de metotrexato das suspensões de nanoesferas foram determinadas conforme previamente descrito no item 4.2.2.2. A técnica de ultracentrifugação/filtração foi utilizada para a determinação da eficiência de encapsulação, enquanto que para a quantificação de metotrexato total, as nanoesferas foram previamente dissolvidas em acetonitrila. O método utilizado para quantificação do metotrexato por CLAE foi previamente validado conforme item 4.2.2.1.

A taxa de recuperação de metotrexato encontrada nas formulações (tabela 12) pode ser considerada excelente, demonstrando que não há perda significativa de metotrexato durante o processo de preparação dos sistemas, nem tampouco saturação do carreador ou precipitação do fármaco. Os valores de coeficiente de variação obtidos foram baixos, demonstrando boa reprodutibilidade dos resultados, diferentemente do observado nas nanocápsulas produzidas através da técnica de nanoprecipitação onde eram encontrados coeficientes de variação maiores que 5 % nas triplicatas analisadas.

Os valores de eficiência de encapsulação obtidos com a técnica da dupla emulsão (tabela 12) foram bastante superiores aos valores obtidos com a técnica da nanoprecipitação, sendo este aumento de cerca de 90 % nas nanoesferas de PLA e 80 % nas de PLA-PEG. Apesar dos valores de eficiência de encapsulação das nanoesferas de PLA terem sido maiores, não houve diferença estatisticamente significativa (teste t de student,  $p < 0,05$ ) entre os polímeros. Os valores discretamente menores de eficiência de encapsulação obtidos nas nanoesferas de PLA-PEG podem ter ocorrido devido a maior hidrofília do copolímero, o que facilita a difusão do fármaco para a fase externa durante a preparação dos sistemas (GOVENDER *et al.*, 2000).



**Tabela 12.** Valores de eficiência de encapsulação e taxa de recuperação de metotrexato nas nanoesferas de PLA e PLA-PEG (n=3) preparadas através da técnica de dupla emulsão.

<b>Formulação</b>	<b>Eficiência de Encapsulação (%, Média <math>\pm</math> <math>\sigma</math>)</b>	<b>Taxa de recuperação (%, Média <math>\pm</math> <math>\sigma</math>)</b>
Nanoesferas PLA	42,33 $\pm$ 1,50	99,30 $\pm$ 0,16
Nanoesferas PLA-PEG	40,48 $\pm$ 1,48	100,45 $\pm$ 0,56

Cascone e colaboradores (2002) produziram nanopartículas de gelatina contendo metotrexato utilizando a técnica de evaporação do solvente a partir de uma emulsão simples a/o e obtiveram valores de eficiência de encapsulação de no máximo 15 %. Considerando que baixas eficiências de encapsulação de substâncias hidrofílicas são amplamente descritas na literatura (GOVENDER *et al.*, 1999; BARICHELLO *et al.*, 1999; LEO *et al.*, 2004), aliadas aos resultados obtidos por Cascone, uma das poucas publicações que visam nanoencapsular o metotrexato sódico, conclui-se que os valores de eficiência encontrados nas nanoesferas de PLA e PLA-PEG preparadas através da técnica de dupla emulsão são satisfatórios e, por isso, foram selecionadas para a continuação deste trabalho.

### **5.8 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das suspensões de nanoesferas:**

O diâmetro médio e o índice de polidispersão das nanoesferas foram avaliados empregando-se a técnica de espectroscopia de correlação fotônica em equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern, Inglaterra). 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 (OSTROWSKY, 1988).

Geralmente, as nanopartículas, mesmo preparadas através de diferentes métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 e 300 nm; no entanto, partículas com diâmetros em

torno de 60 a 70 nm ou mesmo inferiores a 50 nm podem ser obtidas. A composição qualitativa e o método de preparação das nanopartículas são fatores determinantes do diâmetro médio e polidispersão das partículas. A natureza e a concentração do polímero, o fármaco encapsulado, a concentração de tensoativo e a velocidade de difusão do solvente orgânico para a água são alguns dos principais parâmetros que afetam o diâmetro das nanopartículas (LEGRAND *et al.*, 1999; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Os diâmetros médios e os respectivos índices de polidispersão encontrados nas nanoesferas de PLA e PLA-PEG estão demonstrados na tabela 13. A elevada velocidade de agitação em ambas as etapas de emulsificação leva à redução do tamanho das gotículas da fase interna tanto da emulsão primária como da dupla emulsão, o que pode ter contribuído para a obtenção de partículas de tamanho reduzido (BLANCO e ALONSO, 1997; BHAVSAR *et al.*, 2006). O tensoativo utilizado na preparação dos sistemas também exerce uma influência significativa no diâmetro médio das nanoesferas. Giannavola e colaboradores (2003) avaliaram a influência de diferentes tensoativos no tamanho de nanoesferas de PLA e encontraram os menores diâmetros nas formulações preparadas com Tween 80. Desta forma, a utilização do Tween 80 na preparação das nanoesferas também pode ter contribuído para a obtenção de partículas de tamanho reduzido. As nanoesferas de PLA-PEG apresentaram tamanhos significativamente menores que as nanoesferas de PLA. Esta diminuição pode ser atribuída às propriedades anfífilicas do copolímero, que contribuem para a redução da tensão superficial durante a formação das nanopartículas. Estes resultados corroboram com Ameller e colaboradores (2003) que relataram que a presença de cadeias de PEG tende a reduzir levemente o diâmetro das partículas, independente da natureza da cadeia poliéster do copolímero.

As suspensões de nanoesferas de PLA apresentaram valores de índice de polidispersão menores que 0,2, sendo portanto considerada uma formulação monodispersa. Por outro lado, nas suspensões preparadas com PLA-PEG, o índice de polidispersão médio foi de 0,331, um valor que, apesar de evidenciar a polidispersão da amostra, é considerado aceitável para copolímeros contendo PEG. Estes resultados corroboram com Perez e colaboradores (2001) que obtiveram índices de polidispersão que variaram de 0,316 a 0,437 em nanopartículas de PLA-PEG preparadas através da técnica de dupla emulsão.

**Tabela 13.** Valores de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das suspensões de nanoesferas contendo metotrexato (n = 3; Média  $\pm$   $\sigma$ ).

	<b>Diâmetro médio (nm)</b>	<b>Índice de Polidispersão</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
Nanoesferas PLA	258,00 $\pm$ 3,42	0,111 $\pm$ 0,007	- 31,71 $\pm$ 0,54
Nanoesferas PLA-PEG	99,41 $\pm$ 1,89	0,331 $\pm$ 0,042	- 11,08 $\pm$ 0,39

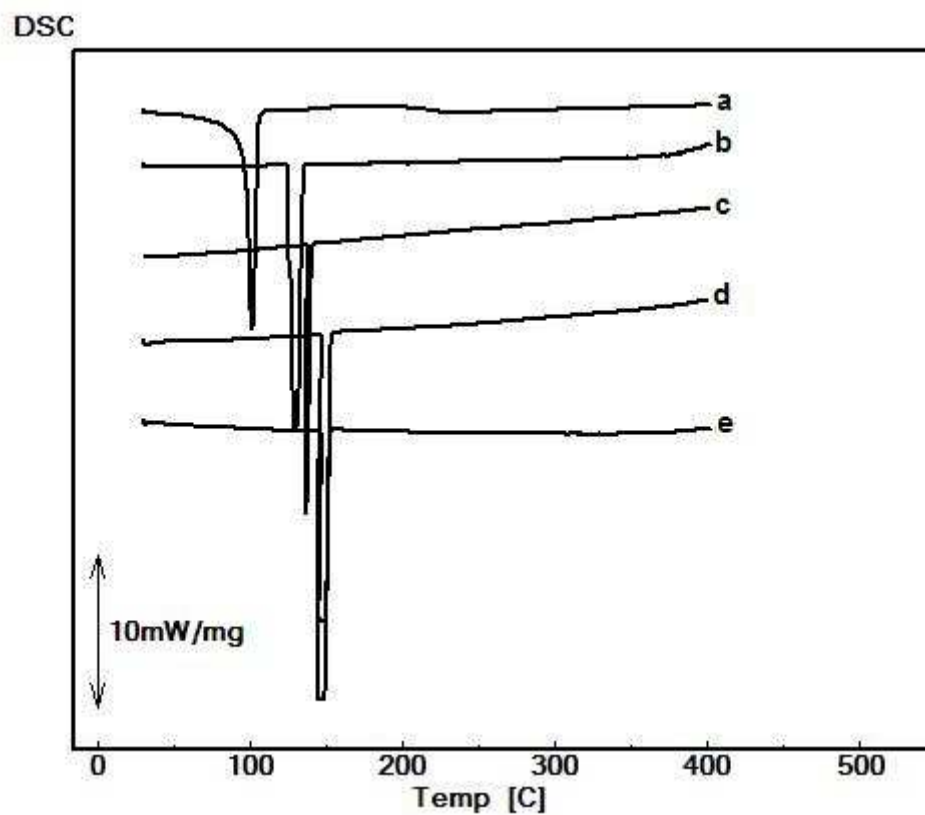
O potencial zeta é a técnica mais comumente utilizada para caracterizar as propriedades de superfície das nanopartículas. As medidas de potencial zeta refletem o potencial elétrico da superfície das nanopartículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão. Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto, em torno de 30 mV, é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de partículas adjacentes (LEGRAND *et al.*, 1999; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MOHANRAJ e CHEN, 2006). Os valores de potencial zeta são obtidos a partir da determinação dos dados de mobilidade eletroforética, mediante a técnica denominada Anemometria Laser Doppler. 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, 2007).

Nanopartículas de PLA, em geral, apresentam elevadas cargas negativas de superfície devido à presença de grupos carboxílicos terminais do polímero localizados na superfície das partículas (DONG e FENG, 2004). O valor médio de potencial zeta relativamente alto das nanoesferas de PLA (- 31,71 mV) apresentado na tabela 13, corrobora com essa hipótese e demonstra que os sistemas apresentam uma boa estabilidade físico-química, uma vez que as forças repulsivas tendem a evitar possíveis agregações das partículas. Em contraste, a presença das cadeias de PEG na superfície das partículas reduziu o potencial zeta de - 31,71 a - 11,08 mV. Esta redução no potencial zeta das nanopartículas pegladas é amplamente

descrita na literatura e ocorre devido ao mascaramento dos grupos carboxílicos terminais do PLA pelas cadeias de PEG (AVGOUSTAKIS, 2004). Valores de potencial zeta muito semelhantes foram encontrados por Giannavola e colaboradores (2003) em nanoesferas de PLA e PLA-PEG contendo aciclovir para administração tópica ocular. Os sistemas apresentaram valores de potencial zeta de -31,1 e -14,7 mV nas formulações de PLA e PLA-PEG respectivamente, estando estes muito próximos dos encontrados no presente estudo.

### 5.9 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de DSC referentes à solução de metotrexato puro e às nanoesferas brancas e com fármaco estão representadas na figura 12, e os dados obtidos a partir destas curvas encontram-se sumarizados na tabela 14.



**Figura 12.** Curvas DSC referentes as (a) nanoesferas de PLA com fármaco, (b) nanoesferas de PLA-PEG com fármaco, (c) metotrexato puro, (d) nanoesferas de PLA brancas e (e) nanoesferas de PLA-PEG brancas.

A solução de metotrexato caracterizada termicamente apresentou um evento endotérmico na faixa de temperatura entre 137 – 141 °C característico do processo de fusão do fármaco ( $T_{\text{pico}} = 137,06 \text{ °C}$ ;  $\Delta H_{\text{fusão}} = -773\text{J/g}$ ). Em relação às nanoesferas brancas, foi possível observar que ocorreu um evento endotérmico em temperaturas muito semelhantes nas formulações de PLA ( $T_{\text{pico}} = 149,11\text{°C}$ ) e PLA-PEG ( $T_{\text{pico}} = 148,12 \text{ °C}$ ). Cabe salientar que conforme apresentado no item 5.4, as nanocápsulas brancas obtidas através do método de nanoprecipitação também apresentaram evento endotérmico em 148 °C, demonstrando assim, que a técnica de preparo dos sistemas, bem como, as diferenças estruturais entre nanocápsulas e nanoesferas, não influenciaram significativamente no perfil termooanalítico das formulações brancas. Por outro lado, nas nanoesferas contendo metotrexato foram observados eventos endotérmicos nas temperaturas de 101,97 °C na formulação de PLA e 130,85 °C na de PLA-PEG. Portanto, a presença do metotrexato nas nanoesferas deslocou o evento endotérmico característico das formulações brancas para temperaturas mais baixas, sugerindo a presença de interação entre o fármaco e os sistemas, demonstrando assim, que o fármaco encontra-se adsorvido ou ligado de certa forma ao sistema.

**Tabela 14.** Resultados obtidos a partir das curvas DSC das nanoesferas de PLA e PLA-PEG brancas, com fármaco.

	Nanoesferas PLA		Nanoesferas PLA-PEG	
	T pico ( °C)	$\Delta H$ (J/g)	T pico ( °C)	$\Delta H$ (J/g)
<b>Brancas</b>	149,11	- 1070	148,12	- 810
<b>Com MTX</b>	101,97	- 1330	130,85	- 1220

### **5.10 Determinação do perfil de liberação do metotrexato a partir das nanoesferas de PLA e PLA-PEG**

A avaliação do perfil 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 de sistemas nanoparticulados poliméricos depende de diferentes fatores: (i) da desorção do fármaco da superfície das partículas, (ii) da difusão do fármaco através da matriz das nanoesferas, (iii) da difusão através da parede polimérica das nanocápsulas, (iv) da erosão da matriz polimérica ou (v) da combinação dos processos de difusão e erosão. Portanto, a solubilidade, difusão e biodegradação dos componentes dos nanosistemas governam o processo de degradação (SOPPIMATH et al., 2001; MOHANRAJ e CHEN, 2006).

Vários métodos podem ser utilizados no estudo de liberação *in vitro* de fármacos, dentre eles, (i) células de difusão com membranas artificiais ou biológicas, (ii) difusão através de membranas de diálise, (iii) técnica de membrana de diálise reversa e (iv) agitação seguida de ultrafiltração/centrifugação (MOHANRAJ e CHEN, 2006). A técnica de difusão através de membrana de diálise consiste na colocação das suspensões de nanopartículas em sacos de diálise mantidos em um meio de liberação sob agitação constante e à temperatura de 37 °C em condições *sink*. 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 metotrexato a partir das nanoesferas. O meio de liberação selecionado para a realização do estudo foi o fluido lacrimal simulado pH 7,4 (VAN HAERINGEN, 1981) a fim de mimetizar o meio em que o fármaco seria liberado quando em contato com a região pré-corneal.

#### **5.10.1 Quantificação do fármaco no meio de liberação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

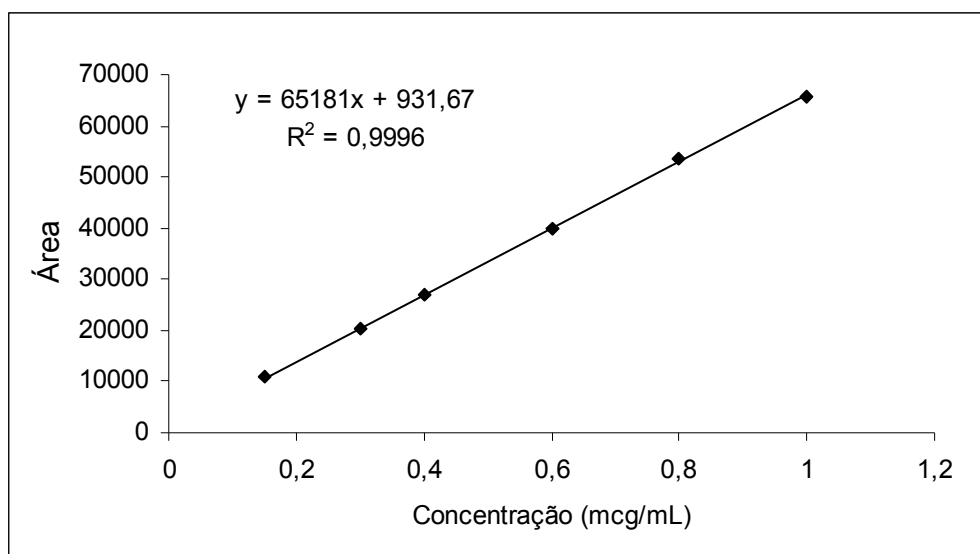
Para a realização do estudo de liberação se faz necessário à escolha de uma metodologia analítica capaz de detectar baixas concentrações do fármaco no meio de liberação. Desta forma, a cromatografia líquida de alta eficiência foi escolhida, sendo que, as condições cromatográficas selecionadas foram adaptadas da metodologia descrita por Gao e

Jiang (2006), os quais desenvolveram o método para quantificar o metotrexato sódico livre e nanoencapsulado no tecido cerebral.

A fim de garantir a confiabilidade dos resultados do estudo de liberação, alguns parâmetros de validação foram analisados, conforme descrito abaixo.

### 5.10.1.1 Linearidade

Dentro da faixa de concentração escolhida (0,15-1,0 µg/mL) o método demonstrou-se linear, nas três curvas construídas, apresentando um coeficiente de correlação médio de 0,9996. A figura 13 representa a equação da reta obtida por regressão linear, bem como a curva de calibração média utilizada na conversão entre as áreas dos picos dos cromatogramas obtidas e a concentração dos analitos.



**Figura 13.** Curva de calibração média do metotrexato obtida por CLAE e sua respectiva equação da reta.

Na tabela 15, estão representados os valores experimentais médios obtidos das áreas absolutas utilizadas para a construção da curva de calibração. A análise do ponto de intersecção e a determinação dos limites de confiança (anexo A) da curva de calibração demonstram a ausência de erro sistemático constante com o emprego da metodologia proposta.

**Tabela 15.** Áreas dos picos médios obtidas após análise das soluções de metotrexato por CLAE (n=3).

<b>Faixa de linearidade (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Área do pico (Média <math>\pm</math> <math>\sigma</math>)</b>	<b>CV %</b>
0,15	10859,25 $\pm$ 552,91	5,10
0,30	20175,00 $\pm$ 140,01	0,69
0,40	26913,25 $\pm$ 369,46	1,37
0,60	40063,75 $\pm$ 102,18	0,26
0,80	53748,75 $\pm$ 416,13	0,77
1,0	65666,75 $\pm$ 587,25	0,89

### 5.10.1.2 Especificidade

Para a avaliação da especificidade do método foram injetadas nanoesferas brancas de PLA e PLA-PEG, a fim de garantir que nenhum dos componentes dos sistemas absorve no mesmo comprimento de onda utilizado para as análises do metotrexato ( $\lambda=313$  nm). O método demonstrou-se específico, sendo que nenhum componente da formulação interferiu na quantificação do fármaco.

### 5.10.1.3 Limite de quantificação

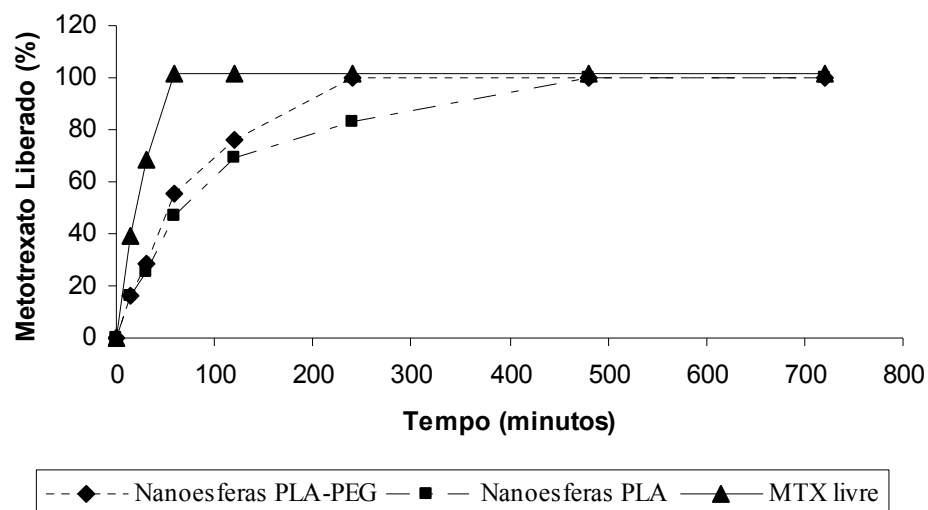
O limite de quantificação, calculado através da fórmula preconizada pelo ICH (2000), foi estabelecido com o objetivo de garantir que a faixa de trabalho escolhida está dentro da faixa de concentração quantificável pelo método. O limite de quantificação calculado foi de 0,066  $\mu\text{g/mL}$ . Portanto, sendo o primeiro ponto da curva de calibração (0,15  $\mu\text{g/mL}$ ) mais que o dobro do limite de quantificação, é possível concluir que as concentrações escolhidas podem ser determinadas com segurança pelo método selecionado.



### 5.10.2 Perfil de liberação do metotrexato a partir das nanoesferas

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 do fármaco no meio de liberação não atua como fator limitante da liberação. Para estudar o perfil 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). No presente estudo, o metotrexato sódico utilizado nos experimentos foi obtido de uma solução injetável de 25 mg/mL e, portanto, pode-se considerar que o fármaco está perfeitamente diluído e que a concentração de fármaco por mL de solução está bem abaixo da concentração de saturação. Considerando ainda que 100  $\mu$ L desta solução estará diluída em 400 mL de meio de liberação, assumiu-se que o estudo seria realizado em perfeitas condições *sink*.

A figura 14 apresenta os perfis de liberação das nanoesferas de PLA e PLA-PEG, bem como de uma solução de metotrexato, utilizada como controle.



**Figura 14.** Perfil de liberação do metotrexato a partir de nanoesferas poliméricas em fluido lacrimal simulado pH 7,4 pelo método de diálise (CLAE).

Os resultados apresentados na figura 14 demonstram que o metotrexato livre difundiu rapidamente para o meio de liberação, sendo que em torno de 70 % de fármaco foi liberado nos primeiros 30 minutos e 100 % de liberação foi atingida em aproximadamente uma hora. A rápida 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.

As formulações de PLA e PLA-PEG não apresentaram diferença estatisticamente significativa (ANOVA,  $p < 0,05$ ) entre seus perfis de liberação. Contudo, as nanoesferas de PLA-PEG apresentaram uma liberação mais rápida, sendo que cerca de 55 % de fármaco foi liberado após uma hora, atingindo aproximadamente 100 % de liberação em 4 horas. As nanoesferas de PLA, por sua vez, apresentaram uma liberação após uma hora de cerca de 45 % de fármaco, semelhante as nanoesferas de PLA-PEG, mas atingiu os 100 % de liberação somente após 8 horas de estudo.

Ambas as formulações apresentaram uma rápida liberação inicial de cerca de 50 % de metotrexato ocorrida na primeira hora, seguido de uma segunda etapa em que a liberação do fármaco ocorre de maneira mais lenta e sustentada. A rápida liberação inicial do fármaco, denominada de efeito *burst*, pode ser atribuída à quantidade de metotrexato adsorvida ou ligada fracamente à superfície das nanoesferas (DONG e FENG, 2004; UBRICH *et al.*, 2004; MOHANRAJ e CHEN, 2006). Outro fator que pode ser relacionado à elevada quantidade inicial de fármaco liberado na primeira hora é a eficiência de encapsulação relativamente baixa de ambos os sistemas estudados, sendo que, as condições *sink* nas quais o estudo foi realizado favorece à rápida difusão de metotrexato livre em solução para o meio de liberação. Em contrapartida, a segunda etapa de liberação do fármaco que ocorre de maneira mais lenta pode ser atribuída à difusão através da membrana polimérica do metotrexato presente no interior das nanoesferas (GIANNAVOLA *et al.*, 2003; AVGOUSTAKIS, 2004).

A liberação total de metotrexato para o meio de liberação ocorreu mais rapidamente nas nanoesferas de PLA-PEG (4 horas) quando comparada às nanoesferas de PLA (8 horas). Este resultado pode estar relacionado à natureza hidrofílica do PEG que facilita a penetração da água na matriz polimérica tornando-a mais porosa, facilitando assim a difusão do fármaco para o meio de liberação (PARK e KIM, 2004). O diâmetro médio das nanopartículas parece também influenciar no perfil 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), Panyam e colaboradores (2003), Liu e colaboradores (2005). De acordo com os resultados obtidos na caracterização físico-química, o diâmetro médio das nanoesferas de PLA-PEG é significativamente menor em comparação as nanoesferas de PLA, na ordem de 99 e 258 nm, respectivamente, o que também pode ter proporcionado uma velocidade de liberação mais rápida de metotrexato das formulações contendo PEG.

### **5.11 Estudo da interação e estabilidade das nanoesferas de PLA e PLA-PEG frente a componentes do muco ocular**

A presença das suspensões coloidais 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). Com base nessas considerações, o presente estudo avaliou o comportamento e a possível interação das suspensões de nanoesferas na presença de mucina e lisozima, principais componentes do muco ocular.

A mucina, que compõe majoritariamente a camada mucosa interna do fluido lacrimal, é uma glicoproteína hidrofílica aniônica capaz de alterar suas propriedades físico-químicas, como viscosidade e grau de hidratação, dependendo da composição do meio. Esta camada mucosa pode ser considerada como uma barreira para a penetração corneal de macromoléculas, que ficarão retidas nesta camada devido a seu tamanho, e de moléculas carregadas, devido à possibilidade de união destas às cargas negativas da mucina (KHANVILKAR *et al.*, 2001).

A lisozima é o elemento protéico mais abundante nas lágrimas, sendo liberada continuamente do saco conjuntival, mantendo-se numa concentração constante no fluido lacrimal. Esta proteína apresenta um caráter catiônico e uma importante atividade enzimática hidrolítica podendo, desta forma, interagir com os sistemas instilados topicamente e, conseqüentemente, alterar a absorção ou inativar uma fração do fármaco instilado, alterando sua biodisponibilidade (VAN HOFF, 1983; IBRAHIM *et al.*, 1988).

**5.11.1 Interação com a mucina**

No intuito de avaliar a interação e a estabilidade das nanoesferas de PLA e PLA-PEG na presença de mucina, foram realizadas medidas de viscosidade de uma dispersão de mucina (0,04 %) antes e após incubação a 37° C com os sistemas. O desenho do estudo foi estabelecido objetivando avaliar possíveis modificações de viscosidade em função do tempo de incubação e da proporção mucina:nanoesferas.

Na tabela 16 estão apresentados os valores de viscosidade cinemática da dispersão de mucina após incubação com as nanoesferas de PLA, nos tempos zero e 120 minutos de incubação. A viscosidade da mucina e das nanoesferas puras também foram determinadas a fim de compreender melhor a variação da viscosidade nas diferentes proporções empregadas. Avaliando individualmente cada proporção mucina:suspensão, observou-se que não ocorreu um aumento estatisticamente significativo (teste *t student*,  $p < 0,05$ ) de viscosidade em função do tempo de incubação em nenhuma das proporções estudadas. Considerando que os valores médios de viscosidade permaneceram inalterados após os 120 minutos, pode-se concluir que não houve interação significativa das nanoesferas de PLA com a mucina. Estes resultados podem ser atribuídos à carga superficial negativa destas partículas, evidenciada pelo potencial zeta das nanoesferas (-31mV), que desfavorece a interação dos sistemas com as cargas negativas presentes na mucina.

**Tabela 16.** Viscosidade cinemática (cSt) da dispersão de mucina (Média ±  $\sigma$ , CV %) após incubação com as nanoesferas de PLA (n = 3).

<b>Nanoesferas PLA</b>					
<b>Tempo (min)</b>	<b>Proporção Mucina:Nanoesferas</b>				
	<b>0:100</b>	<b>10:90</b>	<b>50:50</b>	<b>90:10</b>	<b>100:0</b>
<b>t<sub>0</sub></b>	0,84 ± 0,0020 (0,24)	0,82 ± 0,0006 (0,08)	0,77 ± 0,0002 (0,03)	0,73 ± 0,0011 (0,15)	0,73 ± 0,0006 (0,08)
<b>t<sub>120</sub></b>	0,84 ± 0,0023 (0,27)	0,82 ± 0,0003 (0,04)	0,77 ± 0,0008 (0,11)	0,73 ± 0,0005 (0,07)	0,73 ± 0,0006 (0,08)

A tabela 17, por sua vez, apresenta os valores de viscosidade cinemática da dispersão de mucina após incubação com as nanoesferas de PLA-PEG. Da mesma forma, não foi observada variação estatisticamente significativa de viscosidade em função do tempo de incubação nas diferentes proporções analisadas. Apesar da presença do PEG diminuir o potencial zeta destes sistemas, o valor também é negativo (-11 mV), o que explica a ausência de interação destes com as cargas negativas da mucina.

**Tabela 17.** Viscosidade cinemática (cSt) da dispersão de mucina (Média  $\pm$   $\sigma$ , CV %) após incubação com as nanoesferas de PLA-PEG (n = 3).

Nanoesferas PLA-PEG					
Tempo (min)	Proporção Mucina:Nanoesferas				
	0:100	10:90	50:50	90:10	100:0
$t_0$	0,87 $\pm$ 0,0020 (0,22)	0,86 $\pm$ 0,0002 (0,03)	0,78 $\pm$ 0,0006 (0,08)	0,73 $\pm$ 0,0002 (0,03)	0,73 $\pm$ 0,0005 (0,06)
$t_{120}$	0,87 $\pm$ 0,0005 (0,06)	0,86 $\pm$ 0,0001 (0,01)	0,78 $\pm$ 0,0005 (0,06)	0,73 $\pm$ 0,0002 (0,02)	0,73 $\pm$ 0,0007 (0,09)

Existem poucos artigos descritos na literatura que investigam a estabilidade de suspensões coloidais na presença de mucina do muco ocular. Dentre eles, Campos e colaboradores (2003) avaliaram as possíveis alterações de viscosidade e potencial zeta de nanopartículas de quitosana incubadas com uma suspensão de mucina. Os resultados encontrados pelos autores corroboram com o presente estudo, sendo que não foram observadas modificações significativas de viscosidade da mucina após incubação com os sistemas.

Por outro lado, existem diversas publicações que estudam a interação de nanopartículas com outras mucosas do corpo humano, como no trato gastrointestinal (TOBÍO *et al.*, 2000; YONCHEVA *et al.*, 2005), na mucosa nasal (TOBÍO *et al.*, 1998) e no muco cervical (WILLITS e SALTZMAN, 2001; WILLITS e SALTZMAN, 2004; LAI *et al.*, 2007). Yoncheva e colaboradores (2005) demonstraram que o recobrimento de nanopartículas com

PEG aumentou a interação *in vitro* dos sistemas com a mucina presente na mucosa intestinal de porcos.

No presente estudo, a não alteração da viscosidade da mucina após incubação com as nanoesferas de PLA e PLA-PEG pode ser um indicativo importante da estabilidade dos sistemas, contudo, mais estudos, como tamanho de partícula, potencial zeta e estudos *in vivo* são necessários para avaliar mais profundamente o comportamento dos sistemas frente ao muco ocular.

### 5.11.2 Estabilidade frente a lisozima

#### 5.11.2.1 Tamanho de partícula e caracterização morfológica dos sistemas

Considerando que a lisozima é o elemento protéico mais abundante nas lágrimas, o estudo da interação das nanoesferas com a referida enzima é de fundamental importância na avaliação da estabilidade dos sistemas frente ao muco ocular. Um dos parâmetros utilizados para avaliar a interação da lisozima com os sistemas coloidais é o tamanho de partícula (CALVO *et al.*, 1997; CAMPOS *et al.*, 2003). Na tabela 18 estão apresentados os resultados de diâmetro médio e índice de polidispersão das nanoesferas de PLA e PLA-PEG.

**Tabela 18.** Valores de diâmetro médio (nm) e índice de polidispersão (i.p) das nanopartículas (NP) puras e após incubação com a lisozima (n = 3).

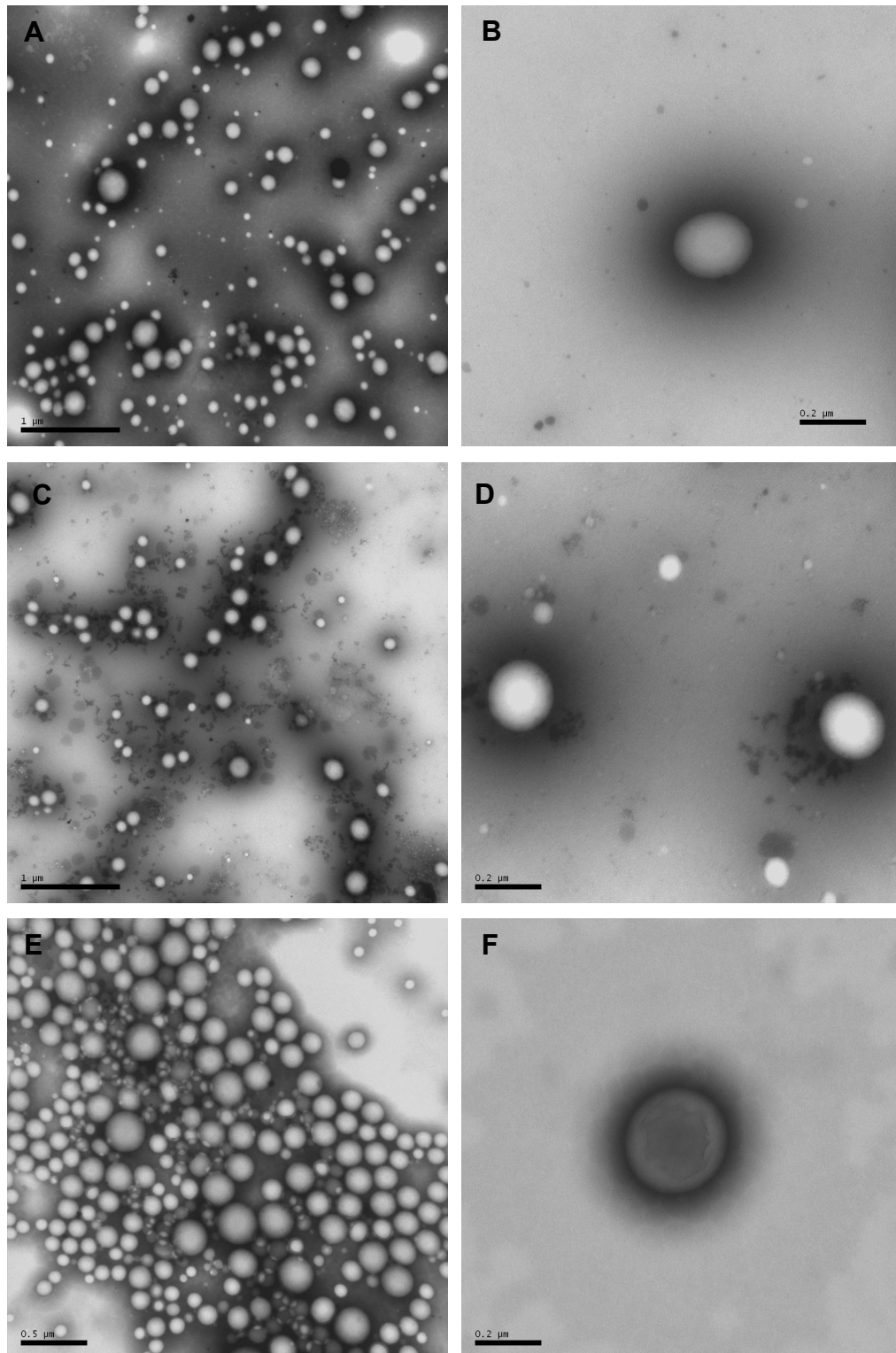
	Diâmetro médio (nm) $\pm \sigma$		
	(i.p)		
	NP pura t = 0	NP + Lisozima t = 0	NP + Lisozima t = 2 horas
Nanoesferas PLA	231,33 $\pm$ 0,58 (0,252)	263,33 $\pm$ 3,05 (0,246)	261,67 $\pm$ 1,53 (0,348)
Nanoesferas PLA-PEG	92,83 $\pm$ 0,23 (0,450)	93,13 $\pm$ 0,57 (0,421)	94,66 $\pm$ 1,53 (0,447)

Os resultados de diâmetro médio da formulação de PLA demonstram que ocorreu um aumento significativo (ANOVA,  $p < 0,05$ ) no tamanho das partículas imediatamente após o contato com a lisozima. Por outro lado, as partículas não sofreram alteração significativa de tamanho em função do tempo de incubação. Este aumento inicial no diâmetro das partículas 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 nanoesferas formadas com PLA, modificando assim o diâmetro médio das partículas (CALVO *et al.*, 1997). Além disso, o índice de polidispersão das nanoesferas de PLA teve um aumento estatisticamente significativo (ANOVA,  $p < 0,05$ ) após duas horas de incubação com a enzima, o que pode indicar uma possível agregação ocorrida em função da interação entre a lisozima e as nanoesferas, indicando certa instabilidade das nanoesferas de PLA na presença da enzima (CALVO *et al.*, 1997).

Por outro lado, a incubação das nanoesferas de PLA-PEG com a enzima, não alterou significativamente (ANOVA,  $p < 0,05$ ) o diâmetro médio das partículas, nem tampouco aumentou significativamente o índice de polidispersão dos sistemas. Estes resultados indicam que a presença do PEG na superfície das partículas é capaz de dificultar a interação com a lisozima, em concordância com os resultados encontrados por Vila e colaboradores (2002). Desta forma, é possível sugerir que as nanoesferas de PLA-PEG poderão apresentar uma maior estabilidade na área pré-corneal.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) tem sido amplamente empregada na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). No estudo de interação com a lisozima, a microscopia de transmissão foi utilizada para avaliar a morfologia das nanoesferas e auxiliar na avaliação de uma possível interação da enzima com os sistemas. No caso das nanoesferas de PLA, conforme demonstrado na figura 15, as partículas apresentaram-se esféricas ou levemente ovaladas. O diâmetro médio em torno de 230 nm, determinado durante o experimento, foi confirmado pela microscopia, porém o aumento estatisticamente significativo do tamanho de partícula ocorrido após duas horas de incubação com a enzima não pôde ser claramente visualizado nas micrografias por se tratar de apenas 30 nm. A figura 15 demonstra que durante todo o período de incubação não ocorreram alterações evidentes na forma esférica das partículas de PLA, nem tampouco a formação de agregados. Por fim, na figura 15 (E) foi possível observar a

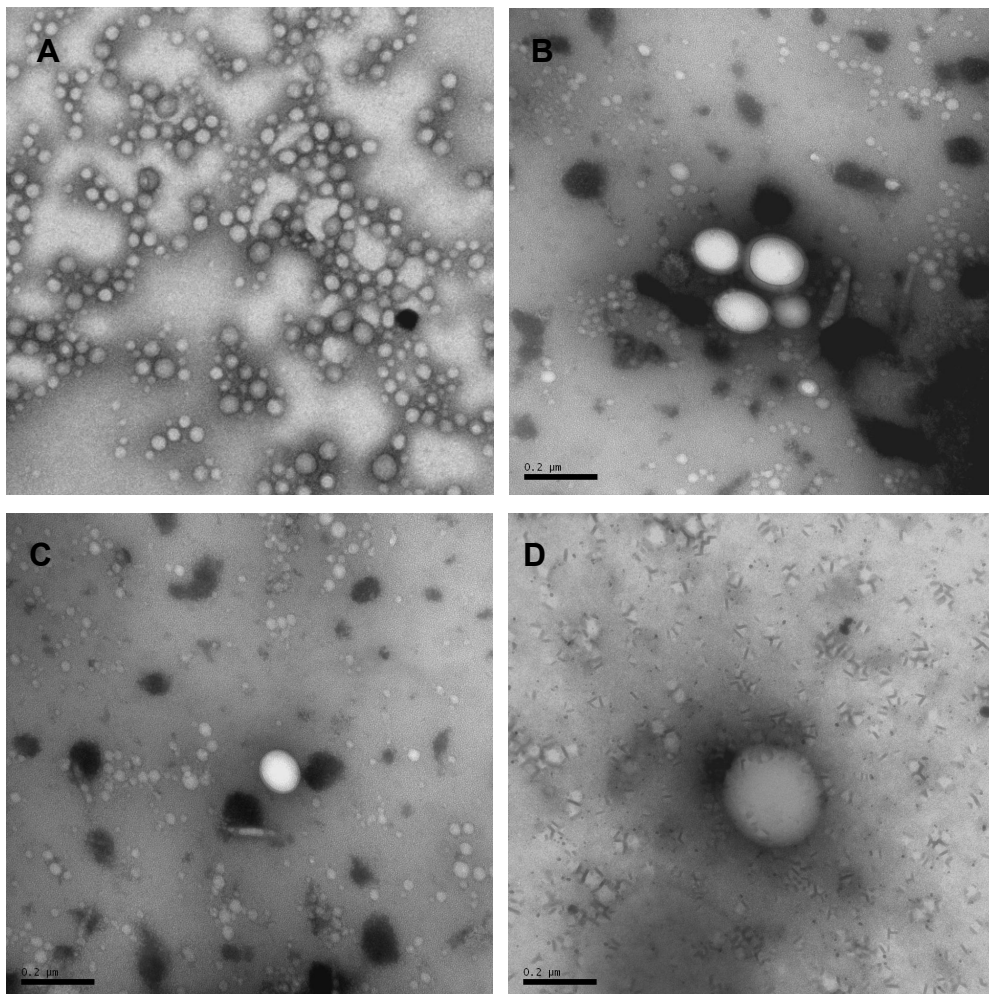
existência de populações de nanoesferas de vários tamanhos, confirmando assim o aumento no índice de polidispersão (tabela 18) ocorrido após incubação dos sistemas com a enzima.



**Figura 15.** Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão das suspensões de nanoesferas de PLA incubadas com uma solução de lisozima nos tempos (A e B) zero, (C e D) duas e (E e F) quatro horas.



As nanoesferas de PLA-PEG, por sua vez, apresentaram forma esférica, porém mais irregulares, com populações de vários tamanhos diferentes mesmo antes da incubação com a lisozima (figura 16), confirmando assim a polidispersão (0,450) encontrado nas nanoesferas puras. Não foram observados agregados em função do tempo de incubação, concordando assim com os resultados de tamanho de partícula e índice de polidispersão que não apresentaram um aumento significativo após incubação com a enzima.



**Figura 16.** Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão das suspensões de nanoesferas de PLA-PEG incubadas com uma solução de lisozima nos tempos (A) zero, (B e C) duas e (D) quatro horas.

### **5.12 Avaliação da viabilidade celular do tecido corneal após a administração *in vivo* das suspensões de nanoesferas**

Para avaliar a integridade da córnea após administração tópica ocular das nanoesferas brancas de PLA e PLA-PEG, foi realizado um estudo *in vivo*, no qual as formulações e controles foram administrados no saco conjuntival de coelhos albinos Nova Zelândia. O possível dano celular causado pelas partículas foi avaliado utilizando iodeto de propídio, com posterior análise em microscópio de epifluorescência.

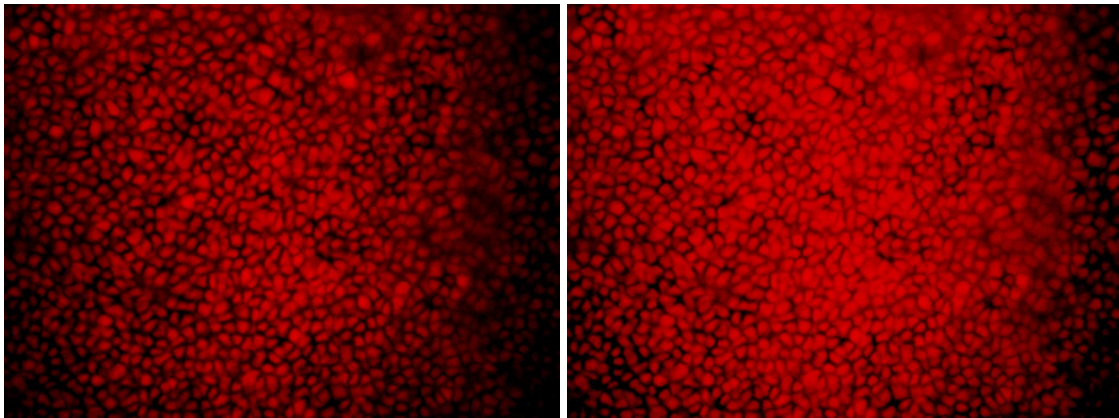
O iodeto de propídio é um marcador fluorescente que se caracteriza por unir-se seletivamente ao DNA celular e por ser incapaz de difundir através da membrana celular; sendo assim, o marcador só penetra nas células que apresentem algum tipo de lesão na membrana celular (YEH *et al.*, 1981). Esta técnica fluorescente tem sido proposta para diferenciar células viáveis de não viáveis, uma vez que as células mortas mostram um núcleo fluorescente de cor vermelha, enquanto as células intactas não apresentam nenhum sinal de fluorescência.

Trabalhos anteriores relatam a utilização de iodeto de propídio em estudos realizados com córneas. Rojanasakul e colaboradores (1990) descrevem a utilização de iodeto de propídio para investigar os possíveis efeitos danosos causados por alguns compostos capazes de aumentar a penetração corneal, como o EDTA, em córneas de coelhos albinos Nova Zelândia. Através da microscopia confocal de fluorescência foi possível observar, após coloração com este marcador, que quase todos os compostos analisados causaram extensos danos à membrana celular das córneas. Da mesma forma, Calvo e colaboradores (1994) investigaram o lise celular provocado por nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona em córneas de coelhos submetidas à incubação com iodeto de propídio, não tendo sido observados danos celulares após administração dos sistemas coloidais.

Os estudos acima citados utilizaram células de difusão para a realização dos experimentos. Porém, estudos *in vitro* com córneas isoladas apresentam o inconveniente de não levar em conta os processos fisiológicos, como a drenagem e renovação dos fluidos (WOOD *et al.*, 1985); além disso, nas células de difusão as córneas permanecem em contato com os sistemas por horas tornando as condições do experimento muito distantes das condições fisiológicas. Por este motivo, visando aproximar esta avaliação ao comportamento

real das partículas coloidais no epitélio corneal após instilação tópica ocular, procedeu-se a realização de um estudo *in vivo* utilizando coelhos Nova Zelândia.

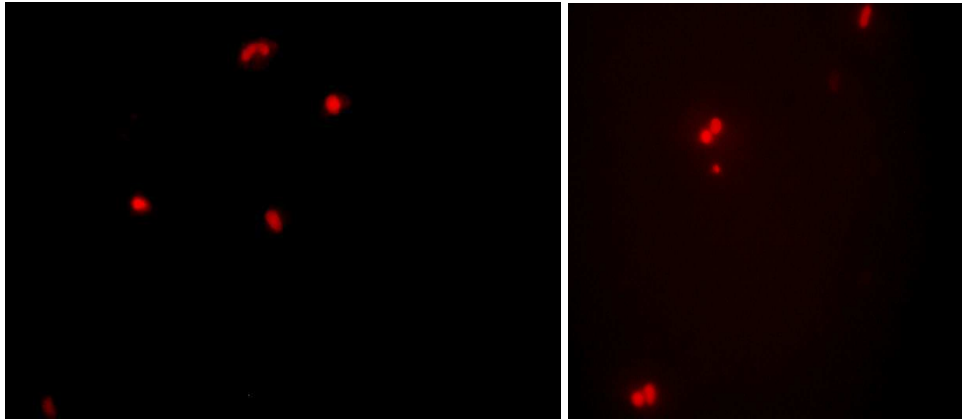
Desta forma, foi inicialmente conduzida uma etapa de otimização das condições do estudo. Com base em dados obtidos na literatura (ROJANASAKUL *et al.*, 1990; CALVO *et al.*, 1994; NANAVATY *et al.*, 2006), foram testadas duas concentrações diferentes de iodeto de propídio (1  $\mu\text{g/mL}$  e 2,5  $\mu\text{g/mL}$ ) e diferentes tempos de exposição das córneas ao corante (15, 30, 60 e 120 minutos). Estes testes foram realizados utilizando córneas de porcos obtidas em um abatedouro da região para evitar, desta forma, a morte desnecessária de coelhos antes do estudo propriamente dito. A figura 17 apresenta as imagens das córneas de porcos coradas com uma solução de iodeto de propídio 1  $\mu\text{g/mL}$  a 37 °C por 15 minutos, sendo estas as condições selecionadas para a continuidade dos experimentos, já que em tempos maiores de exposição as córneas apresentavam um acúmulo de corante, dificultando assim a observação dos núcleos corados. Por se tratar de córneas retiradas de olhos previamente congelados é possível visualizar a coloração de praticamente todos os núcleos celulares do epitélio corneal (figura 17).



**Figura 17.** Imagens de córneas de porco (controle positivo) coradas com uma solução de iodeto de propídio obtidas através de microscopia de fluorescência.

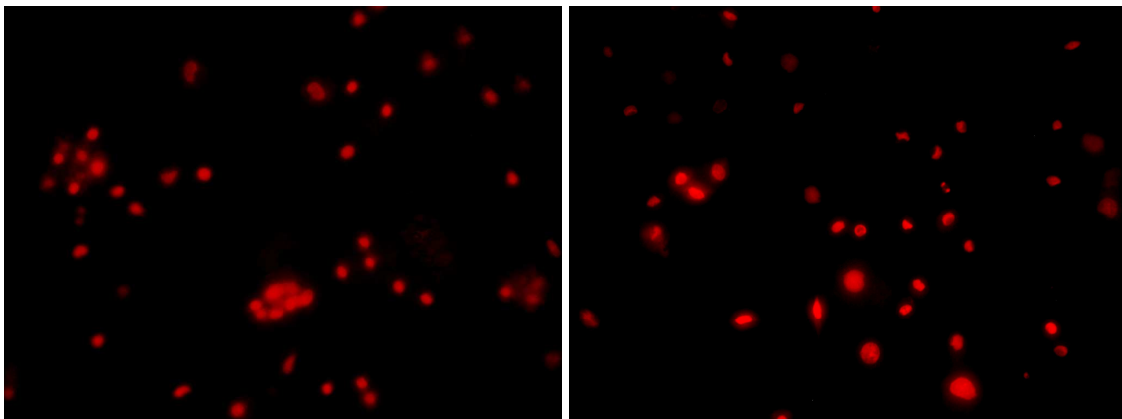
Durante a realização do estudo propriamente dito, conforme protocolo descrito no item 3.7, inicialmente administrou-se soro fisiológico 0,9 % (p/V) no saco conjuntival de ambos os olhos de um coelho (n= 2 córneas) utilizado como controle negativo para garantir, desta forma, que durante os procedimentos de enucleação e coloração das córneas as células do epitélio corneal permaneceriam viáveis até a avaliação microscópica. A figura 18 apresenta as imagens obtidas das córneas tratadas com soro fisiológico. É possível observar que poucos

núcleos celulares estão corados, sendo que, a maioria das células apresentam-se viáveis e sem dano celular. A presença de alguns núcleos corados já era esperada, considerando que o procedimento de retirada da córnea demanda um certo tempo e a morte de algumas células do epitélio corneal poderia ocorrer.



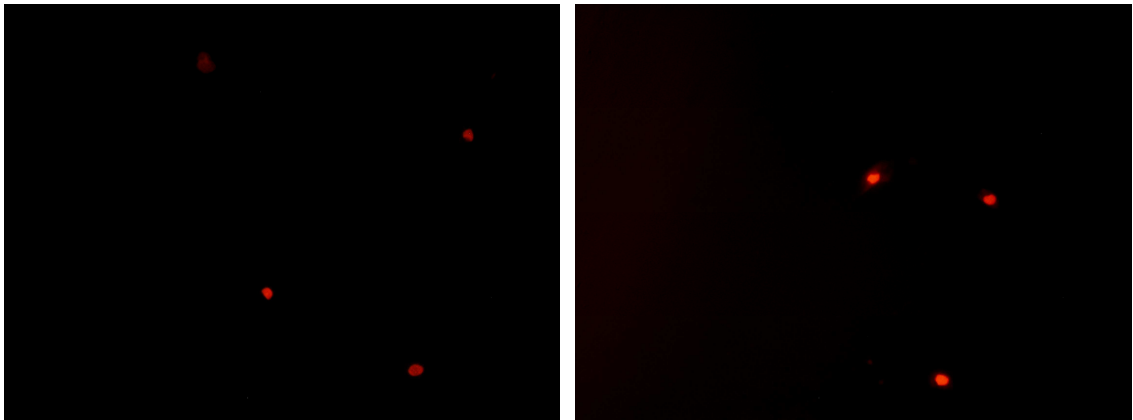
**Figura 18.** Imagens de córneas de coelhos previamente tratadas com soro fisiológico (controle negativo) e coradas com uma solução de iodeto de propídio.

A figura 19, por sua vez, apresenta as imagens obtidas após instilação tópica ocular de uma solução de metotrexato livre, a fim de avaliar se o fármaco é capaz de causar lise celular em contato com o epitélio corneal. As quatro córneas analisadas apresentaram-se semelhantes, tendo sido observado uma quantidade significativamente maior de núcleos corados em comparação ao controle negativo, demonstrando assim que o fármaco livre provoca dano ao epitélio corneal.

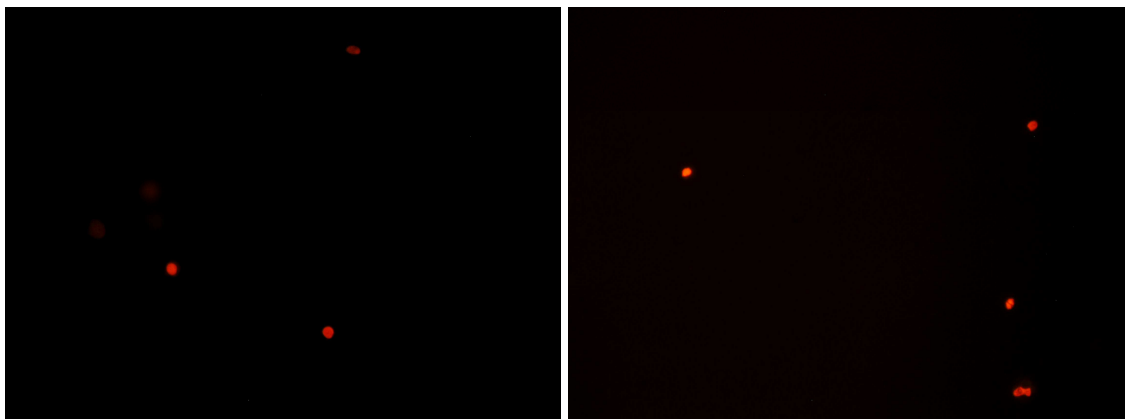


**Figura 19.** Imagens de córneas de coelhos previamente tratadas com uma solução de metotrexato e posteriormente coradas com uma solução de iodeto de propídio.

As nanoesferas brancas de PLA e PLA-PEG administradas apresentaram comportamentos semelhantes conforme apresentado nas figuras 20 e 21, respectivamente. As córneas apresentaram sinais de lise celular muito próximas às córneas tratadas apenas com soro fisiológico. Além disso, pode ser observado um número bastante inferior de células coradas quando as imagens são comparadas àquelas obtidas com as córneas tratadas com o fármaco puro.



**Figura 20.** Imagens de córneas de coelhos previamente tratadas com nanoesferas de PLA-PEG brancas e posteriormente coradas com uma solução de iodeto de propídio.



**Figura 21.** Imagens de córneas de coelhos previamente tratadas com nanoesferas de PLA brancas e posteriormente coradas com uma solução de iodeto de propídio.

De modo geral, é possível concluir com o presente estudo que os componentes dos sistemas coloidais, que envolve, além do fármaco, a presença de polímeros e surfactantes, não induzem a penetração celular do iodeto de propídio, que indicariam dano celular significativo ao epitélio corneal quando instilados topicamente em coelhos albinos Nova Zelândia. Estes

resultados sugerem a viabilidade de utilização destes sistemas como carreadores de fármacos pela via ocular. No entanto, tornam-se necessários novos estudos visando melhorar a eficiência de encapsulação do metotrexato para avaliar então o comportamento dos sistemas contendo o fármaco sobre o epitélio corneal.

## ***6. CONCLUSÕES***

---

- A técnica de nanoprecipitação foi utilizada na obtenção de nanocápsulas de PLA e PLA-PEG contendo metotrexato, sendo a taxa de recuperação do fármaco próxima a 100 % em ambas as formulações.
- Um método de quantificação do metotrexato nas nanocápsulas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi devidamente validado em termos de linearidade, especificidade, precisão, exatidão e limite de quantificação.
- A eficiência de encapsulação do metotrexato em ambas as formulações foi de cerca de 22 %. Na tentativa de aumentar os baixos valores de eficiência de encapsulação, durante a preparação dos sistemas, a fase externa foi acidificada a pH 3,0, sendo que a acidificação não foi capaz de melhorar significativamente a eficiência de encapsulação.
- As curvas DSC dos polímeros PLA e PLA-PEG evidenciaram temperaturas de transição vítrea (T<sub>g</sub>) de 43,36 °C e 33 °C, respectivamente. Na análise termogravimétrica do PLA foi observado um único evento endotérmico na faixa de temperatura entre 200 e 400 °C. No caso do PLA-PEG foram observados dois eventos consecutivos de decomposição, sendo que o primeiro evento ocorreu entre 215 e 310 °C, e o segundo ocorreu entre 311°C e 430 °C.
- Nas curvas de DSC referentes às nanocápsulas brancas e com fármaco, de ambos os polímeros, observou-se um deslocamento da endoterma característica das nanocápsulas brancas para temperaturas mais baixas nas formulações contendo metotrexato, demonstrando assim que ocorreu interação entre o fármaco e o sistema.
- Para o estudo de estabilidade, as nanocápsulas com fármaco foram armazenadas a temperatura ambiente e a 4-8 °C (geladeira) durante 45 dias. Com exceção da viscosidade, todos os parâmetros avaliados, independente da temperatura ou polímero empregados, apresentaram alterações estatisticamente significativas em função do tempo de armazenamento.
- O coeficiente de partição Miglyol 812N/água do metotrexato sódico em diferentes pHs variou de 0,0011 a 0,0021, demonstrando que o fármaco é hidrofílico e que a partição



do fármaco não é pH dependente, explicando assim porque não ocorreu uma melhora na eficiência de encapsulação com a acidificação da fase externa.

- A hidrofília do metotrexato, os baixos valores de eficiência de encapsulação aliados à instabilidade das formulações após 45 dias de armazenamento indicaram que a técnica de nanoprecipitação não foi adequada para a preparação dos sistemas contendo metotrexato sódico.
- Por esse motivo, a técnica de evaporação do solvente a partir de uma dupla emulsão (a/o/a) foi utilizada para o desenvolvimento de nanoesferas de PLA e PLA-PEG. Nestas novas formulações foram mantidos os polímeros, a solução aquosa de metotrexato sódico, bem como os tensoativos hidrofílico e hidrofóbico.
- Os valores de eficiência de encapsulação obtidos através da técnica de dupla emulsão para as nanoesferas de PLA e PLA-PEG foram de 42,33 e 40,48 %, respectivamente. A taxa de recuperação de metotrexato permaneceu próxima de 100 %.
- O diâmetro médio das partículas obtidas foi de 258 e 99 nm para as nanoesferas de PLA e PLA-PEG, respectivamente. A redução do tamanho de partícula observada com a utilização do copolímero foi relacionada à natureza anfifílica do mesmo.
- Os valores de potencial zeta observados foram de -31,71 mV para as suspensões preparadas com PLA e de -11,08 mV para as com PLA-PEG. A redução do potencial zeta das partículas preparadas com o copolímero foi atribuída ao mascaramento dos grupos carboxílicos terminais do PLA pelas cadeias de PEG.
- Da mesma forma que ocorreu nas nanocápsulas, nas curvas de DSC referentes às nanoesferas brancas e com fármaco, de ambos os polímeros, observou-se um deslocamento da endoterma característica das nanoesferas brancas para temperaturas mais baixas nas formulações contendo metotrexato.
- Os resultados obtidos a partir do perfil de liberação do metotrexato demonstraram que 100 % do fármaco contido nas nanoesferas de PLA-PEG foi liberado após 4 horas de ensaio, enquanto que nas nanoesferas de PLA a liberação total do fármaco ocorreu

somente após 8 horas. A liberação mais rápida ocorrida nas formulações de PLA-PEG foi atribuída à natureza hidrofílica do PEG que facilita a penetração da água na matriz polimérica tornando-a mais porosa, facilitando assim a difusão do fármaco para o meio de liberação.

- A viscosidade de uma dispersão de mucina não sofreu alteração significativa após duas horas de incubação com as suspensões de nanoesferas de PLA e PLA-PEG, indicando que não ocorreu interação entre a glicoproteína e os sistemas. Estes resultados podem ser atribuídos ao potencial zeta negativo das nanoesferas que desfavorece a interação com as cargas negativas presentes na mucina.
- O diâmetro médio das suspensões de PLA sofreu um aumento significativo após incubação destas com a lisozima, provavelmente decorrente da interação dos sistemas com a enzima. O diâmetro médio das formulações de PLA-PEG não aumentou significativamente após incubação com a enzima, indicando que a presença do PEG na superfície das partículas é capaz de dificultar a interação com a lisozima.
- Através da microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar que as partículas formadas a partir de ambos os polímeros apresentaram-se esféricas ou levemente ovaladas, sem a presença de agregados após incubação com a lisozima.
- A integridade das córneas de coelhos albinos Nova Zelândia foi avaliada após administração tópica ocular das nanoesferas brancas de PLA e PLA-PEG. As imagens obtidas em microscópio de fluorescência permitiram concluir que os sistemas não provocam lesão significativa ao epitélio corneal, sendo desta forma, viável a administração dos sistemas *in vivo*.

## ***7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

ABRANTES, S. Validação de metodologia na área química. Procedimento prático de validação de métodos analíticos físico-químicos. *V encontro do instituto Adolfo Lutz – Centro de convenções*, São Paulo, 2003.

AMELLER, T.; MARSAUD, V.; LEGRAND, P.; GREF, R.; BARRAT, G.; RENOIR, J. M. Polyester-Poly(Ethylene glicol) nanoparticles loaded with the pure antiestrogen RU 58668: physicochemical and opsonization properties. *Pharmaceutical Research*, v. 20, n. 7, p. 1063-1070, 2003.

AVGOUSTAKIS, K. Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Current Drug Delivery*, v. 1, p. 321-333, 2004.

BARICHELLO, J. M.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 25, p. 471-476, 1999.

BAZILE, D.; PRUD'HOMME, C.; BASSOLET, M. T.; MARLAD, M.; SPENLEHAUER, G.; VEILLARD, M. Stealth. PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 84, p. 493-498, 1995.

BHAVSAR, M. D.; TIWARI, S. B.; AMIJI, M. M. Formulation optimization for nanoparticles-in-micropheres hybrid oral delivery system using factorial design. *Journal of Controlled Release*, v. 110, p. 422-430, 2006.

BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Science*, v. 24, p. 67-75, 2005.

BIRRENBACH, G.; SPEISER, P. P. Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 65, p. 1763-1766, 1976.

BLANCO, M. D.; ALONSO, M. J. Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 43, p. 287-294, 1997.

BOURGES, J. L.; GAUTIER, S. E.; DELIE, F.; BEJJANI, R. A.; JEANNY, J. C.; GURNY, R.; BENEZRA, D.; BEHAR-COHEN, F. F. Ocular drug delivery targeting the retina and retinal pigment epithelium using polylactide nanoparticles. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 44, n. 8, p. 3562-3569, 2003.

BRASIL. Ministério da saúde. Resolução Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA n° 899, de 29 de maio de 2004. Disponível em < <http://www.anvisa.gov.br/>> Acesso em <abril de 2007>.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. 631-651, 2002.

BU, H.; GUKASYAN, H. J.; GOULET, L.; LOU, X.; XIANG, C.; KOUDRIAKOVA, T. Ocular disposition, pharmacokinetics, efficacy and safety of nanoparticle-formulated ophthalmic drugs. *Current Drug Metabolism*, v. 8, p. 91-107, 2007.

CALVO, P.; THOMAS, C.; ALONSO, M. J.; VILA-JATO, J. L.; ROBINSON, J. R. S. Study of the mechanism of interaction of poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules with the cornea by confocal laser scanning microscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 103, p. 283-291, 1994.

CALVO, P.; ALONSO, M. J.; VILA-JATO, J. L.; ROBINSON, J. R. Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug carriers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 48, n. 11, p. 1147-1152, 1996.

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 Farmácia) – Departamento de Farmacologia y Tecnología Farmacéutica, Universidad 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. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 224, p. 159-168, 2001.

CAMPOS, A. M. *Evaluación biofarmacéutica de sistemas coloidales para el transporte de medicamentos por vía ocular*. Santiago de Compostela 2002, f.152. Tese (Doutorado em Farmácia) – Departamento de Farmacologia, Farmácia y Tecnología Farmacéutica, Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.

CAMPOS, A. M.; SÁNCHEZ, A.; GREF, R.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carries with the ocular mucosa. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 20, p. 73-81, 2003.

CASCONE, M. G.; LAZZERI, L.; CARMIGNANI, C.; ZHU, Z. Gelatin nanoparticles produced by a simple w/o emulsion as delivery system for methotrexate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 13, p. 523-526, 2002.

CHANG, J. H.; McCLUSKEY, P. J.; WAKEFIELD, D. Acute Anterior Uveitis and HLA-B27. *Survey of Ophthalmology*, v. 50, p. 364-388, 2005.

CHIAP, B.; MIRALLES, B. A.; CECCATO, P. H.; CROMMEN, J. Automated liquid chromatographic determination of atenolol in plasma using dialysis and trace enrichment on a cation-exchange precolumn for sample handling. *Journal of Chromatography B*, v. 739, p. 205-217, 2000.

CHRAI, S. S.; PATTON, T. F.; MEHTA, A.; ROBINSON, J. R. Lacrimal and instilled fluid dynamics in rabbit eye. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 62, p. 1112-1121, 1973. *CLARKE'S Analysis of Drugs and Poisons*, London: Pharmaceutical Press. Electronic version, 2006.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: A review. *Therapeutic drug carrier systems*, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

DING, S. Recent developments in ophthalmic drug delivery. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, v. 1, n 8, p 328-335, 1998.

DONG, Y.; FENG, S. Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, v. 25, p. 2843-2849, 2004.

DOROSHOW, J. H.; LOCKER, G. Y.; GAASTERLAND, D. E.; HUBBARD, S. P.; YOUNG, R. C.; MYERS, C. E. Ocular irritation from high-dose methotrexate therapy: pharmacokinetics of drug in the tear film. *Cancer*, v. 48, n. 10, p. 2158-62, 1981.

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.

EDWARDS, A.; PRAUSNITZ, M. R. Predicted permeability of the cornea to topical drugs. *Pharmaceutical Research*, v. 18, n. 11, p. 1497-1508, 2001.

ESPINOSA-MANSILLA, A.; MERÁS, I. D.; MADERA, A. Z.; PEDANO, L.; FERREYRA, C. Kinetic fluorimetric determination of antineoplastic methotrexate in human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 29, p. 851-858, 2002.

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 na área de fármaco medicamento) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMORY, N.; BENITA, S. Nanocapsules formation by interfacial deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 55, R1, 1989.

GAO, K.; JIANG, X. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 310, p. 213-219, 2006.

GEROSKI, D. H.; EDELHAUSER, H. F. Drug delivery for posterior segment eye disease. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 41, n. 5, p. 961-964, 2000.

GIANNAVOLA, C.; BUCOLO, C.; MALTESE, A.; PAOLINO, D.; VANDELLI, M. A.; PUGLISI, G.; LEE, V. H. L.; FRESTA, M. Influence of preparation conditions on acyclovir-loaded poly-d,l-lactic acid nanospheres and effect of PEG coating on ocular drug bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v. 20, n. 4, p. 584-590, 2003.

GILL, M. K.; JAMPOL, L. M. Variations in the presentation of primary intraocular lymphoma: case reports and a review. *Survey of Ophthalmology*, v. 45, n. 6, p 463-471, 2001.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 68, p. 335-357, 2002.

GOVENDER, T.; STOLNIK, S.; GARNETT, M. C.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*, v. 57, p. 171-185, 1999.

GOVENDER, T.; RILEY, T.; EHTEZAZI, T.; GARNETT, M. C.; STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 199, p. 95-110, 2000.

GRAF, R.; DOMB, A.; QULLEC, P.; BLUNCK, T.; MULLER, R. H.; VERBAVATZ, J. M.; LANGER, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated esterically stabilized nanospheres. *Advanced Drug Delivery Review*, v. 16, p. 215-223, 1995.

GUM, G. G.; GELLAT, K. N.; OFR, I. R. Physiology of the eye. In: *Veterinary Ophthalmology*. Florida: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 3<sup>a</sup> ed. p. 151-181, 1999.

HARDWIG, P. W.; PULIDO, J. S.; ERIE, J. C.; BARATZ, K. H.; BUETTNER, H. Intraocular methotrexate in ocular diseases other than Primary Central Nervous System Lymphoma. *American Journal of Ophthalmology*, v. 142, n. 5, p. 883-885, 2006.

HEALD, C. R.; STOLNIK, S.; DE MATTEIS, C.; GARNETT, M. C.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S.; LEERMAKERS, F. A. M. Characterisation of poly(lactic acid):poly(ethyleneoxide) (PLA-PEG) nanoparticles using the self-consistent theory modelling approach. *Colloids and Surface A*, v. 212, p. 57-64, 2003.

HERMAN, C. J.; GROVES, M. J. The influence of free fatty acid formation on the pH of phospholipid-stabilized triglyceride emulsions. *Pharmaceutical Research*, v. 10, p. 639-782, 1993.

HORNOF, M.; TOROPAINEN, E.; URTTI, A. Cell culture models of the ocular barriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 60, p. 207-225, 2005.

HU, Y.; ROGUNOVA, M.; TOPOLKARAEV, V.; HILTNER, A.; BAER, E. Aging of poly(lactide)/poly(ethylene glycol) blends. Part 1. Poly(lactide) with low stereoregularity. *Polymers*, v. 44, p. 5701-5710, 2003.

IBRAHIM, H.; BURI, P.; GURNI, R. Composition, structure et paramètres physiologiques du système lacrymal impliqués dans la conception des formes ophtalmiques. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 63, p. 146, 1988.

ICH- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: *Q2(R1)-Validation of Analytical procedures: methodology* 2005.

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

JIRI, G.; JAROSLAV, C.; JIRINA, M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 42, n. 2, p. 139-151, 2003.

KHANVILKAR, K.; DONOVAN, M.; FLANAGAN, D. Drug transfer through mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p. 173-193, 2001.

KOMMAREDDY, S.; TIWAN, S. B.; AMIJI, M. M. Long-circulating polymeric nanovectors for tumor-selective gene delivery. *Technology in Cancer Research & Treatment*, v. 4, p. 615-625, 2005.

KOZAK, Y.; ANDRIEUX, K.; VILLARROYA, H.; KLEIN, C.; GOLDENBERG, B. T.; NAUD, M. C.; GARCIA, E.; COUVREUR, P. Intraocular injection of tamoxifen-loaded nanoparticles: a new treatment of experimental autoimmune uveoretinitis. *Investigative European Journal of Immunology*, v. 34, n. 12, p. 3702-3712, 2004.

KULINSKI, Z.; PIORKOWSKA, E. Crystallization, structure and properties of plasticized poly(L-lactide). *Polymers*, v. 46, p. 10290-10300, 2005.

KUMAR, A. B. M.; RAO, K. P. Preparation and characterization of pH-sensitive proteinoid microspheres for oral delivery of methotrexate. *Biomaterials*, v. 19, p. 725-732, 1998.

LANGER, R. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. *Accounts of Chemical Research*, v. 33, p. 94-101, 2000.

LAI, S. K.; O'HANLON, E.; HARROLD, S.; MAN, S. T.; WANG, Y.; CONE, R.; HANES, J. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 5, p. 1482-1487, 2007.

LE BOURLAIS, C.; ACAR, L.; ZIA, H.; SADO, P. A.; NEEDHAM, T.; LEVERGE, R. Ophthalmic drug delivery systems-recent advances. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 17, n. 1, p. 33-58, 1998.

LEDERER, Jr., C. M.; HAROLD, R. E. Drop size of commercial glaucoma medications. *American Journal of Ophthalmology*, v. 101, p. 691-694, 1986.

LEE, V. H. L.; ROBINSON, J. R. Topical ocular drug delivery: recent developments and future challenges. *Journal of Ocular Pharmacology*, v. 2, p. 67-108, 1986.

LEE, Y. H.; KOMPELLA, U. B.; LEE, V. H. L. Systemic absorption pathways of topically applied beta adrenergic antagonists in the pigmented rabbit. *Experimental Eye Research*, v. 57, p. 341-349, 1993.

LEGRAND, P.; BARRAT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. A review. *S.T.P. Pharma Sciences*, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LEO, E.; BRINA, B.; FORNI, F.; VANDELLI, A. M. In vitro evaluation of PLA nanoparticles containing a lipophilic drug in water-soluble or insoluble form. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 278, p. 133-141, 2004.



- LI, Y.; PEI, Y.; ZHOU, Z.; ZHANG, X.; GU, Z.; DING, J.; ZHOU, J.; GAO, X.; ZHU, J. Stealth polycyanocrylate nanoparticles as tumor necrosis factor- $\alpha$  carriers: pharmacokinetics and anti-tumor effects. *Biopharmaceutical Bulletin*, v. 24, n. 6, p. 662-665, 2001.
- LIU, M.; DONG, J.; YANG, Y.; YANG, X.; XU, H. Characterization and release of triptolide-loaded poly (D,L-lactic acid) nanoparticles. *European Polymer Journal*, v. 41, p. 375-382, 2005.
- LOPES, E. C.; POHLMANN, A. R.; BASSANI, V.; GUTERRES, S. S. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. *Pharmazie*, v. 55, p. 527-530, 2000.
- LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 1595-1639, 2005.
- MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization : a comprehensive physicochemical approach. *S.T.P Pharma Science*, v. 1, p. 221-241, 1991.
- MALVERN INSTRUMENTS. Disponível em:  
<http://www.malvern.co.uk/LabEng/products/IWTM/iwtm.htm>. Acesso: Abril, 2007.
- MAYORGA, P.; PUISIEUX, F.; COLLARRAZE, G. Formulation study of a transdermal delivery system of primaquine. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 132, p. 71-79, 1996.
- MARCHAL-HAUSSLER, L.; MAINCENT, P.; HOFFMAN, M.; SPITTLER, J.; COUVREUR, P. Antiglaucomatous activity of betaxolol chlorhydrate sorbed onto different isobutylcyanoacrylate nanoparticles preparations. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 58, p. 115, 1990.
- MARCHAL-HAUSSLER, L.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Colloidal drug delivery systems for the eye. A comparison of the efficacy of three different polymers: polyisobutylcyanoacrylate, polylactic-co-glycolic acid, poly-epsilon-caprolactone. *S.T.P Pharma Science*, v. 2, p. 98-104, 1992.
- MARTIN, O.; AVÉROUS, L. Poly(lactic acid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems. *Polymers*, v. 42, p. 6209-6219, 2001.
- MAURICE, D. M.; MISHIMA, S. *Handbook of experimental pharmacology*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, v. 69, p. 16-119, 1984.
- MERKLI, A.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; HELLER, J. Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. *Progress Polymers Sciences*, v. 23, p. 563-580, 1998.
- MODI, S.; JAIN, J. P.; DOMB, A. J.; KUMAR, N. Copolymers of pharmaceutical grade lactic acid and sebacic acid: Drug release behavior and biocompatibility. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 64, p. 277-286, 2006.
- MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R.; CHACON, M.; BERGES, L.; GUZMAN, M. Stability of cyclosporine-loaded poly-sigma-caprolactone nanoparticles. *Journal of Microencapsulation*, v. 14, p. 777-787, 1997.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRAT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Journal of Pharmaceutics Science*, v. 89, p. 614-626, 2000.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O.; GREF, R.; LABARRE, D.; BARRAT, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials*, v. 22, p. 2967-2979, 2001.

NANAVATY, M. A.; JOHAR, K.; SIVASANKARAN, M. A.; VASAVADA, A. R.; PRAVEEN, M. R.; ZETTERSTROM, C. Effect of trypan blue staining on the density and viability of lens epithelial cells in white cataract. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, v. 32, 1483-1488, 2006.

NELSON, W. L.; FRAUNFELDER, F. T.; SILLS, J. M.; ARROWSMITH, J. B.; KURITSKY, J. N. Adverse respiratory and cardiovascular events attributed to timolol ophthalmic solution. *American Journal of Ophthalmology*, v. 102, p. 606-611, 1986.

OSTROWSKY, N. Particle characterization by photon correlation spectroscopy. *Particle size analysis*. John Wiley & sons Ltda. New York, 1988.

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. *Journal of Controlled Release*, v. 92, p. 173-187, 2003.

PARK, S.; KIM, S. Preparation and characterization of biodegradable poly(l-lactide)/poly(ethylene glycol) microcapsules containing erythromycin by emulsion solvent evaporation technique. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 271, p. 336-341, 2004.

PERACCHIA, M. T.; HARNISCH, S.; PINTO-ALPHANDARY, H.; GULIK, A.; DEDIEU, J. C.; DESMAELLE, D.; d'ANGELO, J.; MULLER, R. H.; COUVREUR, P. Visualization of *in vitro* protein-rejecting properties of PEGylated stealth polycyanocrylate nanoparticles. *Biomaterials*, v. 20, p. 1269-1275, 1999.

PIORKOWSKA, E.; KULINSKI, Z.; GALESKI, A.; MASIREK, R. Plasticization of semicrystalline poly(L-lactide) with poly(propylene glycol). *Polymers*, v. 47, p. 7178-7188, 2006.

PRAS, E.; NEUMANN, R.; ZANDMAN-GODDARD, G.; LEVY, Y.; ASSIA, E. I.; SHOENFELD, Y.; LANGEVITZ, P. Intraocular inflammation in autoimmune diseases. *Seminars in arthritis and reumathism*, v. 34, p. 602-609.

- PRASAD, R.; KOUL, V.; ANAND, S.; KHAR, R. K. Effect of DC/mDC iontophoresis and terpenes on transdermal permeation of methotrexate: In vitro study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 333, n. 1-2, p. 70-78, 2007.
- PRISTA, N. L.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. *Tecnologia Farmacêutica*. 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.
- RITTENHOUSE, K. D.; POLLACK, G. M. Microdialysis and drug delivery to the eye. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 45, p. 229-241, 2000.
- ROJANASAKUL, Y.; LIAW, J.; ROBINSON, J. R. Mechanisms of action of some penetration enhancers in the cornea: Laser scanning confocal microscopic and electrophysiology studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 66, p. 131-142, 1990.
- ROUZES, C.; LEONARD, M.; DURAND, A.; DELLACHERIE, E. Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 32, p. 125-135, 2003.
- RUBINO, F. M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *Journal of Chromatography B*, v. 764, p. 217-254, 2001.
- SAKAI, T.; KOHNO, H.; ISHIHARA, T.; HIGAKI, M.; SAITO, S.; MATSUSHIMA, M.; MIZUSHIMA, Y.; KITAHARA, K. Treatment of experimental autoimmune uveoretinitis with poly(lactic acid) nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate *Experimental Eye Research*, v. 82, p. 657-663, 2006.
- SAMSON, C. M.; WAHEED, N.; BALTAZIS, S.; FOSTER, C. S. Methotrexate therapy for chronic noninfectious uveitis. *Ophthalmology*, v. 108, p. 1134-1139, 2001.
- SCHAFFAZICK, R. S.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, R. A. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SMITH, J. R.; ROSENBAUM, J. T.; WILSON, D. J.; DOOLITTLE, N. D.; SIEGAL, T.; NEWELT, E. A.; PE'ER, J. Role of intravitreal methotrexate in the management of primary central nervous system lymphoma with ocular involvement. *Ophthalmology*, v. 109, n. 9, p. 1709-16, 2002.
- SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARINI, A. R.; RUDZINSKI, M. C. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, v. 70, p. 1-20, 2001.
- TOBÍO, M.; GREF, R.; SÁNCHEZ, A.; LANGER, R.; ALONSO, M. J. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. *Pharmaceutical Research*, v. 15, p. 270-275, 1998.
- TOBÍO, M.; SÁNCHEZ, A.; VILA, A.; SORIANO, I.; EVORA, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.

18, n. 3-4, p. 315-323, 2000.

TROTTA, M.; PEIRA, E.; CARLOTTI, M. E.; GALLARATE, M. Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 270, p. 119-125, 2004.

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

UEDA, M.; KREUTER, J. Optimization of the preparation of loperamide-loaded poly(L-lactide) nanoparticles by high-pressure emulsification-solvent evaporation. *Journal of Microencapsulation*, v. 14, p. 593-605, 1997.

URTTI, A.; SALMINEN, L.; MIINALAINEN. Systemic absorption of ocular pilocarpine is modified by polymer matrices. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 23, p. 147-161, 1985.

URTTI, A.; SALMINEN, L. Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs. *Survey of Ophthalmology*, v. 37, p. 435-457, 1993.

URTTI, A.; ROUHIAINEN, H.; KAILA, T.; SAANO, V. Controlled ocular timolol delivery: systemic absorption and intraocular pressure effects in humans. *Pharmaceutical Research*, v. 11, p. 1278-1282, 1994.

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

USP26. *United States Pharmacopeia & National Formulary*. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003.

VAN HAERINGEN, N. J. Clinical biochemistry of tears. *Survey of Ophthalmology*, v. 26, p. 84-96, 1981.

VAN HOFF. *Methods of enzymatic analysis*. Florida: Ed. H.V. Bermeyer, v. 3, p. 38, 1983.

VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A. Preparation factors affecting the properties of polylactide nanoparticles: a factorial design study, *Pharmazie*, v. 56, p. 484-488, 2001.

VANDOOREN-GREEBE, R. J.; KUIJPERS, A. L. A.; MULDER, J.; DE BOO, T.; VAN DER KERHOF, P. C. M. Methotrexate revisited: effects of long term treatment in psoriasis. *British Journal of Dermatology*, v. 130, p. 204-210, 1994.

VAUGHAN, D. G.; ASBURY, T.; RIORDAN-EVA, P. *Oftalmologia Geral*. São Paulo: Ed. Atheneu, 4<sup>a</sup> edição, p. 1-434, 1998.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; TOBÍO, M.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Design of biodegradable particles for protein delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 78, p. 15-24, 2002.

- WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. *International Journal of Pharmaceutics* v. 58, p. 1-12, 1990.
- WASHINGTON, C.; DAVIS, S. S. Ageing effects in parenteral fat emulsions: the role of fatty acids. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 39, p. 33-37, 1987.
- WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: An overview of techniques and applications. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System*, v. 7, n. 3, p. 235-259, 1990.
- WEISS, A. H.; WALLACE, C. A.; SHERRY, D. D. Methotrexate for resistant chronic uveitis in children with juvenile rheumatoid arthritis. *The journal of pediatrics*, v. 133, p. 266-268, 1998.
- WILHELMUS, K. R. The Draize eye test. *Survey of ophthalmology*, v. 45, n. 6, p. 493-515, 2001.
- WILLITS, R. K.; SALTZMAN, W. M. Synthetic polymers alter the structure of cervical mucus. *Biomaterials*, v. 22, p. 445-452, 2001.
- WILLITS, R. K.; SALTZMAN, W. M. The effect of synthetic polymers on the migration of monocytes through human cervical mucus. *Biomaterials*, v. 25, p. 4563-4571, 2004.
- WOOD, R. W.; LI, V. H. L.; KREUTER, J.; ROBINSON, J. R. Ocular disposition of polyhexyl-2-cyano(3-14C)acrylate nanoparticles in the albino rabbit. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 23, p. 175, 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.
- YEH, C. G.; HSI, B.; FAULK, W. P. Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence: II. use with cellular identification and viability studies. *Journal of Immunological Methods* v. 43, p. 269-275, 1981.
- YONCHEVA, K.; LIZARRAGA, E.; IRACHE, J. M. Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 24, p. 411-419, 2005.
- ZAKI, J.; FITZGERALD, P.; HARDY, J. G.; WILSON, C. G. A comparison of the effect of viscosity on the precorneal residence of solutions in rabbit and man. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 38, p. 463-466, 1986.
- ZAMBAUX, M. F.; BONNEAUX, F.; GREF, R.; DELLACHERIE, E.; VIGNERON, C. Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 5, n. 60, p. 179-188, 1999.
- ZIMMER, A.; KREUTER, J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. *Advanced Drug Delivery*, 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 MTX por CLAE.

**Tabela 19.** Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração do MTX por Cromatografia líquida de alta eficiência.

<b>Parâmetros de regressão</b>	<b>Valores</b>
Intercepto (intervalo de confiança)	931,67 (-122,03 a 1985,37)
Inclinação (intervalo de confiança)	65181 (63468,39 a 66892,68)
$R^2$	0,9996

**ANEXO B – Aprovação do uso de animais pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).**

**Resultado de Solicitação de Protocolo**

**Protocolo**

PP00076

**Título**

Nanocápsulas elaboradas a partir de poli-ácido láctico (PLA) e poli-ácido láctico-co-poli-etilenoglicol (PLA-PEG) contendo o agente antitumoral metotrexato destinadas ao tratamento tópico do linfoma intraocular primário: estabilidade física, toxicidade celular e capacidade de transporte in vivo aos tecidos intraoculares

**Data de Entrada**

10/10/2006

**Resultado:**

Aprovado

**Data/Prazo**

Aprovado na Reunião de 14/02/2007.

**Considerações**

Ofício nº04/02/CEUA/PRPe

Da: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA.

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Ângela Machado de Campos  
Departamento de Ciências Farmacêuticas - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao Protocolo de Pesquisa sob sua responsabilidade, cadastrado sob o número PP00076/CEUA e intitulado: Nanocápsulas elaboradas a partir de poli-ácido láctico (PLA) e poli-ácido láctico-co-poli-etilenoglicol (PLA-PEG) contendo o agente antitumoral metotrexato destinadas ao tratamento tópico do linfoma intraocular primário: estabilidade física, toxicidade celular e capacidade de transporte in vivo aos tecidos intraoculares, a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO por 1 (hum) ano, a contar desta data, por unanimidade, envolvendo o uso de 50 coelhos albinos da raça Nova Zelândia, durante o período.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

OBS.: O "Certificado de Credenciamento" será enviado por malote, oportunamente.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)  
Data 26/05/2008.**

Data 26/02/2007



**Prof. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva**  
**Presidente das CEUA/PRPe/UFSC**



ANEXO C – Artigo científico submetido à Journal of Chromatographic sciences em 17/05/2007.

**Development and validation of a fast RP- HPLC method for determination of methotrexate entrapment efficiency in polymeric nanocapsules**

Tatiane Sartori<sup>✉</sup>, Fabio Seigi Murakami, Ariane Pinheiro Cruz, Angela Machado de Campos

Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina.

Campus Universitário Trindade, bloco K, 1º andar, Florianópolis, SC 88040-900.

<sup>✉</sup> Author correspondence: tatisartori@gmail.com

**Abstract**

A rapid and effective isocratic chromatographic procedure was successfully developed to determine methotrexate (MTX) entrapment efficiency (EE) in polymeric nanocapsules using reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). The method employed a RP-C<sub>18</sub> column with mobile phase constituted by a mixture of water:acetonitrile:tetrahydrofuran (65:30:5 v/v; pH 3.0) at a flow rate of 0.8 mL min<sup>-1</sup>. The eluate was monitored with an ultraviolet detector set at 313 nm. The parameters used in the validation process were: linearity, specificity, precision, accuracy and limit of quantitation (LOQ). The linearity was evaluated by a calibration curve in the concentration range of 10-50 µg mL<sup>-1</sup> and presented a correlation coefficient of 0.9998. The nanocapsule compounds did not interfere with analysis and the recovery was quantitative. The intra and inter-day assay relative standard deviation were less than 0.72 %. Results were satisfactory and the method proved to be adequate for direct analysis of methotrexate in commercially available products and formulations of nanocapsules.

**Keywords**

Liquid chromatography, validation, nanocapsules, methotrexate

## 1. Introduction

Methotrexate (MTX, Figure 1), chemically known as 4-Amino-10-methylfolic acid or 4-Amino-4-deoxy-10-methylpteroyl-L-glutamic acid, is an antineoplastic which acts as an inhibitor of dihydrofolate reductase (DHFR), an essential enzyme in the biosynthesis of thymidylate, required for DNA replication (1). It is routinely used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia, psoriasis, choriocarcinoma and related trophoblastic tumours (2).

Conventional chemotherapy using MTX shows low specificity and selectivity of action. It is administered in relatively high doses, which often leads to drug resistance and causes nonspecific toxicities in normal proliferating cells, limiting the permissible dose of the drug (3-7).

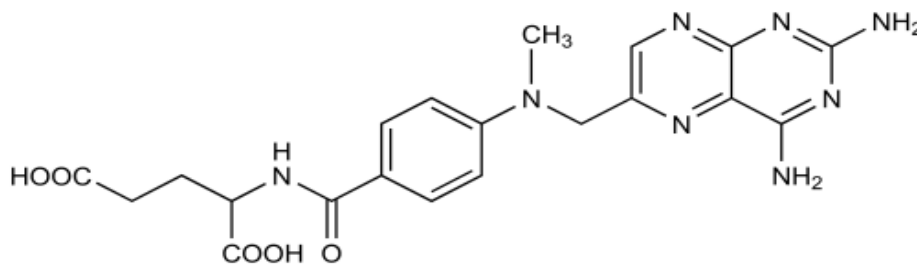


Fig.1. Chemical structure of methotrexate.

In the last few years, new strategies have been developed in order to decrease the toxicity of active molecules by driving them to the target site. In this context, the use of polymeric nanoparticles can be a useful approach to concentrate the loaded drug on the focus of the disease and reducing both the given dose and the side of effects (8).

Biocompatible and biodegradable polymers such as Poly(DL-lactic acid) (PLA) and poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) copolymer (PLGA) are clinically available as medical devices and drug carriers because of their biodegradability and biocompatibility (9-10). Much attention has been paid to the Poly(DL-lactic acid)- poly(ethylene glycol) block copolymer (PLA-PEG), which is a diblock copolymer with hydrophilic and hydrophobic blocks, because it allows the formation of a stable nanoparticulate suspension in an aqueous solvent, where PLA chains form the core and PEG chains are located outside (11-12). The PEG shell prevents the interaction of PLA core with biomolecules, cells and tissues (13-14).

The drug entrapment efficiency (EE) is a great significance to the screening of preparation method and quality control of the product (15-16). An efficient quantitative measurement of drug

EE within nanoparticles needs to be established. A number of techniques, including gel-filtration, dialysis and ultracentrifugation are available for the study of drug EE (17).

MTX can be detected under a variety of chromatographic conditions, i.e. on different stationary phases, under a choice of mobile phase conditions (acidic or neutral, employing ion-pair or micellar chromatography), followed by several detection techniques (UV-Vis spectrophotometry, pre- or post-column oxidation and fluorimetry, electrochemistry, mass spectrometry). Several reports have described methods for quantifying MTX, however, most of them have been focused on their separation in biological samples, a few assays employed for the quality control of MTX (18) and no one for the determination of MTX in nanoparticles. In fact, there is no official assay described in the pharmacopoeias for quantification of MTX in nanocapsules.

Since our research involves the development of PLA and PLA-PEG nanocapsules containing methotrexate, the objective of this paper was to develop and validate a rapid and effective chromatographic procedure for the determination of methotrexate EE in polymeric nanocapsules using RP-HPLC with ultraviolet detector.

## **2. Experimental**

### **2.1. Materials and chemicals**

Poly(DL-lactic acid) was supplied from Sigma-Aldrich (USA). Poly(DL-lactic acid)-poly(ethylene glycol) diblock copolymer (PLA-PEG 49KD, 20% PEG 5KD) was obtained from Alkermes (USA). Methotrexate (sodium salt) was provided by Biosintética (Biometrox<sup>®</sup>, Brazil). Miglyol 812N and sorbitan monoolate (Span 80) were purchased from Sasol (USA) and Bereca (Brazil) respectively. Polysorbate 80 (Tween 80) was obtained from Delaware (Brazil). Ultrapure water was provided by a Milli-Q<sup>®</sup> purification system (Millipore, USA). Acetonitrile and tetrahydrofuran HPLC grade was purchased from Vetec<sup>®</sup> (Brazil). Other solvents and reagents used were analytical grade.

## 2.2. Apparatus and chromatographic conditions

The HPLC analysis was performed on a Shimadzu LC-10A system (Kyoto, Japan) equipped with a LC-10AD pump, SPD-10AV variable-wavelength detector (set at 313 nm), SCL-10Avp controller unit and the sample injection performed via a Rheodyne 7125 valve with a 20  $\mu\text{L}$  loop. A RP  $\text{C}_{18}$  Shimadzu Shim-pack CLC-ODS (150 mm x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) was employed with a mobile phase constituted by water, acetonitrile and tetrahydrofuran (65:30:5 v/v) adjusted to pH 3.0 in an isocratic system, at a flow rate of 0.8  $\text{mL min}^{-1}$ . The HPLC system was operated at  $40 \pm 1^\circ \text{C}$ . The injection volume was 20  $\mu\text{L}$  for all standards and samples. Data acquisition was performed using CLASS-VP software by measurement of detected peak areas.

## 2.3. Preparation of nanocapsules

Nanocapsules were prepared according to nanoprecipitation method Fessi et. al., 1989 (19). Briefly, 40 mg of polymer (PLA or PLA-PEG) and 40 mg Span 80 were dissolved in 15 mL of acetone containing 125  $\mu\text{L}$  of Mygliol 812N and 100  $\mu\text{L}$  MTX (2,5 mg). This organic solution was added dropwise into aqueous phase (30 mL). The aqueous phase was constituted by deionized water adjusted at pH 5.0 containing 45 mg of Tween 80. After stirring magnetically at room temperature for 10 min, the organic solvent was removed using a rotary evaporator (Quimis Q-344B2) and the final volume was adjusted to 10 mL.

Blank nanocapsules were prepared according the procedure previously described, omitting obviously the drug. All samples were prepared in triplicate.

## 2.4. Standard and standard solutions

The stock standard solution of MTX was prepared in mobile phase at the concentration of 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The standard solutions were prepared by diluting the stock solution to: 10, 20, 30, 40 and 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in mobile phase.

## 2.5. Method validation

The objective of validation of an analytical procedure is to demonstrate that it is adequate for its intended purpose. To meet current pharmaceutical regulatory guidelines (ICH, USP, EP (20-

22)) a number of parameters must be investigated in order to validate analytical methods such as linearity, specificity, precision, accuracy and limit of quantitation (LOQ).

#### *Linearity*

The linearity response was assessed in the range of 10-50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Appropriate amounts of the stock solution were diluted with mobile phase, yielding concentrations of 10, 20, 30, 40 and 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Triplicate injections of each were carried out. The linear regression was used for data evaluation. Peak area ratios of standard compounds were plotted against theoretical concentrations of standards. Linearity was expressed as a correlation coefficient; the value must be  $>0.9990$ .

#### *Precision*

The repeatability (intra-day) and intermediate (inter-day) precision of the method were demonstrated by analyzing six nanocapsules samples of 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  during the same day and 3 different days under the same conditions. Precision was expressed as relative standard deviation (R.S.D.); results must be less than 2%.

#### *Specificity*

Blank PLA and PLA-PEG nanocapsules were prepared to evaluate method specificity. They were treated in the same manner as the samples and injected into the system to investigate the ingredient interference on the selectivity of the methotrexate separation. Triplicate injections of each were made.

#### *Accuracy*

The accuracy was evaluated by a recovering test. Blank nanocapsules were spiked with known amounts of MTX, at three different levels (lower, medium and upper concentration) corresponding to 12.5, 25 and 37.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The recovery of the added standard was determined in triplicate analysis and calculated by the formula:  $R\% = \left( \frac{Snc - Bnc}{Ss} \right) \times 100$ , in which  $R$  is the recovery,  $Snc$  is the spiked nanocapsule,  $Bnc$  is the blank nanocapsule, and  $Ss$  is the standard solution.

### *Limit of quantitation*

The limit of quantitation was based on the standard deviation of the response and the slope of the constructed calibration curve. The LOQ may be expressed as:  $LOQ = \left( \frac{10 \sigma}{S} \right)$ , where  $\sigma$  is the standard deviation of the response and  $S$  is the slope of calibration curve.

## **2.6. Drug entrapment efficiency**

The entrapment efficiency (%) was estimated as being the difference between the total concentration of methotrexate found in the nanocapsule suspensions after the complete dissolution in acetonitrile and the concentration of drug in the supernatant obtained by suspension ultrafiltration/centrifugation procedure using Ultrafree-MC® membranes (100000 NMWL; Millipore, USA). The drug content was expressed in micrograms of methotrexate per milliliter of suspension.

## **3. Results and discussion**

An isocratic RP-HPLC method with UV detection was proposed as a suitable method for quantitative determination of methotrexate entrapment efficiency in polymeric nanocapsules. The chromatographic conditions such as the portions of mobile phase were adjusted as a function of the drug physical chemical characteristics and did not interfere in the structure of nanocapsule. MTX can be eluted under isocratic conditions by employing mixtures of aqueous buffers at pH values ranging from 2.5 to 6.7. Therefore, the pH selected was 3.0 because under this pH conditions MTX can be found in its undissociated form ( $pK_a$  3.8, 4.8, 5.6) (18).

Under the experimental conditions, the linearity of the method was determined at five concentrations levels ranging from 10 to 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for methotrexate. The calibration curve was constructed by plotting concentration versus corresponding mean peak area. The method was linear, showing a correlation coefficient of 0,9998. All the results are showing Table 1. The representative linear equation for was:  $y = 91758x + 30764$ . The limit of quantitation calculated was 2.61  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

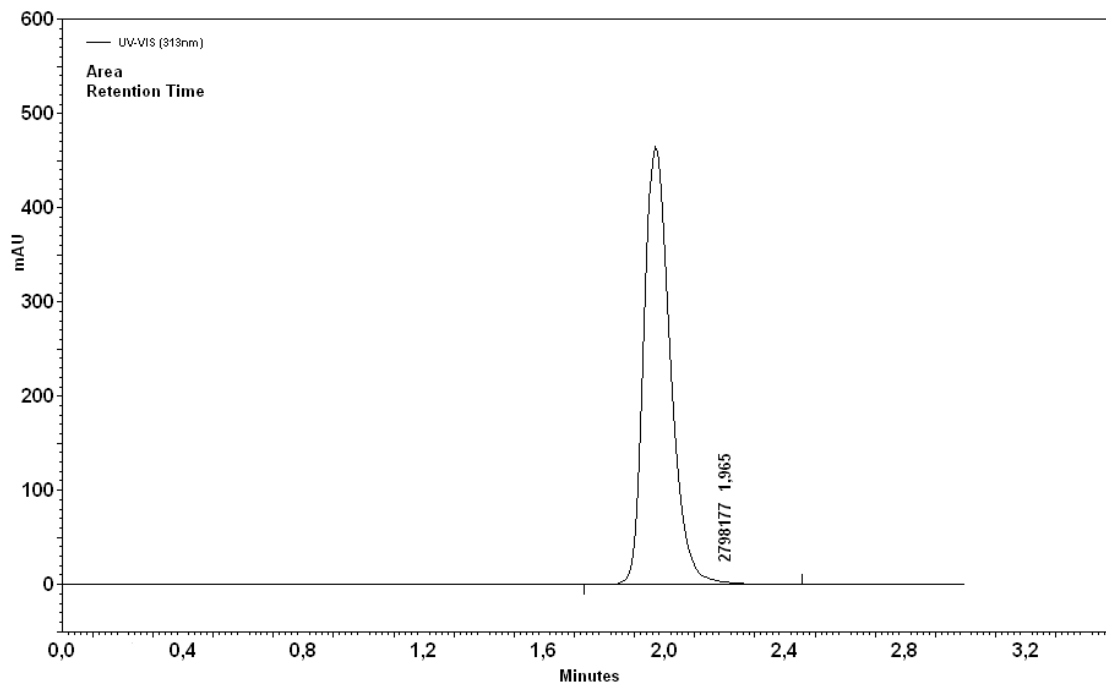
Table 1. The linearity and limit of quantitation

Range of linearity ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Peak area (mean and R.S.D)*
10	959133.33 $\pm$ 0.333
20	1874552.22 $\pm$ 1.122
30	2758222.78 $\pm$ 0.646
40	3682658.67 $\pm$ 0.139
50	4642992.67 $\pm$ 0.508
Equation	$y = 91758x + 30764$
$r^2$	0.9998
LOQ	2.61 $\mu\text{g} / \text{mL}$

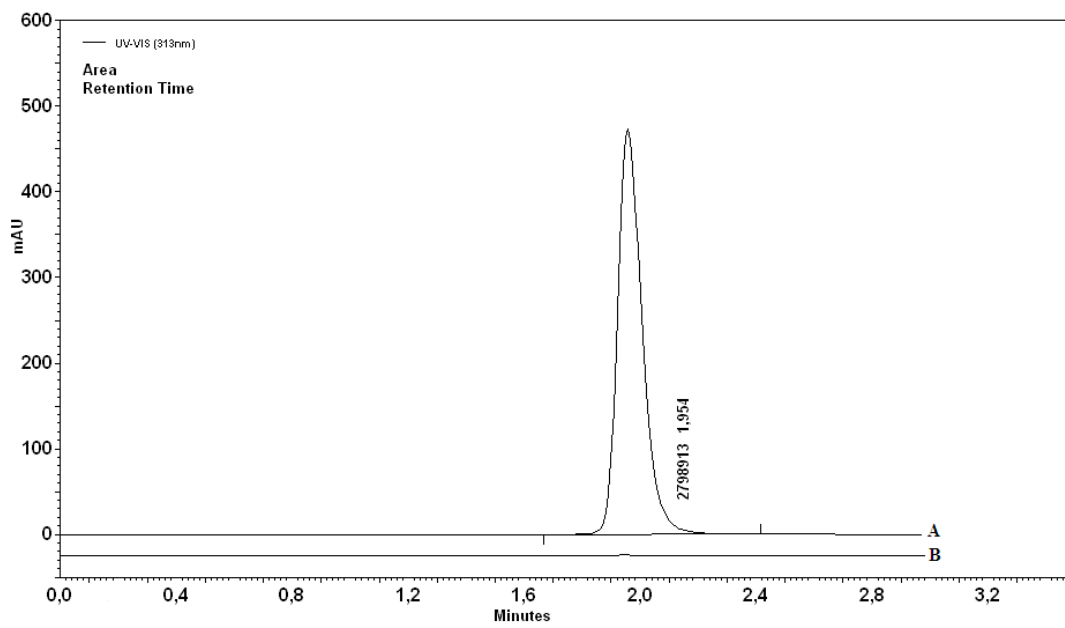
\*Mean + R.S.D (n = 3)

The specificity of the method was evaluated by analyzing a blank PLA and PLA-PEG nanocapsules. The chromatograms (Fig. 2) showed that the method is specific, and there is no interference or overlaps of the compounds of nanocapsules with the methotrexate response at 313 nm detection wavelength.

A



B





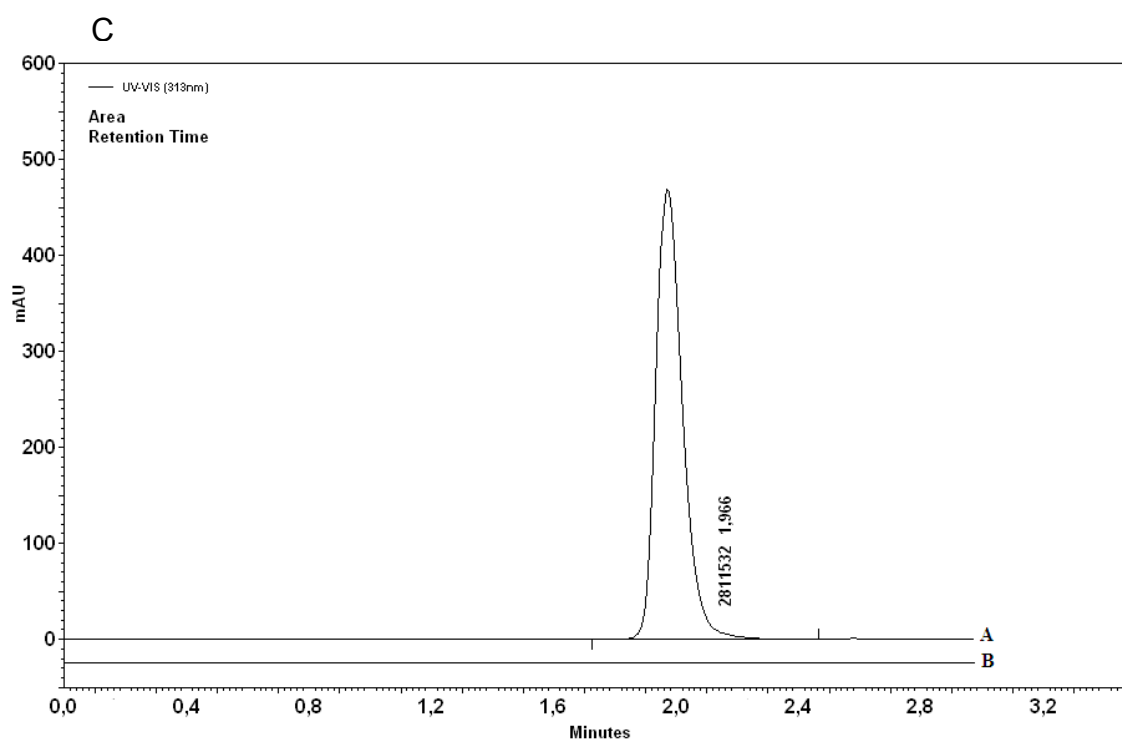


Fig. 2. Typical chromatograms obtained under the experimental conditions. (A) Standard solution of  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ . (B) 1 PLA-PEG nanocapsule containing  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  of MTX, 2 Blank PLA-PEG nanocapsule. (C) 3 PLA nanocapsule containing  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  of MTX, 4 Blank PLA nanocapsule.

The repeatability and intermediate precision was determined by performing six replicate analyses of the same sample and evaluated by R.S.D. of the peak area of methotrexate. The mean peak area and the relative standard deviation are reported in Table 2. The obtained values indicate good precision.

Table 2. Results of the precision

Sample nanocapsule* ( $30 \mu\text{g / mL}$ )	Theoretical Amount ( $\mu\text{g/ml}$ ; Mean $\pm$ R.S.D)	Recovery (%)
Day 1	$29.75 \pm 0.37$	99.18
Day 2	$29.95 \pm 0.14$	99.84
Day 3	$30.23 \pm 0.22$	100.78
Inter-day	$29.92 \pm 0.72$	99.75

\*(n = 6)

The accuracy was determined using a recovery test by fortifying blank PLA and PLA-PEG nanocapsules with methotrexate standard at 3 levels and assaying by the developed method. The mean values of the percent recoveries for each concentration of methotrexate are show in Table 3. The results indicated a good accuracy of the proposed method.

Table 3. Results from the recovery test( Mean  $\pm$  R.S.D).

Sample (n = 3)	Level ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Mean recovery $\pm$ R.S.D*.
MTX-PLA nanocapsule	12.5	100.36 $\pm$ 0.23
	25	99.54 $\pm$ 0.13
	37.5	101.23 $\pm$ 0.32
MTX-PLA-PEG nanocapsule	12.5	96.74 $\pm$ 0.44
	25	98.11 $\pm$ 0.10
	37.5	100.33 $\pm$ 0.37

The proposed method was applied to determine MTX entrapment efficiency (EE) in nanocapsules. The mean values of PLA and PLA-PEG nanocapsules were 79,31% and 59,97 %, respectively. All results demonstrated R.S.D. of  $< 2.0$  % from triplicate analysis of each formulation. Considering water-soluble drugs usually have a poor encapsulation efficiency (23), the validated method had successfully been applied to the assay of EE of methotrexate-loaded nanocapsules.

#### 4. Conclusions

An isocratic RP-HPLC method for the determination of methotrexate EE in PLA and PLA-PEG nanocapsules has been developed and validated. The proposed method proved to be simple, rapid and effective. The results confirms that the method can be a suitable technique to quantify methotrexate in commercially available products and formulations of nanocapsules.

## 5. References

1. G. H. Hitchings, S. L. Smith. Dihydrofolate reductases as targets for inhibitors. *Adv. Enz. Regul.* 18: 349-371 (1980).
2. P. Calabresi, R. E. Parks. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. L. S. Goodman, A. Gilman, Eds. Macmillan Publishing, New York, NY, 1975, pp. 1254-1307.
3. K. D. Ballantyne, A. C. Perkins, M. V. Pimm, M. C. Garnett, J. A. Clegg, N. C. Armitage, R. W. Baldwin, J. D. Hardcastle. Biodistribution of a monoclonal antibody-methotrexate conjugate (791T/36-MTX) in patients with colorectal cancer. *Int. J. Cancer (Suppl. 2)* 41: 103-108 (1988).
4. J. A. Kralovec, G. Spencer, A. H. Blair, M. Mammen, M. Singh, T. I. Ghose. Synthesis of methotrexate-antibody conjugates by regiospecific coupling and assessment of drug and antitumor activities. *J. Med. Chem.* 32: 2426-2431 (1989).
5. J. A. Kralovec, M. Singh, M. Mammen, A. H. Blair, T. I. Ghose. Synthesis of site-specific methotrexate IgG conjugates. Comparison of stability and antitumor activity with active-ester-based conjugates. *Cancer Immunol. Immunother.* 29: 293-302 (1989).
6. D. J. Elias, L. Hirshowitz, L. E. Kline, J. F. Kroener, R. O. Dillman, L. E. Walker, J. A. Robb, R. M. Timms. Phase I clinical comparative study of monoclonal antibody KS1/4 and KS1/4-methotrexate immunoconjugate in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 50: 4154-4159 (1990).
7. D. J. Elias, L. E. Kline, B. A. Robbins, H. C. L. Johnson, K. Pekny, M. Benz, J. A. Robb, L. E. Walker, M. Kosty, R. O. Dillman. Monoclonal antibody KS1/4-methotrexate immunoconjugate studies in nonsmall cell lung carcinoma. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 150: 1114-1122 (1994).
8. F. Puisieux, G. Barratt, G. Courarraze, P. Couvreur, J. P. Devissaguet, C. Dubernet, E. Fattal, H. Fessi, C. Vauthier. *Polymeric Biomaterials*. M. Dekker, Eds. New York, NY, 1994, pp. 749-794.
9. D. K. Gilding, A. M. Reed. Biodegradable polymers for use in surgery, polyglycolic/poly(lactic acid) homo- and copolymers. *Polym.* 20: 1459-1464 (1979).
10. Y. Ogawa, M. Yamamoto, S. Takada, H. Okada, T. Shimamoto. Controlled-release of euprolide acetate from polylactic acid or copoly(lactic/glycolic) acid microcapsules: influence of molecular weight and copolymer ratio of polymer. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 1502-1507 (1988).
11. R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 263: 1600-1603 (1994).

12. D. Bazile, C. Prud'homme, M. T. Bassoullet, M. Marlard, G. Spenlehauer, M. Veillard. Stealth Me. PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J. Pharm. Sci.* 84:493-498 (1995).
13. S. E. Dunn, A. G. A. Coombes, M. C. Garnett, S. S. Davis, M. C. Davies, L. Illum. In vitro cell interaction and in vivo biodistribution of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres surface modified by poloxamer and poloxamine copolymers. *J. Contr. Release* 44: 65-76 (1997).
14. V. C. Mosqueira, P. Legrand, R. Gref, B. Heurtault, M. Appel, G. Barratt. Interactions between a macrophage cell line (J774A1) and surface-modified poly(DL-lactide) nanocapsules bearing poly(ethylene glycol). *J. Drug Target.* 7: 65-78 (1999).
15. T. F. Meng, G. H. Ma, Y. D. Liu, W. Qiu, Z. G. Su. Microencapsulation of bovine hemoglobin with high bio-activity and high entrapment efficiency using a W/O/W double emulsion technique *Colloids Surf. B* 33: 177-183 (2004).
16. T. Pitaksuteepong, N. M. Davies, I. G. Tucker, T. Rades. Factors influencing the entrapment of hydrophilic compounds in nanocapsules prepared by interfacial polymerisation of water-in-oil microemulsions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53: 335-342 (2002).
17. P. G. Shao, L. C. Bailey. Porcine insulin biodegradable polyester microspheres: stability and in vitro release characteristics. *Pharm. Dev. Technol.* 5: 1-9 (2000).
18. F. M. Rubino. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *J. Chromatogr. B* 764: 217-254 (2001).
19. H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita. Nanocapsules formation by interfacial deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55: R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub> (1989).
20. International Conference of Harmonization (ICH), Text on validation of Analytical Procedures, Q2A.
21. United States Pharmacopeia/National Formulary, United State Pharmacopoeial Convention, 24nd ed., United States Pharmacopeia/National Formulary, Rokville, MD, 2000.
22. European Pharmacopeia, Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe, 5nd ed., Strassbourg, France, 2005.
23. E. Leo, B. Brina, F. Forni, M. A. Vandelli. In vitro evaluation of PLA nanoparticles containing a lipophilic drug in water-soluble or insoluble form. *Int. J. Pharm.* 278: 133-141 (2004).