UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Sistemas de liberação ocular contendo fluconazol: obtenção,
caracterização e liberação passiva e iontoforética *in vitro* e *in vivo***

Taís Gratieri

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Sistemas de liberação ocular contendo fluconazol: obtenção,
caracterização e liberação passiva e iontoforética *in vitro* e *in vivo***

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientanda: Taís Gratieri

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Fonseca
Vianna Lopez

Ribeirão Preto
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Gratieri, Taís

Sistemas de Liberação Ocular contendo Fluconazol: obtenção, Caracterização e Liberação Passiva e Iontoforética *In vitro* e *In vivo*. Ribeirão Preto, 2010.

190 p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Lopez, Renata Fonseca Vianna.

1. Fluconazol. 2. Gel termorreversível 3. Iontoforese.
4. Micropartículas. 5. Penetração ocular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Taís Gratieri

Sistemas de Liberação Ocular contendo Fluconazol: obtenção, Caracterização e Liberação Passiva e Iontoforética *In vitro* e *In vivo*

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Fonseca
Vianna Lopez

Aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*"Para que serve a Utopia?
Ela está diante do horizonte.
Me aproximo dois passos e ela se afasta dois passos.
Caminho dez passos
e o horizonte corre dez passos mais à frente.
Por muito que eu caminhe nunca a alcançarei.
Para que serve a Utopia?
Serve para isto: para caminhar"*

(Eduardo Galeano)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Luíz e Ana, por terem sido meus professores mais importantes, exemplos de amor, honestidade, trabalho e determinação. É por todas as abdições que fizeram em meu favor ao longo da vida, por todo o incentivo, apoio e compreensão que esta conquista foi possível.

Aos meus avós, Odete e Agostinho, aos meus padrinhos, Vânia e Silvandır, e às minhas tias e primas: Nair, Ana (Fiinha), Eliana, Enilda e Romilda por sempre acreditarem e torcerem por mim.

Ao Theo, pela grande amizade, paciência e carinho durante todo esse período.

Aos amigos Cristiane, Lívia, Amanda, Priscilla, Rodrigo, Letícia, Guilherme e Bart, cujas amizades foram de fundamental importância para que este trabalho se realizasse de maneira mais tranquila e feliz.

Especialmente à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Renata Fonseca Vianna Lopez, que, apesar da pouca idade, foi como uma segunda mãe para mim. Tendo me acolhido em seu laboratório desde o primeiro ano de faculdade, ensinou-me a dar os primeiros passos no mundo da ciência. Rê, obrigada pelas incontáveis horas de dedicação, por todo o conhecimento que você compartilhou comigo, pelas “brincas”, pela amizade, pelo apoio e por todas as oportunidades que você me proporcionou.

E a Deus, por ter colocado todas estas pessoas em meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Claus-Michael Lehr, ao Dr. Ulrich Schäfer e ao Prof. Marc Schneider por me acolherem em seu grupo de pesquisa na Universität des Saarlandes e pela excelente orientação.

À Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Pulcinelli e ao Dr. Victor Hugo Sarmiento do Instituto de Química da UNESP de Araraquara pela orientação e auxílio durante os experimentos de reologia.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Gioelli da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pelo empréstimo do analisador de textura e ao funcionário Alexandre Armariani pelo auxílio no uso do equipamento.

Ao Prof. Dr. José Antonio Thomazine da Faculdade de Medicina pela orientação e auxílio na execução dos experimentos de integridade da córnea.

Ao Prof. Dr. Luís Alexandre Pedro de Freitas e ao seu aluno Rodrigo Molina Martins pelo empréstimo do *spray dryer* e auxílio na produção das micropartículas.

Ao Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha, ao Dr. Victor Marques de Alencar, ao Prof. Dr. Luis Carlos Navegantes e ao seu aluno Eduardo Carvalho Lira da Faculdade de Medicina pela orientação e auxílio na execução dos experimentos de microdiálise *in vivo*.

Ao Prof. Dr. Antônio Augusto Velasco Cruz e ao Dr. Whemberton Martins de Araújo da Faculdade de Medicina pela orientação e auxílio na execução dos testes em humanos.

Aos meus colegas de laboratório: Danielle, Luciana, Stéphânia, Franciane, Deise, Paola, Talitha, Jonas, Joel e Patrícia pela convivência e colaboração prestada ao longo desse período. Em especial ao Guilherme pelos trabalhos em conjunto e pela solicitude durante os experimentos difíceis, tornando o trabalho no laboratório mais prazeroso.

Aos meus colegas de laboratório da Universität des Saarlandes: Davide, Michelle, Tsambika, Steffi, Stephani, Francisca, Marco, Nico, Andrea, Noah, Claudia, Christian, e Andi pelo carinho com que me acolheram e pela colaboração em todo o período que passei na companhia deles.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Patrícia, Henrique e José Orestes, pelo apoio e colaboração prestados.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Prof^ª. Dr^ª. Maria José Fonseca Vieira, e às funcionárias Ana Lúcia, Eleni, Rosana e Rossana pela colaboração e trabalho prestados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Apoio a Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas concessões de bolsa de Doutorado no país e exterior, respectivamente, e auxílio financeiro concedido a este projeto.

RESUMO

GRATIERI, T. **Sistemas de liberação ocular contendo fluconazol: obtenção, caracterização e liberação passiva e iontoforética *in vitro* e *in vivo***. 2010. 190f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A ceratite fúngica é uma doença grave que pode levar à perda da visão. O tratamento consiste na aplicação de antifúngicos, no entanto a administração tópica não tem se mostrado efetiva devido aos mecanismos de defesa do olho que levam à baixa retenção da formulação no local de aplicação e à baixa permeação do fármaco através da córnea. Sendo assim, formulações mais adequadas e sistemas de liberação vêm sendo estudados na tentativa de melhorar a biodisponibilidade local de antifúngicos. No presente trabalho foram obtidos e caracterizados dois sistemas para a liberação ocular do fluconazol (FLU), um antifúngico de atividade reconhecida: um gel termorreversível *in situ* e micropartículas poliméricas. A permeação passiva e iontoforética do fármaco através da córnea foi estudada *in vitro* a partir dos sistemas desenvolvidos. O gel termorreversível *in situ* contendo 16% de poloxamer e 1,0% de quitosana apresentou temperatura de geleificação adequada, propriedades mucoadesivas, melhores parâmetros mecânicos (dureza, compressibilidade e adesividade) que ambos os polímeros separadamente e mostrou-se superior que micropartículas poliméricas, com fluxo de permeação passiva cerca de duas vezes maior. A maior quantidade de fármaco retido na córnea foi obtida após aplicação da iontoforese em solução aquosa do fármaco. Ainda assim, o fluxo iontoforético do FLU não foi significativamente diferente do fluxo passivo a partir do gel termorreversível. O desempenho *in vivo* desta formulação foi então avaliado em modelo animal. Estudos de permeação, utilizando a técnica de microdiálise para amostragem da câmara anterior, confirmaram a maior biodisponibilidade do fármaco. Por fim, exames de cintilografia em humanos confirmaram maior tempo de retenção na superfície ocular. Portanto, o gel termorreversível *in situ* obtido e caracterizado no presente trabalho e a iontoforese, representam sistemas promissores para a liberação ocular tópica do FLU. O primeiro possui características promotoras de permeação, prolongado tempo de retenção e facilidade de obtenção e administração, e o segundo é capaz de promover maior retenção do fármaco na córnea.

Palavras-chave: Fluconazol. Gel termorreversível. Micropartículas. Iontoforese. Penetração ocular.

ABSTRACT

GRATIERI, T. **Ocular delivery systems for fluconazole: obtention, characterization and *in vitro/in vivo* passive and iontophoretic delivery.** 2010. 190p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Fungal keratitis is a serious disease that can lead to loss of sight. The treatment consists in antifungal application; however topical administration has not shown to be effective due to defense mechanisms of the eye, which leads to low retention at the application site and low permeation of the drug through the cornea. In this way, more suitable formulations and delivery systems have been studied in an attempt to increase local availability of antifungal agents. At the present work it was obtained and characterized two systems for the passive and iontophoretic ocular delivery of fluconazole (FLU), a well known antifungal agent: an *in situ* forming gel and polymeric microparticles. Passive and iontophoretic drug permeation across the cornea was studied *in vitro* from the developed systems. The *in situ* forming gel containing 16% of poloxamer and 1.0% of chitosan presented more adequate gelation temperature, mucoadhesive properties, improved mechanical parameters (strength, compressibility and adhesiveness) than both polymers separately and showed to be superior to the polymeric microparticles, with passive permeation flux almost twice higher. The greatest amount of drug retained in the cornea was achieved after iontophoresis application using an aqueous solution of the drug. Even though, the iontophoretic drug flux was not significantly different from the passive drug flux using the *in situ* forming gel. The *in vivo* performance of this formulation was then evaluated in an animal model. Permeation studies, using the microdialysis technique for the anterior chamber sampling, confirmed the increased drug availability. At the end, scintigraphy exams in humans confirmed the greater retention time at the ocular surface. Therefore, the *in situ* forming gel obtained and characterized at the present work and iontophoresis, represent promising systems for the topical ocular delivery of FLU. The first possess permeation enhancement properties, prolonged retention time and facility of obtention and administration, and the second is capable of promoting higher drug retention in the cornea.

Keywords: Fluconazole. *In situ* forming gel. Microparticles. Iontophoresis. Ocular penetration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema da anatomia ocular.....	3
Figura 2.	Secção histológica de córnea de porco, demonstrando o epitélio (EP) e parte do estroma (ST).....	5
Figura 3.	Representação esquemática do fluido lacrimal pré-corneal.....	10
Figura 4.	Ceratite fúngica: (A) lesão corneana com bordas hifadas, epitélio elevado e presença de anel imunológico e (B) lesão corneana com margens hifadas.....	13
Figura 5.	Estrutura química do fluconazol.....	15
Figura 6.	Estrutura química do poloxamer.....	20
Figura 7.	Estrutura química da quitosana.....	21
Figura 8.	Estruturas química do polímero Eudragit® RS 100.....	23
Figura 9.	Representação esquemática de um <i>spray dryer</i>	25
Figura 10.	Iontoforese utilizando sistema de eletrodos de Ag/AgCl. O ânodo contém um fármaco ionizável D^+ e seu contra íon A^- e Na^+Cl^-	27
Figura 11.	Esquema do fluxo eletrorepulsivo (A) e do fluxo eletrosmótico (B)	28
Figura 12.	Ilustração esquemática da distribuição de fármaco a partir da iontoforese transcorneal e transescleral.....	29
Figura 13.	Sistema de liberação iontoforética Eyegate®.....	30
Figura 14.	Esquema do teste <i>in vitro</i> de mucoadesão.	43
Figura 15.	Curva típica de análise do perfil de textura (APT).	44
Figura 16.	Procedimento para a cobertura do eletrodo de prata com cloreto de prata.....	48
Figura 17.	Preparo do ânodo (eletrodo +) em solução salina (5,78mM NaCl) e com corrente elétrica (0,3 mA) por 24 horas.	48
Figura 18.	Representação esquemática de célula de difusão iontoforética.....	50
Figura 19.	Ensaio de irritação <i>in vitro</i> – modelo organotípico HET-CAM.....	57
Figura 20.	Sonda linear confeccionada para os estudos de microdiálise.....	59
Figura 21.	Sequência de fotos representando as etapas de inserção da sonda nos estudos de microdiálise.	60
Figura 22.	Foto apresentando a configuração do experimento de microdiálise.....	61
Figura 23.	Fotos retiradas de voluntárias submetidas ao exame de cintilografia lacrimal.....	64
Figura 24.	Representação gráfica da curva analítica do FLU na faixa de concentração de 0,1 a 10,0 µg/mL.	66
Figura 25.	Cromatogramas sobrepostos de soluções de FLU nas concentrações de 0,1; 0,5; 2,5; 5,0 e 10 µg/mL.	66
Figura 26.	Representação gráfica da curva analítica do FLU na faixa de concentração de 0,1 a 200 µg/mL.....	67
Figura 27.	Reogramas de formulações poliméricas binárias contendo 16% de poloxamer e diferentes concentrações de quitosana: (A) 0,5%; (B) 0,75%; (C) 1,0%; (D) 1,25%; (E) 1,5% e (F) 0,2% de FLU.....	78
Figura 28.	Reograma de formulação monopolimérica de quitosana 1,0%.....	79
Figura 29.	Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') determinados a partir de varredura de frequência (0,1-10Hz) de formulações contendo 16% de poloxamer e diferentes concentrações de quitosana: 25 °C.....	81
Figura 30.	Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') determinados a partir de varredura de frequência (0,1-10Hz) de formulações contendo 16% de poloxamer e diferentes concentrações de quitosana: 35 °C.....	82

Figura 31.	Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') determinados a partir de varredura de frequência (0,1-10Hz) de formulação monopolimérica de quitosana 1,0%.....	83
Figura 32.	Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') determinados a partir de varredura de frequência (0,1-10Hz) de formulações contendo 16% de poloxamer e diferentes concentrações de quitosana. Todas as formulações foram misturadas a uma solução semelhante à solução lacrimal na razão de 50:7.	83
Figura 33.	Foto ao final do experimento de avaliação da força mucoadesiva <i>in vitro</i> demonstrando a falha de coesão da amostra.	87
Figura 34.	Firmeza (N) das formulações compostas de poloxamer e quitosana e suas misturas binárias determinadas através da análise do perfil de textura a 25° e 35°C.....	89
Figura 35.	Compressibilidade (N.mm) das formulações compostas de poloxamer e quitosana e suas misturas binárias determinadas através da análise do perfil de textura a 25° e 35°C.....	89
Figura 36.	Adesividade (N.mm) das formulações compostas de poloxamer e quitosana e suas misturas binárias determinadas através da análise do perfil de textura a 25° e 35°C.	90
Figura 37.	Distribuição de diâmetro em razão da porcentagem de volume diferencial das micropartículas de Eudragit® contendo FLU.....	94
Figura 38.	Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV Philipps XL 30 FEG) em aumentos de 2000 a 50000 vezes para as micropartículas MP03 (A e B) e MP04 (C e D).....	96
Figura 39.	Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (EM 208- Philips) do controle de epitélio corneano (t_0), contrastado com acetato de uranila e acetato de chumbo.....	101
Figura 40.	Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (EM 208- Philips) do epitélio corneano após 6 horas de experimento (t_{ex6}), contrastado com acetato de uranila e acetato de chumbo.....	102
Figura 41.	Concentração de fluoresceína no compartimento receptor em seis horas de experimento de permeação <i>in vitro</i> de diacetato de fluoresceína (μ 10M) como solução doadora.....	104
Figura 42.	Perfil de liberação do FLU 0,2%, através de membrana de acetato de celulose, a partir de: (A) solução de quitosana 0,5% (Q0,5), formulação contendo poloxamer 16% e quitosana 0,5% (Q0,5 P16), gel de poloxamer 16% (P16) e uma solução aquosa (sç aquosa); (B) solução de quitosana 1,0% (Q1,0), formulação contendo poloxamer 16% e quitosana 1,0% (Q1,0 P16) e gel de poloxamer 16% (P16) e (C) solução de quitosana 1,5% (Q1,5), formulação contendo poloxamer 16% e quitosana 1,5% (Q1,5 P16) e gel de poloxamer 16%.....	105
Figura 43.	Perfil de permeação do FLU 0,2%, através da córnea de porco, a partir de: (A) solução de quitosana 0,5% (Q0,5), formulação contendo poloxamer 16% e quitosana 0,5% (Q0,5 P16), gel de poloxamer 16% (P16) e uma solução aquosa (sç aquosa); (B) solução de quitosana 1,0% (Q1,0), formulação contendo poloxamer 16% e quitosana 1,0% (Q1,0 P16) e gel de poloxamer 16% (P16) e (C) solução de quitosana 1,5% (Q1,5), formulação contendo poloxamer 16% e quitosana 1,5% (Q1,5 P16) e gel de poloxamer 16%.....	108

Figura 44.	Quantidade de FLU que permaneceu retido na córnea ao final dos experimentos <i>in vitro</i> de permeação.....	109
Figura 45.	Perfil de permeação do FLU 0,2%, através da córnea de porco quando livre em solução aquosa (sç aquosa) e quando presente na forma de micropartículas de Eudragit® (MP03 em sç).....	111
Figura 46.	Perfil de permeação do FLU 0,2%, através da córnea de porco, a partir de micropartículas de Eudragit® (12,82 mg de partículas/mL) incorporadas no gel de poloxamer/quitosana (16 e 1,0%, respectivamente) (MP03 em Q1,0 P16).....	112
Figura 47.	Perfil de resistência da córnea ao longo do experimento de iontoforese empregando corrente de 1,0 mA/cm ²	115
Figura 48.	Perfil de permeação iontoforético do FLU 0,2%, através da córnea de porco, a partir de solução aquosa (iontoforese 0,5 mA/cm ² e iontoforese 1,0 mA/cm ²).....	117
Figura 49.	Perfil de permeação iontoforético do FLU através da córnea de porco, a partir de micropartículas de Eudragit em solução aquosa (iontoforese 0,5 mA/cm ² e iontoforese 1,0 mA/cm ²).....	122
Figura 50.	Velocidades de permeação do FLU através da córnea de porco, representadas pela porção linear das curvas de permeação obtidas nos experimentos de permeação passiva e iontoforética <i>in vitro</i>	123
Figura 51.	Quantidade de FLU que permaneceu retido na córnea ao final dos experimentos <i>in vitro</i> de permeação.....	124
Figura 52.	Representação gráfica da concentração de FLU na câmara anterior de coelhos (µg/mL) em função do tempo (horas), a partir de: Formulação polimérica binária contendo quitosana 1,0% e poloxamer 16% (Q1,0 P16), solução aquosa (controle) e solução de quitosana 1,0%.....	130
Figura 53.	Perfil de permeação ocular <i>in vivo</i> do FLU através da córnea de coelhos a partir de uma formulação polimérica binária e soluções de quitosana e aquosa (controle).....	131
Figura 54.	Representação gráfica do <i>clearance</i> radioativo em função do tempo da formulação Q1,0 P16 ou soro fisiológico (controle) marcados com Tc ⁹⁹	136
Figura 55.	Imagens cintilográficas dos olhos direito e esquerdo obtidas durante o estudo de retenção por Cintilografia.....	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Quantidade de solução padrão de FLU (mL) adicionada a cada amostra no teste de recuperação.....	37
Tabela 2.	Quantidade de fármaco (FLU) e polímero (Eudragit®) por 100 mL de cada uma das soluções secas por <i>spray drying</i>	45
Tabela 3.	Pontuação atribuída para o aparecimento de cada sinal indicativo de irritação em função do tempo no teste de irritação <i>in vitro</i> em modelo organotípico HET-CAM.....	58
Tabela 4.	Classificação das formulações quanto ao grau de irritação de acordo com a pontuação atribuída (P) para os sinais de irritação segundo o teste de irritação <i>in vitro</i> em modelo organotípico HET-CAM.....	58
Tabela 5.	Análise da Precisão e da Exatidão intra dia.....	68
Tabela 6.	Análise da Precisão e da Exatidão inter dia.....	69
Tabela 7.	Representação do resultado do teste de recuperação aplicando-se as condições cromatográficas descritas no item 4.2.1.1.....	70
Tabela 8.	Porcentagem de recuperação do FLU adicionado em um homogeneizado de córnea, extraído com 5 mL de tampão Hepes pH 7,4.....	70
Tabela 9.	Precisão e exatidão do limite de quantificação do FLU e valores abaixo deste limite.....	71
Tabela 10.	Quantidade de FLU obtida após filtração de suspensões do fármaco em diferentes concentrações.....	72
Tabela 11.	Determinação dos coeficientes de partilha óleo/água ($K_{\text{óleo/água}}$), córnea/água ($K_{\text{córnea/água}}$) e córnea/solução lacrimal ($K_{\text{córnea/sq lacrimal}}$), através da verificação da quantidade remanescente de FLU por CLAE, na fase aquosa, após contato com a fase oleosa (octanol ou córnea).....	73
Tabela 12.	Temperatura de transição sol/gel ($T_{\text{sol/gel}}$) obtida para as formulações monopolímericas de poloxamer.....	76
Tabela 13.	Frequências nas quais o módulo elástico passa a ser maior que o módulo viscoso ($G' > G''$). Os valores foram obtidos a partir de uma varredura de frequência (0,1-10Hz) a 35°C de formulações contendo 16% de poloxamer e diferentes concentrações de quitosana (0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5%) misturadas a uma solução semelhante à solução lacrimal na razão de 50:7....	85
Tabela 14.	Força mucoadesiva das formulações poliméricas binárias contendo poloxamer e quitosana.....	87
Tabela 15.	Caracterização das micropartículas de Eudragit® (Eud) contendo o FLU.....	93
Tabela 16.	Volume do compartimento receptor, diâmetro e área de difusão de cada célula de difusão.....	99
Tabela 17.	Parâmetros cinéticos das curvas de liberação do FLU ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo ^{1/2}	106
Tabela 18.	Parâmetros cinéticos de permeação ocular <i>in vitro</i> do FLU a partir de diferentes formulações.....	109
Tabela 19.	Parâmetros cinéticos e os dados obtidos de permeação e retenção ocular <i>in vitro</i> do FLU na forma livre e encapsulada (MP03) a partir das diferentes formulações.....	112
Tabela 20.	Parâmetros cinéticos e os dados obtidos de permeação e retenção ocular <i>in vitro</i> do FLU com ou sem a aplicação da corrente elétrica.....	117
Tabela 21.	Parâmetros cinéticos e os dados obtidos de permeação e retenção ocular <i>in vitro</i> do PCT com ou sem a aplicação da corrente elétrica.....	118

Tabela 22. Parâmetros cinéticos e os dados obtidos de permeação e retenção ocular <i>in vitro</i> do FLU encapsulado com ou sem a aplicação da corrente elétrica.....	122
Tabela 23. Valores referentes à determinação da recuperação <i>in vitro</i> das sondas utilizadas nos estudos de microdiálise, para diferentes concentrações de FLU.....	129
Tabela 24. Valores referentes à determinação da recuperação <i>in vivo</i> das sondas utilizadas nos estudos de microdiálise, para o FLU, pelo método da retrodiálise.....	129
Tabela 25. Valores referentes a AUC, $t_{\text{máx}}$ e $C_{\text{máx}}$, calculados a partir do gráfico que relaciona concentração de FLU na câmara anterior pelo tempo, após permeação <i>in vivo</i> do FLU.....	130
Tabela 26. Parâmetros cinéticos de permeação ocular <i>in vivo</i> do FLU.....	131
Tabela 27. Valores de AUC obtidos nos experimentos de retenção por cintilografia.....	136

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APT	Análise do perfil de textura
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CAM	Membrana corioalantoide
FL	Filme lacrimal
FLU	Fluconazol
FDA	<i>USA Food and Drug Administration</i>
G'	Módulo elástico
G''	Módulo viscoso
K _{o/a}	Coefficiente de partilha óleo/água
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIC	Concentração inibitória mínima
MM	Massa Molar
η'	Viscosidade dinâmica
PCT	Paracetamol
PEO	Poli-(óxido de etileno)
pI	Ponto isoelétrico
pKa	Constante de dissociação acídica
POP	Poli-(óxido de propileno)
(m/m)	Massa/massa
(m/v)	Massa/volume
(v/v)	Volume/volume
ROI	Região de interesse
RVL	Região viscoelástica linear
tan δ	Tangente de perda ou viscosa
T _{sol/gel}	Temperatura de transição solução/gel
UV/Vis	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	xi
Lista de abreviaturas e siglas	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. Estrutura do Globo Ocular	2
2.1.1. Anatomia externa.....	2
2.1.2. Globo ocular.....	2
2.1.3. Humor aquoso.....	3
2.1.4. Córnea.....	4
2.1.5. Filme lacrimal.....	8
2.2. Infecções fúngicas.....	11
2.3. O Fluconazol.....	15
2.4. Administração ocular de fármacos.....	17
2.4.1. Géis Termorreversíveis.....	18
2.4.2. Micropartículas.....	22
2.4.2.1. Métodos de obtenção das micropartículas	24
2.4.3. Iontoforese: princípios básicos.....	26
2.4.3.1. Iontoforese ocular.....	28
3. OBJETIVO.....	32
3.1. Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. Material.....	33
4.1.1. Córnea.....	33
4.1.2. Animais de laboratório.....	33
4.2. Métodos.....	34
4.2.1. Padronização da metodologia analítica para quantificação do FLU por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	34
4.2.1.1. Condições cromatográficas.....	34
4.2.1.2. Determinação do comprimento de onda (λ) de absorção do FLU.....	34
4.2.1.3. Determinação da curva analítica do FLU.....	34
4.2.1.4. Validação do método analítico.....	35
4.2.1.4.1. Especificidade (estudo dos interferentes).....	35
4.2.1.4.2. Linearidade.....	35
4.2.1.4.3. Precisão e Exatidão.....	36
4.2.1.4.3.1. Teste de Recuperação- exatidão.....	36
4.2.1.4.3.2. Teste de Recuperação do FLU a partir da córnea.....	37
4.2.1.4.4. Limite de quantificação.....	38
4.2.1.4.5. Limite de detecção.....	38
4.2.2. Caracterização dos parâmetros físico-químicos do FLU.....	39
4.2.2.1. Solubilidade.....	39
4.2.2.2. Determinação do coeficiente de partilha óleo/água ($K_{O/A}$).....	39
4.2.2.3. Determinação do coeficiente de partilha córnea/água ($K_{\text{córnea/água}}$) e córnea/solução lacrimal ($K_{\text{córnea/sc lacrimal}}$).....	40

4.2.3. Gel termorreversível.....	40
4.2.3.1. Determinação da temperatura de geleificação.....	40
4.2.3.2. Análise reológica oscilatória.....	42
4.2.3.3. Avaliação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva	42
4.2.3.4. Análise do perfil de textura	43
4.2.4. Micropartículas.....	44
4.2.4.1. Obtenção de micropartículas contendo o FLU	44
4.2.4.2. Rendimento do processo.....	45
4.2.4.3. Distribuição de tamanho.....	45
4.2.4.4. Morfologia.....	46
4.2.4.5. Eficiência de encapsulação.....	46
4.2.4.5.1. Eficiência real de encapsulação.....	46
4.2.4.6. Potencial zeta.....	47
4.2.5. Iontoforese.....	47
4.2.5.1. Eletrodos.....	47
4.2.5.2. Corrente total e densidade de corrente	48
4.2.5.3. Estabilidade do FLU após a aplicação da corrente elétrica	49
4.2.6. Estudos <i>in vitro</i> de liberação e permeação passiva e iontoforética	49
4.2.6.1. Células de difusão e condições dos ensaios	49
4.2.6.2. Validação dos elementos mecânicos da célula de difusão desenvolvida.....	50
4.2.6.3. Estudos de integridade da córnea	51
4.2.6.3.1. Microscopia de transmissão eletrônica	51
4.2.6.3.2. Função barreira da córnea	52
4.2.6.4. Formulações.....	53
4.2.6.5. Liberação do FLU a partir de diferentes formulações	53
4.2.6.5.1. Determinação da concentração de FLU liberado	54
4.2.6.6. Permeação passiva e iontoforética do FLU através da córnea de porco	55
4.2.6.6.1. Determinação da contribuição do fluxo eletrosmótico na iontoforese do FLU.....	55
4.2.6.6.2. Porcentagem de hidratação da córnea após iontoforese.....	56
4.2.6.7. Estudo de retenção	56
4.2.7. Ensaio de irritação ocular <i>in vitro</i> – modelo organotípico HET-CAM.....	56
4.2.8. Estudos <i>in vivo</i> : Padronização da técnica de microdiálise da câmara anterior e estudos de permeação <i>in vivo</i> do FLU	58
4.2.8.1. Sistema de microdiálise.....	58
4.2.8.2. Estudos de permeação <i>in vivo</i>	59
4.2.8.3. Validação da metodologia.....	61
4.2.8.4. Análise dos dados.....	62
4.2.9. Estudos <i>in vivo</i> do tempo de retenção da formulação por Cintilografia.....	63
4.2.10. Análise dos Resultados.....	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1. Padronização da metodologia analítica para quantificação do FLU por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	65
5.1.1. Determinação do comprimento de onda (λ) de excitação do FLU.....	65
5.1.2. Fase Móvel.....	65
5.1.3. Determinação da curva analítica.....	65
5.1.4. Validação da Metodologia.....	67
5.1.4.1. Linearidade.....	67
5.1.4.2. Seletividade (estudo dos interferentes).....	68
5.1.4.3. Precisão e Exatidão.....	68

5.4.1.3.1. Teste de recuperação – exatidão.....	69
5.4.1.3.2. Teste de Recuperação do FLU a partir da córnea	70
5.4.1.4. Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD).....	71
5.2. Caracterização dos parâmetros físico-químicos do FLU.....	72
5.2.1. Solubilidade em meio aquoso.....	72
5.2.2. Determinação do coeficiente de partilha $K_{O/A}$, $K_{córnea/água}$ e $K_{córnea/sc\ lacrimar}$	72
5.3. Géis termorreversíveis.....	74
5.3.1. Temperatura de geleificação	75
5.3.2. Análise reológica oscilatória.....	80
5.3.3. Avaliação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva.....	86
5.3.4. Análise do perfil de textura	88
5.4. Micropartículas.....	92
5.4.1. Obtenção e caracterização das micropartículas de Eudragit® contendo FLU.....	92
5.4.2. Rendimento do processo.....	93
5.4.3. Distribuição de tamanho das micropartículas.....	94
5.4.4. Morfologia das micropartículas.....	95
5.4.5. Eficiência da microencapsulação.....	97
5.4.5.1. Eficiência real de microencapsulação.....	97
5.4.6. Potencial zeta.....	98
5.5. Estudos <i>in vitro</i> de liberação e permeação.....	98
5.5.1. Células de difusão: validação dos elementos mecânicos.....	98
5.5.2. Estudos de integridade da córnea.....	100
5.5.2.1. Microscopia eletrônica de transmissão.....	101
5.5.2.2. Função barreira da córnea.....	103
5.5.3. Estudos de liberação <i>in vitro</i> do FLU a partir de diferentes formulações.....	105
5.5.4. Estudos de permeação <i>in vitro</i> do FLU a partir de diferentes formulações.....	107
5.5.4.1. Géis termorreversíveis.....	107
5.5.4.2. Micropartículas.....	111
5.5.4.3. Iontoforese ocular <i>in vitro</i>	114
5.6. Ensaio de irritação <i>in vitro</i> – modelo organotípico HET-CAM.....	125
5.7. Estudos <i>in vivo</i> de permeação.....	125
5.7.1. Microdialise.....	126
5.7.1.1. Validação da metodologia.....	129
5.7.1.2. Permeação <i>in vivo</i> do FLU	130
5.8. Estudos <i>in vivo</i> do tempo de retenção da formulação por Cintilografia.....	134
5.9. Resumo dos Resultados.....	139
6. CONCLUSÃO.....	142
7. TRABALHOS ORIGINADOS DA TESE.....	143
8. REFERÊNCIAS.....	144
9. ANEXOS.....	169

1. INTRODUÇÃO

A infecção fúngica na córnea (ceratite fúngica ou micótica, ceratomicose) é uma doença que ocorre praticamente no mundo todo. No entanto, sua epidemiologia está profundamente relacionada a fatores climáticos: ocorre principalmente em países quentes como o Brasil (IBRAHIM *et al.*, 2009) e atinge, na maioria das vezes, homens trabalhadores rurais, mais expostos a traumas oculares provocados por material orgânico (CARVALHO *et al.*, 2001; SRINIVASAN, 2004; WANG *et al.*, 2009a). Se inadequadamente tratada, pode levar à acentuada perda de visão e, em casos severos, à cegueira total ou mesmo à perda do globo ocular (THOMAS, 2003). O diagnóstico tardio, comum pela dificuldade de acesso da população rural aos serviços de saúde, diminui ainda mais as chances de sucesso da terapia (SALERA *et al.*, 2002). Soma-se a isso o fato de as indústrias farmacêuticas não desenvolverem pesquisas suficientes direcionadas às preparações oftálmicas antifúngicas, levando a comunidade oftalmológica a improvisar o tratamento com as metodologias disponíveis (THOMAS, 1994; BAYDOUN *et al.*, 2004; DI COLO *et al.*, 2004).

O fluconazol (FLU), por ser um fármaco estável, hidrossolúvel e com baixa toxicidade é um dos antifúngicos mais utilizados no tratamento das ceratomicoses (SODHI *et al.*, 2003; BEHRENS-BAUMANN *et al.*, 1990; HOLGADO *et al.*, 1993; AKLER *et al.*, 1995; ABBASOGLU *et al.*, 2001; SCHREIBER *et al.*, 2003; YILMAZ *et al.*, 2005; SONEGO-KRONE *et al.*, 2006). Mas, quando aplicado topicamente, sua biodisponibilidade é baixa devido às barreiras fisiológicas que limitam a entrada de fármacos no globo ocular. Estes mecanismos de proteção incluem (i) a produção lacrimal, levando a diluição da formulação e drenagem pelas vias lacrimais, resultando no baixo tempo de contato da formulação com a superfície ocular (KAUR *et al.*, 2002a) e (ii) a impermeabilidade da córnea (GEROSKI *et al.*, 2001; GHATE *et al.*, 2006).

Dessa forma, é de grande interesse a obtenção de um sistema que promova maior tempo de contato do fármaco com a superfície ocular, liberação prolongada do ativo e maior permeação e retenção na córnea (BAYDOUN *et al.*, 2004; PAWAR *et al.*, 2006). O presente trabalho procura conseguir isso por três meios: (i) utilizando um gel termorreversível com propriedades mucoadesivas e promotoras de permeação, (ii) utilizando micropartículas do fármaco e (iii) aplicando a iontoforese a diferentes formulações do fármaco.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estrutura do Globo Ocular

2.1.1. Anatomia externa

O globo ocular está situado dentro de uma cavidade óssea, protegido pelas pálpebras e células de gordura. Possui aproximadamente 24 mm de diâmetro anteroposterior e 12 mm de largura. Seis músculos extrínsecos são responsáveis por seus movimentos através de um sistema de roldanas ativas. Ainda externamente, encontra-se a conjuntiva, uma camada muito fina, transparente e com muitos vasos, que recobre a esclera, na parte anterior do olho e a parte interna das pálpebras. As pálpebras distribuem o fluido lacrimal pelos olhos, promovendo uma superfície opticamente lisa sobre a córnea (LUDWIG, 2005).

2.1.2. Globo ocular

O globo ocular, propriamente dito (Figura 1), é constituído por três túnicas ou camadas concêntricas aderidas entre si com a função de visão, nutrição e proteção. A camada externa ou fibrosa é constituída por dois tecidos conjuntivos, a córnea e a esclera. Esta camada possui a função de proteção (BOULTON *et al.*, 2004). O envelope corneoescleral forma um arcabouço fechado, perfurado ao fundo pelo canal escleral, pelo qual se insere o nervo óptico. Em outros locais também há a passagem de vasos sanguíneos pequenos e alguns nervos. Devido ao papel importante da córnea na permeação de fármacos, sua estrutura será descrita detalhadamente adiante.

A segunda camada, média ou vascular é formada pela coroide, íris e corpo ciliar. A coroide está situada abaixo da esclera e é intensamente pigmentada. Esses pigmentos absorvem a luz que chega à retina, evitando sua reflexão. Por ser intensamente vascularizada tem a função de nutrir a retina (ASHWORTH *et al.*, 1990).

A íris, estrutura muscular de cor variável, é dotada de um orifício central denominado pupila, cujo diâmetro varia, de acordo com a iluminação do ambiente. A coroide une-se na parte anterior do olho ao corpo ciliar, estrutura formada por musculatura lisa e que envolve o cristalino, modificando sua forma (ETHIER *et al.*, 2004).

O cristalino é uma lente biconvexa dinâmica que, ao mudar sua forma para mais arredondada, permite a focalização, no plano da *retina*, dos raios que iriam ser focalizados atrás dela. Atrás do *cristalino*, entre este e a retina, tem-se a *câmara vítrea*, preenchida por uma substância com consistência de gel, chamada de *vítreo* ou *humor vítreo*.

Por último, a camada interna ou nervosa é constituída pela retina. É a membrana mais interna e está abaixo da coróide. É composta por várias camadas celulares, designadas de acordo com sua relação ao centro do globo ocular. A camada mais interna, denominada camada de células ganglionares, contém os corpos celulares das células ganglionares, única fonte de sinais de saída da retina, que projetam axônios através do nervo óptico. Na retina encontram-se dois tipos de células fotossensíveis: os cones e os bastonetes. Quando excitados pela energia luminosa, estimulam as células nervosas adjacentes, gerando um impulso nervoso que se propaga pelo nervo óptico. (ASHWORTH *et al.*, 1990).

Figura 1. Esquema da anatomia ocular. A córnea é apresentada no detalhe (Adaptado de LUDWIG *et al.*, 2005).

2.1.3. Humor aquoso

O humor aquoso, líquido que preenche tanto a *câmara anterior*, entre a íris e a córnea, quanto a *câmara posterior*, entre a íris e o cristalino (Figura 1), é basicamente um ultrafiltrado de plasma sanguíneo. Tem como funções manter a pressão intraocular (PIO), garantindo o formato do bulbo ocular, nutrir os tecidos banhados por ele que são avasculares, assim como

recolher seus catabólitos (ETHIER *et al.*, 2004). Ele contém menos de 1% do total de proteínas do plasma, dando suporte à teoria da existência de uma barreira “hemato-aquosa” nos olhos (RITTENHOUSE *et al.*, 2000).

O humor aquoso é produzido na câmara posterior por ultrafiltração através dos capilares fenestrados dos processos ciliares e pela secreção de solutos acompanhados por água através do epitélio ciliar. Substratos endógenos como ascorbato e lactato estão presentes em maior concentração no humor aquoso que no plasma. Sua produção se dá por uma combinação de processos passivos como difusão, diálise e transporte ativo através do epitélio ciliar. A razão de formação de humor aquoso é relativamente independente da pressão intraocular (PIO), sendo de 2,0 µL/min em humanos (MACRI *et al.*, 1975). Isso corresponde a uma razão de renovação de 1% do conteúdo da câmara anterior por minuto. O humor aquoso circula da câmara posterior para a anterior entre a íris e a lente, através da pupila. Como a temperatura perto da córnea é menor (por estar em contato com o meio externo), gradientes térmicos produzem um fluxo unidirecional constante (convecção) da câmara posterior para a anterior (CANNING *et al.*, 2002).

A drenagem do humor aquoso ocorre por duas vias: a via convencional e a via úveo-escleral (ou não convencional, por corresponder a cerca de 10% do total drenado) (BECKER *et al.*, 2002). A via convencional é responsável pela drenagem do humor aquoso via tecidos especializados situados no ângulo irido-corneano, na junção da íris, córnea e esclera. Do interior para o exterior da câmara anterior estes tecidos são: trato trabecular, um tecido conectivo poroso; canal de Schlemm, um duto coletor constituído por um endotélio tipo vascular; e veias do plexo aquoso angular. A razão de drenagem pela fissura ciliar é comandada pela diferença entre a PIO e a pressão no interior do plexo venoso escleral (~16-20 mm Hg x 7-9 mm Hg) (RITTENHOUSE *et al.*, 2000).

2.1.4. Córnea

A face anterior da córnea é elíptica, medindo aproximadamente 12,6 mm no meridiano horizontal e, 11,7 mm no vertical. Apresenta uma espessura média de 0,520 mm na região central e de 0,650 mm ou mais, na região periférica. Sua face anterior não apresenta uma curvatura uniforme, sendo mais curva na região central e mais plana na região periférica. Apresenta um raio de curvatura médio de 7,8 mm na face anterior da região central, e de 6,6 mm na face posterior (BROWN *et al.*, 2006).

Trata-se de uma estrutura não vascularizada e sua inervação é desprovida de bainha de mielina, o que garante a sua total transparência (MULLER *et al.*, 2003). A córnea tem por funções a transparência, capacidade de refração, fotoproteção e proteção das estruturas internas oculares (MAURICE, 1957; FREEGARD, 1997; BOULTON *et al.*, 2004).

A córnea (Figura 1 – em detalhe) possui cinco camadas: (i) o epitélio; (ii) a membrana de Bowman; (iii) o estroma; (iv) a membrana de Descement e (v) o endotélio.

O epitélio (Figura 2), camada mais superficial da córnea, é responsável pela absorção de nutrientes e oxigênio, bem como proteção dos olhos (DANIELS *et al.*, 2001). Atinge aproximadamente 10% da espessura total da córnea e detém alta capacidade de regeneração (AGRAWAL *et al.*, 2003). É composto por cinco a sete outras camadas de células do tipo escamosas, estratificadas e não queratinizadas (KINOSHITA *et al.*, 2001), sendo elas: uma camada de células colunares basais, duas ou três camadas de células intermediárias e duas ou três camadas de células superficiais.

Figura 2. Secção histológica de córnea de porco, demonstrando o epitélio (EP) e parte do estroma (ST), lâmina corada com Hematoxilina-Eosina, aumento 40x. Imagem obtida no próprio laboratório.

As células mais superficiais são poligonais e achatadas, com poucas organelas citoplasmáticas. A espessura destas células é de 4 a 6 μm , na região dos núcleos, e 2 μm na periferia celular. Estas células apresentam microvilos, isto é, projeções na porção externa que determinam maior superfície de contato com a camada mucosa do fluido lacrimal (NISHIDA *et al.*, 1998). Por serem parte da camada celular em contato com o meio externo, agem como uma barreira de proteção à penetração de substâncias estranhas por meio de um complexo sistema de adesão entre as células, “*tight junctions*” ou “*zonula ocludens*”. Este sistema também previne a descamação prematura destas células (WATSKY, 1999).

As células intermediárias têm formato alongado com núcleo tipicamente ovalado, daí a designação de “aladas”. Elas se apresentam em duas ou três camadas que repousam sobre as células basais, aderentes entre si por meio de projeções citoplasmáticas periféricas denominadas desmossomos (WATSKY, 1999).

Nas camadas mais profundas as células são colunares, com 18 a 20 μm de altura e 8 a 10 μm de diâmetro. A presença de núcleos redondos e uma maior quantidade de organelas citoplasmáticas as diferenciam. Acredita-se que os grânulos de glicogênio presentes no citoplasma das células basais servem como reserva energética para a atividade mitogênica onde, em aproximadamente sete dias as células mais superficiais são repostas por outras (KINOSHITA *et al.*, 2001).

As células epiteliais corneanas têm dois mecanismos principais para adesão célula-célula e célula-matriz extracelular. O primeiro destes mecanismos envolve interações moleculares entre receptores localizados na membrana celular epitelial e ligantes de células adjacentes ou da matriz extracelular. São formados diversos tipos de ligações, entre as quais: (i) as uniões estreitas ou “*tight junctions*”, que são pontos de contato entre membranas plasmáticas de células vizinhas, formam um sistema de barreira impedindo a passagem de moléculas; (ii) “*zonula adherens*”, que são ligações intercelulares e possuem uma proteína transmembrana dependente de Ca^{++} , a caderina; (iii) as uniões comunicantes, ou “*gap junctions*”, maiores nas células basais, que formam canais de íons e moléculas hidrofílicas, ou seja, são canais porosos para comunicação e (iv) os desmossomos, que são interdigitações entre as superfícies celulares com vários componentes próprios. Os desmossomos unem as células umas às outras (KAUR *et al.*, 2002b).

O segundo mecanismo das células epiteliais corneanas para a adesão celular está representado por junções especializadas do citoesqueleto das células epiteliais e da matriz extracelular estromal, formando um complexo entre a membrana basal, a camada de Bowman e o estroma. As células da camada basal se unem à membrana basal por meio de complexos de adesão, destacando-se a presença de filamentos de queratina na zona central do citoplasma, que constituem os hemidesmossomos (BOULTON *et al.*, 2004). Estes se fixam a fibrilas de ancoragem situadas na membrana basal, compostas por colágeno VII, e que penetram na estrutura do estroma. A este nível se encontra toda uma rede de microestruturas de adesão a fim de manter unido o epitélio, que está submetido a múltiplas tensões, ao estroma.

Todas estas junções em seu conjunto formam uma forte barreira à penetração de substâncias não-lipofílicas, permitindo preferencialmente a penetração de formas não ionizadas (KINOSHITA *et al.*, 2001; MANDELL *et al.*, 2007). Estudos de perfusão foram

realizados para se estimar o tamanho dos espaços intercelulares no epitélio. Moléculas pequenas e hidrofílicas, como o glicerol (MM 92; 0,6 nm) e polietilenoglicol 200 e 400 são capazes de atravessar os espaços intercelulares do epitélio, enquanto inulina (MM 5000; 1,5 nm) e uma peroxidase (MM 40000, ~3 nm) não (JARVINEN *et al.*, 1995). Estes estudos confirmam que o epitélio corneano é a principal barreira para a passagem de fármacos (ASHTON *et al.*, 1991).

A camada de Bowman ou lâmina basal é uma camada acelular da córnea de 8 a 14 μm de espessura, formada por fibras de colágeno e proteoglicanas densamente entrelaçadas. Se lesada não se regenera, levando por consequência à perda de sua transparência. É formada a partir de células do epitélio basal, da lâmina basal, bem como de fibras do estroma anterior. A camada de Bowman tem por função manter a integridade e a organização epitelial, bem como separar o epitélio do estroma.

O estroma representa aproximadamente 90% da espessura total da córnea e é composto por fibras de colágeno e uma matriz extracelular de proteoglicanas, que são glicosaminoglicanas covalentemente aderidas a um núcleo proteico. Sua densidade celular é reduzida (menos de 3% de sua composição), contendo ceratócitos, denominados fibroblastos corneanos quando em cultura de células, e outros tipos celulares, como células do sistema imune (KURPAKUS-WHEATER *et al.*, 2001). O tecido estromal é osmoticamente ativo e atrai água para o seu interior. Desta forma, esta camada é altamente hidrofílica e porosa, permitindo a livre passagem de moléculas hidrofílicas. No entanto, o estroma age como uma verdadeira barreira à penetração de substâncias lipofílicas (SCHOENWALD, 1990). As fibrilas do estroma têm uma orientação espacial específica, com espaços interfibrilas de aproximadamente 55 a 60 nm. Em 1957, Maurice descreveu a necessidade dessa organização fibrilar para manter a transparência corneana. Para isso é preciso que esses espaços sejam cerca de dez vezes menores do que o comprimento da luz visível (400 a 700 nm). Assim, a hidratação estromal deve ser constante, de modo a não interferir no arranjo das fibras de colágeno (MAURICE, 1957).

A membrana de Descemet reveste toda a superfície do estroma. Trata-se de uma única camada de células sendo também composta por colágeno. A sua formação inicia-se aos 4 meses de gestação e a camada anterior completa-se próximo ao nascimento. Estudos têm demonstrado que a membrana de Descemet apresenta um espessamento ao longo da vida. Observa-se que embora sua camada anterior não varie significativamente, permanecendo ao redor de 3 μm , sua camada posterior chega a variar de 2 a 10 μm com o passar dos anos (STIEMKE *et al.*, 1991).

O endotélio é uma camada única de células hexagonais, medindo aproximadamente de 4 a 6 μm de altura e 20 μm de comprimento, na qual as células se dispõem em um padrão tal que, por sua semelhança, é chamado de mosaico endotelial. Quando há perda de células endoteliais, as remanescentes se "esparrramam" em direção à área lesada para ocupá-la, aumentando de tamanho (polimegatismo) e alterando a sua forma (pleomorfismo). Esse mecanismo é responsável pelo reparo do endotélio, uma vez que a mitose em células endoteliais adultas é escassa e lenta (AGRAWAL *et al.*, 2003). A integridade funcional do endotélio corneano é essencial para que seja mantido o estado de deturgescência e de transparência da córnea (GRASS *et al.*, 1988). Através da transferência ativa de sódio e de potássio, o endotélio transporta água a uma velocidade de 6,5 $\mu\text{L}/\text{cm}/\text{h}$, mantendo um estado de relativa desidratação da córnea. Para isto as células endoteliais têm núcleo grande e organelas citoplasmáticas em abundância. O suprimento de glicose é proveniente do humor aquoso, provavelmente por um mecanismo de transferência facilitada. O oxigênio também é proveniente do humor aquoso. O endotélio é rico em fosfolipídeos, permeável às substâncias lipofílicas e praticamente impermeável a íons. Estima-se que moléculas com dimensões de até 20 nm possam se difundir livremente através do endotélio sadio (JARVINEN *et al.*, 1995).

2.1.5. Filme lacrimal

A parte exposta do globo ocular é coberta por uma fina camada de fluido denominada filme lacrimal (FL). O FL possui volume de aproximadamente 7,0 μL (MATHERS *et al.*, 1996) e espessura de 7 a 40 μm (MISHIMA, 1965; TIFFANY, 1991; PRYDAL *et al.*, 1992; CREECH *et al.*, 1998). Ele é necessário para a nutrição da córnea e fornecimento de oxigênio, proteção à infecção, remoção de células mortas e materiais estranhos e para a produção de uma superfície óptica de alta qualidade (GREAVES *et al.*, 1993a).

Sua osmolalidade é dependente da quantidade de íons dissolvidos, sendo regulada principalmente pelos íons inorgânicos Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- . As proteínas, devido a sua alta massa molecular e baixa concentração, contribuem muito pouco em relação à pressão osmótica total das lágrimas (HOLLY *et al.*, 1985). A osmolalidade do filme lacrimal durante o sono varia de 280 a 293 mOsm/Kg (TERRY *et al.*, 1978). Durante o dia, quando os olhos estão abertos, devido ao processo de evaporação a pressão osmótica é continuamente aumentada numa taxa de 1.43 mOsm/Kg/h e varia de 283,3 a 318 mOsm/Kg em olhos normais (TERRY *et al.*, 1978; FARRIS *et al.*, 1981; BENJAMIN *et al.*, 1983; WHITE *et al.*,

1993a; WHITE *et al.*, 1993b). Tomlinson *et al.* (2006) fizeram um levantamento de todas as osmolalidades lacrimais reportadas na literatura entre 1978 e 2004 e obtiveram um valor médio de 302 ± 9.7 mOsm/Kg (TOMLINSON *et al.*, 2006).

O conhecimento da fisiologia lacrimal é de extrema importância no desenvolvimento de formulações para aplicação ocular tópica. Quando uma formulação hipertônica é aplicada no olho ocorre um fluxo de água da córnea em direção à superfície ocular (MISHIMA, 1965); enquanto que, no caso de uma formulação hipotônica, a permeabilidade do epitélio corneano é aumentada e ocorre um fluxo de água em direção contrária (MAURICE, 1955). Neste caso, pode ocorrer o entumescimento da córnea. Dessa forma, a administração de formulações hipo ou hipertônicas pode acarretar reações de desconforto e irritação, levando à maior produção lacrimal. Após a aplicação de uma formulação na superfície ocular, a formulação se mistura ao FL, sendo que a osmolalidade final irá depender da osmolalidade das lágrimas, da formulação e do volume de formulação aplicado. Dependendo do volume instilado, formulações com uma osmolalidade inferior a 260 mOsm/Kg e superior a 340 mOsm/Kg são irritantes aos olhos (MAURICE, 1971; LUDWIG *et al.*, 1987; BOWMAN *et al.*, 2009). Mesmo assim, a osmolalidade original do FL é reconstituída após cerca de um a dois minutos da aplicação da formulação não isotônica, dependendo do volume aplicado (LUDWIG *et al.*, 1987).

O mesmo conceito se aplica ao pH da formulação. Devido à baixa capacidade tamponante do filme lacrimal (atribuída aos íons bicarbonato, proteínas e mucinas), o pH de uma formulação para uso oftálmico deve ser próximo ao fisiológico, que é de 7,4 (VAN HAERINGEN, 1981). Mesmo o olho sendo mais capaz de tolerar soluções acídicas do que soluções básicas, formulações com $\text{pH} < 5,0$ estimulam a produção lacrimal, o que imediatamente dilui a formulação aplicada, diminuindo a concentração do fármaco e aumentando a drenagem (GREAVES *et al.*, 1993a).

O filme lacrimal é composto de três camadas, sendo elas: (i) uma camada lipídica superficial; (ii) uma camada aquosa central e (iii) uma camada basal de mucina em contato com o epitélio (Figura 3).

Figura 3. Representação esquemática do fluido lacrimal pré-corneal (Adaptado de LUDWIG, 2005).

A camada lipídica superficial possui cerca de 100 nm de espessura e é secretada no ato de piscar por glândulas presentes na pálpebra, denominadas glândulas de Meibomius e por glândulas sebáceas acessórias de Zeiss. Ela é formada por esteroides, triacilglicerol, fosfolípídeos e ácidos graxos livres. Estes lipídeos exercem um importante papel em reduzir a evaporação, mantendo a osmolaridade do fluido lacrimal (MATHERS *et al.*, 1996).

A camada aquosa é produzida pelas glândulas lacrimais principal e acessórias de Kraus e Wolfring. Esta camada transporta nutrientes solúveis em água, como glicose, uréia, retinol, ácido ascórbico e substâncias bactericidas como imunoglobulinas, lisozima, lactoferrina, β -lisina e defensinas (BAEYENS *et al.*, 1997; NAGYOVA *et al.*, 1999).

A camada de muco é intimamente associada às células epiteliais da córnea e da conjuntiva. Promove a hidratação e lubrificação por meio das microvilosidades das células epiteliais da superfície formando uma camada de gel viscoelástico com propriedades reológicas específicas. Protege o epitélio de danos físicos e facilita a movimentação das pálpebras (SHARMA, 1993; MCCLELLAN, 1997). O termo “muco” é geralmente usado para se referir a toda secreção de uma membrana mucosa, sendo que o componente principal do muco é uma glicoproteína chamada mucina. A mucina promove o espalhamento do filme lacrimal e aumenta sua estabilidade e coesão (GREAVES *et al.*, 1993a). O muco também protege os olhos de bactérias, corpos estranhos e células mortas, sendo expelido juntamente

com estes corpos estranhos para o canto dos olhos (GIPSON *et al.*, 1992). Esta camada forma, ao mesmo tempo, uma barreira à difusão de macromoléculas, e, por outro lado pode interagir com substâncias catiônicas, uma vez que a mucina possui um residual negativo de cargas (LUDWIG, 2005).

2.2. Infecções fúngicas

A infecção fúngica na córnea (ceratite fúngica ou micótica, ceratomicose) foi relatada pela primeira vez em 1879 na Alemanha, em um paciente com úlcera corneana causada por *Aspergillus* spp, sendo que, até 1951, apenas 63 casos foram descritos na literatura (SHUKLA *et al.*, 2008). Atualmente, a ceratite fúngica apresenta crescente número de casos. O padrão de distribuição varia muito de acordo com a localização geográfica e as estações do ano, fatores que determinam a prevalência de determinados agentes etiológicos. De maneira geral, a incidência tende a ser maior nas regiões tropicais e subtropicais (THOMAS, 2003), sendo os fungos mais frequentemente responsáveis pela ceratite fúngica os seguintes: *Fusarium* (20-83,6%), *Aspergillus* (16,5-75%) e *Candida* (1-63%). Enquanto o *Fusarium* e *Aspergillus* são os fungos mais comumente isolados de pacientes nos trópicos, o *Candida albicans* é o patógeno mais frequente nas regiões temperadas (GALARRETA *et al.*, 2007; SHUKLA *et al.*, 2008). Outros patógenos isolados em menor extensão incluem *Penicillium* (0,1-10%), *Curvularia* (2,64 -15,7%), *Alternaria* (0,3-5%) e *Rhizopus* (0,06-1%) (TANURE *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2001; BHARATHI *et al.*, 2003; RITTERBAND *et al.*, 2006; PANDA *et al.*, 2007; GOPINATHAN *et al.*, 2009; PEREZ-BALBUENA *et al.*, 2009; TUFT *et al.*, 2009). Um estudo conduzido no norte da China relatou que a ceratite fúngica constituiu 61,9% de todos os casos de ceratite infecciosa relatados de Janeiro de 1999 a Dezembro de 2004 (XIE *et al.*, 2006). Altas incidências desta patologia também são reportadas em outros lugares do planeta, como Índia (44%) (LECK *et al.*, 2002; GOPINATHAN *et al.*, 2002), Brasil (IBRAHIM *et al.*, 2009), Austrália (THEW *et al.*, 2008), Tailândia (38%) (SIRIKUL *et al.*, 2008), sul da Flórida (35%) (LIESEGANG *et al.*, 1980), Nepal (17%) (UPADHYAY *et al.*, 1991), Arabia Saudita (KHAIRALLAH *et al.*, 1992), e Gana (37.6%) (HAGAN *et al.*, 1995). Em climas temperados como no Reino Unido e no norte dos Estados Unidos, no entanto, a incidência da ceratite fúngica é comparativamente baixa (TANURE *et al.*, 2000; RITTERBAND *et al.*, 2006; TUFT *et al.*, 2009).

Trata-se de uma doença grave que pode levar à perda da visão se não for diagnosticada e tratada imediatamente (SHUKLA *et al.*, 2008). Independentemente da causa da ceratite, a migração de células inflamatórias para a córnea pode ser crítica para a manutenção da transparência, levando à opacificação da visão ou cegueira completa (HALL *et al.*, 1999). A alta morbidade desta condição, no entanto, não se deve somente à migração de células, mas também ao próprio dano físico causado pela presença dos fungos e às toxinas e enzimas liberadas por estes (KAUR *et al.*, 2008).

Os fungos são micro-organismos largamente encontrados na natureza. São oportunistas nos olhos, uma vez que raramente infectam tecidos oculares intactos e saudáveis. No entanto, no caso de haver algum defeito ou corte na superfície ocular eles podem penetrar a córnea e se proliferar neste tecido. Desta forma, o trauma é fator de risco mais comum (CARVALHO *et al.*, 2001; SRINIVASAN, 2004; IBRAHIM *et al.*, 2009), especialmente entre trabalhadores rurais (THOMAS, 1994; WANG *et al.*, 2009a) que estão expostos ao trauma por plantas (BHARATHI *et al.*, 2003; GODOY *et al.*, 2004) que poderiam introduzir diretamente o fungo no corte ou apenas fazer o corte que depois seria infectado pelos fungos presentes neste ambiente.

De fato, no Brasil, vários estudos epidemiológicos indicam a maior ocorrência em épocas de colheita, entre homens trabalhadores rurais (BHARATHI *et al.*, 2003; GODOY *et al.*, 2004). O trauma por materiais vegetais acontece frequentemente durante o corte da cana-de-açúcar ou a colheita do café, culturas presentes em abundância no sudeste brasileiro. Na maioria das vezes o diagnóstico é feito tardiamente e, provavelmente devido às dificuldades de acesso aos serviços de saúde por esta população, muitos casos não chegam a ser reportados para elaboração de estatísticas.

Outro fator de risco, em países industrializados, é o uso de lentes de contato (ALFONSO *et al.*, 2006). Uma hipótese sugere que o atrito entre lentes de contato e a córnea produza uma pequena abrasão na superfície do epitélio que aumentaria a adesão de micro-organismos (KLOTZ *et al.*, 1989; KLOTZ *et al.*, 2000). A *Candida* é o principal agente etiológico da ceratite fúngica associado com o uso de lentes de contato, embora casos por fungos filamentosos têm sido reportados (RAO *et al.*, 2007; AHEARN *et al.*, 2008). Recentemente houve um aumento epidêmico em diferentes partes do mundo de ceratite por *Fusarium* associada ao uso de uma solução para lentes de contato (CHANG *et al.*, 2006; KHOR *et al.*, 2006; GORSCAK *et al.*, 2007; GAUJOUX *et al.*, 2008).

Fatores de risco menos frequentes incluem o uso prolongado de corticosteroides (TANURE *et al.*, 2000; TUFT *et al.*, 2009) e antibióticos, algumas doenças sistêmicas como diabetes mellitus (GRANADOS *et al.*, 2004), doenças imunossupressivas (RITTERBAND *et al.*, 2006), quimioterapia prolongada (KRISHNAN *et al.*, 2009), cirurgia ocular prévia (MENDICUTE *et al.*, 2000) e doenças crônicas na superfície ocular (RITTERBAND *et al.*, 2006). Alguns autores sugerem que principalmente nos estágios iniciais da doença a resposta inflamatória do hospedeiro é decisiva quanto à progressão da infecção (SRINIVASAN, 2004).

O diagnóstico da ceratite fúngica é difícil de ser realizado, uma vez que a maioria dos sintomas não são específicos, tais como: dor, fotofobia, diminuição da visão e vermelhidão (NAYAK, 2008). Outro problema é que determinadas espécies produzem sintomas parecidos com infecções bacterianas. O diagnóstico preciso é feito através da cultura de material retirado da base da úlcera corneana (FLORCRUZ *et al.*, 2008).

O fungo, na córnea, produz reação inflamatória insidiosa e traduzida por infiltrado esbranquiçado ou branco acinzentado, apresentando lesões finas ou granulares, de localização intraepitelial ou estromal e pouca reação celular de câmara anterior. O epitélio pode ficar elevado, intacto ou ulcerado (Figura 4). A evolução da lesão faz com que os fungos se aprofundem nos tecidos corneanos aumentando a área de necrose, às vezes mais profundamente deixando a superfície íntegra. O curso da doença normalmente é lento (KLOTZ *et al.*, 2000), mas excepcionalmente podem ser encontrados fungos rapidamente progressivos, com perfuração de córnea e endoftalmite. Pode ser desenvolvida uma reação imunológica na presença de antígenos fúngicos provocando a formação de um anel imunológico. A presença de lesão corneana com margens hifadas, epitélio elevado e aspecto seco são muito comuns em casos de ceratite por fungos filamentosos (KLOTZ *et al.*, 2000; THOMAS, 2003).

Figura 4. Ceratite fúngica: (A) lesão corneana com bordas hifadas, epitélio elevado e presença de anel imunológico e (B) lesão corneana com margens hifadas (SRINIVASAN, 2004).

Somente no Departamento de Oftalmologia da Universidade Federal de São Paulo, entre 1996 e 2002 foram reportados 152 casos de ceratite fúngica, sendo a maioria causada por *Fusarium* sp (44,6%), seguida por *Candida albicans* (16,4%) (GODOY *et al.*, 2004). Os fungos filamentosos, como *Fusarium* sp, estão associados ao trauma com vegetal, enquanto os fungos levediformes são tipicamente encontrados em pacientes com doença ocular ou sistêmica prévia (SALERA *et al.*, 2002).

Carvalho *et al.* (2001) realizaram um estudo etiológico com 49 pacientes portadores de ceratite fúngica no Serviço de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná, entre 1983 e 1997. Os resultados demonstraram, ao contrário do esperado, incidência da infecção uniforme nos diferentes meses do ano, com semelhante número de casos nas quatro estações. Em 71,5% dos casos houve indicação de realizar-se evisceração (retirada total do conteúdo interno do globo ocular), devido à ineficiência dos tratamentos existentes. Os fungos mais incidentes foram: *Fusarium* sp (32%), *Aspergillus* sp. (16,5%), *Penicillium* sp. (10%), *Candida* sp. (4,0%) e outros não identificados.

Salera *et al.* (2002) publicaram uma análise retrospectiva dos prontuários de 20 pacientes (20 olhos) com ceratite fúngica, confirmada por cultura de células, durante o período de janeiro de 1994 a dezembro de 1999 em Belo Horizonte, MG. Um dos fatores associados analisado foi o trauma ocular (60%). O fungo mais frequentemente isolado foi o *Fusarium* sp (60%), seguido pelo *Aspergillus* sp (30%). Natamicina foi o antifúngico mais frequentemente utilizado no tratamento tópico. No que diz respeito ao tratamento sistêmico, a droga mais utilizada foi o cetoconazol. Os autores relataram que houve necessidade de realização de ceratoplastia penetrante terapêutica em 70% dos casos. O transplante corneano é indicado com o objetivo de remover o tecido envolvido e preservar a integridade do globo, mas, ainda assim, os fungos podem permanecer nas bordas do tecido corneano ou na câmara anterior levando a recidivas da infecção micótica. Neste estudo houve recidiva da infecção na córnea transplantada em 50% dos casos. Em um caso foi necessário o recobrimento conjuntival parcial e em outro caso, recobrimento total.

2.3. O Fluconazol

O fluconazol (FLU) é um antifúngico do grupo tiazol (Figura 5) largamente utilizado no tratamento de micoses. Trata-se de um fármaco estável, hidrossolúvel, com baixa toxicidade e massa molar relativamente pequena (MM 306,27) (FROMTLING, 1988). Sua eficácia contra uma grande variedade de fungos patogênicos é reconhecida (YEE *et al.*, 1997).

Figura 5. Estrutura química do fluconazol.

Várias vias têm sido utilizadas na administração ocular do FLU, como: tópica (SODHI *et al.*, 2003; BEHRENS-BAUMANN *et al.*, 1990; HOLGADO *et al.*, 1993; SONEGO-KRONE *et al.*, 2006; CHUNG *et al.*, 2007; TU, 2009), subconjuntival (YILMAZ *et al.*, 2005), intravítrea (SU *et al.*, 1999) e sistêmica (AKLER *et al.*, 1995; AVUNDUK *et al.*, 2003; SHAH *et al.*, 2008).

Avunduk *et al.* (2003) demonstraram *in vivo* a eficácia do FLU aplicado oralmente e topicamente contra ceratite causada por *Aspergillus*. Akler *et al.* (1995) utilizaram FLU oral (100-200 mg diariamente por dois meses) no tratamento de endoftalmite por *Candida*. Yilmaz & Maden (2005) realizaram um estudo clínico e concluíram que injeções subconjuntivas de FLU foram efetivas no tratamento de ceratite fúngica em 12 de 13 casos estudados.

Chung *et al.* (2007) reportaram um caso de ceratite fúngica secundária após diagnóstico de esclerite. Além do tratamento com antibióticos, foi utilizado itraconazol oral (100 mg/dia) e fluconazol tópico (0,2%) administrado a cada hora. Apesar de este tratamento ter sido eficaz na eliminação dos patógenos, as chances de recuperação da visão da paciente foram consideradas pequenas (CHUNG *et al.*, 2007).

Behrens-Baumann *et al.* (1990) demonstraram a eficácia de uma solução de FLU 0,2% aplicada topicamente a cada hora (oito horas ao dia em 24 dias) em coelhos infectados por *Candida albicans*. Os autores concluíram que o fluconazol tópico foi igualmente efetivo nas córneas desbridadas ou não, demonstrando boa permeação do fármaco através do epitélio intacto. No entanto, esta conclusão pode ser atribuída ao fato de os autores terem utilizado *Candida albicans* como fungo modelo em seu experimento. A concentração inibitória mínima (MIC) necessária para inibir o crescimento de *Candida albicans* é baixa, portanto, a MIC pode ter sido facilmente atingida, mesmo com o epitélio intacto (BEHRENS-BAUMANN *et al.*, 1990).

Em um estudo realizado no Paraguai concluiu-se que a terapia oral para o tratamento da ceratite fúngica não levou a melhores resultados clínicos que a terapia tópica. Neste estudo, 23 pacientes infectados receberam solução de FLU 0,2%, administrada a cada hora. Destes, 11 pacientes receberam concomitantemente terapia oral com cetoconazol (400 mg/dia). Em 16 pacientes (70%) a terapia foi efetiva após 6 semanas. Um total de 7 pacientes (30%) não respondeu à terapia, sendo que, destes, 4 foram submetidos a evisceração. Os autores relacionaram a falha da terapia, nestes casos, ao estágio avançado da infecção, com a presença de úlceras profundas. Eles concluíram que o fármaco não foi capaz de atingir concentrações terapêuticas apropriadas nas camadas mais internas (SONEGO-KRONE *et al.*, 2006).

Em um estudo recente foram obtidos lipossomas compostos por fosfatidilcolina de soja e colesterol contendo FLU. Estudos *in vivo* em modelo animal de ceratite fúngica por *Candida albicans* revelaram que as formulações contendo lipossomas foram capazes de curar os coelhos em tempo menor que soluções aquosas do fármaco (HABIB *et al.*, 2008a; HABIB *et al.*, 2008b).

Os estudos apresentados mostram que o FLU é um fármaco importante no tratamento da ceratite fúngica, no entanto, sua eficácia parece estar relacionada com a concentração atingida no local da infecção: o tratamento oral por dois meses, as injeções subconjuntivais e lipossomas contendo FLU parecem ter apresentado melhores resultados que a aplicação tópica de uma solução do fármaco e, nos casos em que a terapia tópica se mostrou efetiva, foram necessárias várias aplicações em curtos intervalos de tempo. Como o FLU é um fármaco hidrossolúvel, de massa molecular relativamente pequena, sua administração ocular poderia se tornar viável a partir de uma formulação para uso tópico, que promovesse a permeação do ativo sem a necessidade de repetidas administrações.

2.4. Administração ocular de fármacos

Depois da pele, os olhos são a segunda via mais acessível para administração tópica de fármacos, podendo-se objetivar ação local, na superfície ou nas camadas mais profundas. No entanto, o maior problema da terapia tópica é a baixa absorção ocular (KAUR *et al.*, 2002a).

A baixa biodisponibilidade ocular de fármacos a partir de uma forma farmacêutica se deve principalmente aos fatores de perda pré-corneais, que incluem a dinâmica lacrimal, o curto tempo de permanência da formulação no saco conjuntival e a relativa impermeabilidade da córnea (GEROSKI *et al.*, 2001; GHATE *et al.*, 2006). A administração tópica de uma formulação estimula os mecanismos fisiológicos de proteção, como a produção lacrimal. A maior produção lacrimal acarreta (i) a diluição da formulação; (ii) o reflexo de piscar, acelerando a drenagem pelas vias lacrimais; (iii) a ligação do fármaco a proteínas presentes nas lágrimas, reduzindo a porcentagem de fármaco livre para penetração e, conseqüentemente, a biodisponibilidade do ativo (KAUR *et al.*, 2002a).

Devido a estas perdas, as soluções oftálmicas contêm frequentemente altas concentrações do fármaco para manter, quando administradas topicamente, uma dosagem terapêutica no conteúdo lacrimal ou no sítio de ação. No entanto, o uso frequente de altas concentrações pode levar a efeitos tóxicos indesejáveis e danos às células da superfície ocular (SALMINEN, 1990; URTTI *et al.*, 1993; HOLLANDER *et al.*, 2004).

Além disso, fármacos administrados sistemicamente a fim de exercerem ação ocular, também possuem baixa biodisponibilidade por causa das barreiras fisiológicas que limitam a entrada de fármacos da circulação sanguínea para as estruturas internas do globo ocular. Estas barreiras incluem a barreira hemato-aquosa (regula as trocas entre o sangue e humor aquoso) e hemato-retiniana (particularmente restritiva, permite apenas a penetração de algumas substâncias de interesse metabólico) (BARAR *et al.*, 2008). Conseqüentemente, a terapia sistêmica também requer grandes doses do fármaco para atingir a córnea em concentrações adequadas, o que pode resultar em efeitos colaterais sistêmicos (SCHALENBURG *et al.*, 2002). Injeções intra ou perioculares poderiam diminuir a exposição sistêmica, no entanto, apesar de comumente empregadas em casos severos da doença, apresentam sérias desvantagens. Fármacos administrados pela via intravítrea são rapidamente eliminados pelos processos naturais de circulação, de modo que repetidas injeções são necessárias. Dessa forma, altas concentrações são utilizadas, acarretando problemas de toxicidade local. Além disso, são descritas reações como desconforto, dor, aumento de pressão intraocular,

sangramento intraocular, risco de infecção aumentado e possível descolamento da retina, sendo a endoftalmite a mais relevante complicação de injeções intravítreas, que pode levar a severa perda de visão (MOSHFEGHI *et al.*, 2003; CUNNINGHAM *et al.*, 2008; DEL AMO *et al.*, 2008).

Portanto, devido a essas barreiras anatômicas e fisiológicas, apenas uma pequena porção do fármaco incorporado na formulação é realmente absorvida. Neste sentido, é necessária a realização de mais pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de formulações mais adequadas à aplicação oftalmológica. O presente trabalho pretende, portanto, estudar e obter duas formulações para a aplicação tópica do FLU: um gel termorreversível e micropartículas contendo o fármaco. Estas formulações serão desenvolvidas na tentativa de se aumentar o tempo de retenção da formulação e consequentemente a biodisponibilidade do fármaco. Além disso, o efeito da iontoforese será estudado, na tentativa de se promover a quantidade de FLU permeado através da córnea.

2.4.1. Géis Termorreversíveis

Sistemas de liberação com prolongado tempo de residência na superfície ocular, como pomadas e suspensões, têm sido desenvolvidos no sentido de aumentar a biodisponibilidade de fármacos (SIEG *et al.*, 1975; LEE *et al.*, 1986). Entretanto, estes sistemas apresentam várias desvantagens que limitam a adesão dos pacientes ao tratamento. As pomadas, por exemplo, são oleosas e “embaçam” a visão (ZIMMER *et al.*, 1995; SIMAMORA *et al.*, 1998). Assim, atualmente, as pesquisas são voltadas ao desenvolvimento de sistemas que sejam fáceis de administrar, requeiram menor frequência de administração e proporcionem liberação controlada e possivelmente sustentada do fármaco, de maneira a aumentar a eficácia terapêutica e adesão dos pacientes.

Hidrogéis são redes de ligações cruzadas de polímeros hidrofílicos com capacidade de absorverem grandes quantidades de água e intumescerem, mantendo sua estrutura tridimensional. Moléculas de diferentes tamanhos podem se difundir para dentro e para fora de sua estrutura, o que permite seu possível uso como sistema de liberação de fármacos. Como sistemas de liberação ocular, espera-se que os hidrogéis promovam tempo de retenção prolongado, baixa perda pré-corneal e fácil administração, em comparação a suspensões e pomadas (ANUMOLU *et al.*, 2009). As propriedades viscoelásticas dos hidrogéis poderiam

resultar em força mecânica suficiente para resistir à drenagem lacrimal, consequentemente, aumentando o tempo de retenção (KIM *et al.*, 2002).

Os hidrogéis podem ser pré-formados (KECIK *et al.*, 1993; BURGALASSI *et al.*, 1996; HSIUE *et al.*, 2001) ou formados *in situ* (MIYAZAKI *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2004; ANUMOLU *et al.*, 2009; YIN *et al.*, 2010). Hidrogéis pré-formados são simplesmente soluções viscosas (KECIK *et al.*, 1993) ou filmes (HSIUE *et al.*, 2001), os quais já são sistemas estruturados antes da administração. Normalmente, tais sistemas não possuem propriedades mecânicas de dureza suficientes para resistirem aos mecanismos de drenagem e, portanto, oferecem um aumento apenas transitório do tempo de retenção da formulação (ANUMOLU *et al.*, 2009).

Os sistemas geleificantes *in situ* são líquidos no momento da administração e sofrem transição de fase de modo a formar um gel viscoelástico em resposta a mudanças de ambiente como temperatura (MIYAZAKI *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2004; YIN *et al.*, 2010), pH (KUMAR *et al.*, 1994) e composição eletrolítica (COHEN *et al.*, 1997; BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2003). Os sistemas geleificantes *in situ* são atrativos como sistemas de liberação ocular devido à facilidade de administração como um líquido, o que assegura cobertura ocular rápida e completa. Eles também possibilitam dosagens exatas e reprodutíveis, em contraste aos géis pré-formados (LE BOURLAIS *et al.*, 1998).

Géis termorreversíveis, ou termosensíveis, devem ser, portanto, líquidos na temperatura ambiente e geleificarem na temperatura fisiológica. Miller & Donovan (1982) foram os primeiros a mencionarem o uso destes sistemas na liberação ocular de fármacos (MILLER *et al.*, 1982).

O poloxamer é um tensoativo sintético, não tóxico, anfifílico, não iônico, composto por blocos hidrofílicos de poli-(óxido de etileno) (POE) e hidrofóbicos de poli-(óxido de propileno) (POP) em cadeias na forma de tribloco ($OE_a-OP_b-OE_a$) (Figura 6), com a propriedade de geleificação termorreversível (ou termo-sensível) (WEI *et al.*, 2002) que tem sido extensivamente investigado como sistema geleificante *in situ* (MAYO *et al.*, 2008; HARTIKKA *et al.*, 2008; COLLAUD *et al.*, 2008; JONES *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009b). Este polímero forma micelas em solução aquosa que podem formar um gel viscoso dependendo da temperatura e da concentração de polímero utilizadas (JUHASZ *et al.*, 1989). Dependendo da massa molecular e da proporção relativa de POE e POP os poloxamers exibem diferentes propriedades geleificantes (HENRY *et al.*, 1989).

Figura 6. Estrutura química do poloxamer.

Apesar de serem bastante empregados, a principal desvantagem de tais sistemas é possuírem baixa força mecânica (pouca dureza), o que leva à rápida erosão (EL KAMEL, 2002). Uma abordagem interessante, no entanto, consiste em misturar poloxamers com outros polímeros, como carbopol (QI *et al.*, 2007) e alginato (LIN *et al.*, 2004). O carbopol, um polímero mucoadesivo, é capaz de aumentar a dureza da formulação e, devido às suas propriedades mucoadesivas também aumentar o tempo de retenção. No entanto, o carbopol também apresenta geleificação com aumento de pH acima do seu pKa, de aproximadamente 5,5. Portanto, para uma formulação polimérica binária constituída por poloxamer e carbopol possuir características de solução nas condições ambientes e permitir fácil administração ocular, seria necessário manter o pH da formulação abaixo de 5,5. Tal característica ácida poderia estimular a superfície ocular provocando secreção lacrimal e reflexo de piscar, aumentando a drenagem (LIN *et al.*, 2004).

Já a quitosana é um polímero biodegradável (PANGBURN *et al.*, 1982), de origem natural, que tem demonstrado excelente compatibilidade ocular (ALONSO *et al.*, 2003; DE SALAMANCA *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2009). É facilmente obtida pela deacetilação da quitina, um polímetro largamente encontrado na natureza (DODANE *et al.*, 1998). Em sua estrutura química possui grupamentos amina carregados positivamente (Figura 7) que podem interagir com os resíduos negativos da camada de muco, conferindo à quitosana propriedades mucoadesivas (HASSAN *et al.*, 1990; LEHR *et al.*, 1992; MAKHLOF *et al.*, 2008). O maior benefício da utilização de quitosana seria, no entanto, sua propriedade de promotor de absorção de fármacos (DI COLO *et al.*, 2004; MAJUMDAR *et al.*, 2008; DI COLO *et al.*, 2008). De fato, encontram-se na literatura vários estudos a respeito da utilização da quitosana para este fim (ALONSO *et al.*, 2003; ZAMBITO *et al.*, 2006; FOGERT *et al.*, 2007). Inicialmente estas propriedades eram atribuídas à modulação das junções intercelulares do epitélio: por possuir cargas positivas, acredita-se que a quitosana interaja com as membranas celulares provocando reorganização estrutural das proteínas relacionadas às

juncões intercelulares, o que é seguido pela facilitação da permeação do fármaco pela rota intercelular (ARTURSSON *et al.*, 1994; SCHIPPER *et al.*, 1997). Mais recentemente, Dodane e colaboradores (DODANE *et al.*, 1999), utilizando células Caco-2, concluíram que a quitosana promove a permeação afetando ambas rotas inter e intracelulares de maneira reversível, sem afetar a viabilidade celular.

Figura 7. Estrutura química da quitosana.

Estas propriedades mucoadesivas e de promoção da absorção de fármacos seriam extremamente úteis em uma formulação oftálmica para aumentos do tempo de residência da formulação e da permeação do fármaco. Neste caso, o intervalo de administração poderia ser prolongado, o que, consequentemente aumentaria a adesão do paciente à terapia (NANJAWADE *et al.*, 2007).

Soluções de quitosana têm sido utilizadas com sucesso para prolongar o tempo de retenção e aumentar a permeação de fármacos (FELT *et al.*, 1999). A combinação deste polímero com o poloxamer seria promissora, uma vez que a força mecânica da formulação seria maior que a de qualquer um destes polímeros sozinhos. De fato, combinações específicas de quitosana e poloxamer para a liberação ocular de timolol foram recentemente estudadas (GUPTA *et al.*, 2007). Foi demonstrado que tal combinação resulta em uma formulação clara, não irritante e passível de esterilização. No entanto, neste estudo as concentrações de ambos os polímeros foram muito pequenas (de 7 a 14 % p/v de poloxamer e apenas 0,25 e 0,5 % p/v de quitosana). Nestas condições a quitosana não foi utilizada para a melhoria das propriedades mecânicas da formulação. Além disso, determinações essenciais como a temperatura exata de geleificação, propriedades mecânicas e mucoadesivas em função da concentração de quitosana não foram realizadas.

2.4.2. Micropartículas

Partículas poliméricas vêm sendo recentemente estudadas para a liberação controlada de fármacos. Tais partículas recebem denominações diferentes dependendo do seu diâmetro; podem ser micropartículas (1-1000 μm) ou nanopartículas (1-1000 nm). Dependendo da maneira em que o fármaco encontra-se distribuído, podem ainda ser classificadas em nano/microcápsulas, caso o fármaco esteja encapsulado pelo material polimérico, ou nano/microesferas, caso esteja uniformemente disperso na matriz polimérica (GAUDANA *et al.*, 2009).

O tamanho ideal de partícula depende de diversos fatores, sendo o principal deles a via de administração. Para administração intravítrea, por exemplo, as micropartículas seriam mais vantajosas que as nanopartículas, uma vez que as últimas, por permanecerem suspensas na cavidade vítrea, frequentemente têm sido relacionadas ao embaçamento da visão (HSU, 2007), enquanto que as primeiras se sedimentariam, não comprometendo a transparência do humor vítreo (MAURICE, 2001; DEL AMO *et al.*, 2008). Para a administração ocular tópica, uma maior retenção no saco conjuntival também é esperada para as micropartículas, desde que não excedam o diâmetro de 5 a 10 μm , o que poderia causar desconforto ao paciente (CHIANG *et al.*, 2001; KAUR *et al.*, 2004; BIN CHOY *et al.*, 2008).

Os sistemas nano/microparticulados, em geral, oferecem inúmeros benefícios como solubilização de ativos, aumento de biodisponibilidade, proteção da molécula do fármaco de degradação física, química ou biológica e consequente aprimoramento ou alteração da farmacocinética (DATE *et al.*, 2007). Nano/micropartículas têm-se mostrado sistemas eficientes para a liberação ocular de fármacos, uma vez que podem reduzir os efeitos tóxicos sistêmicos ou locais em comparação com os sistemas convencionais, que utilizam altas concentrações de ativo. Além disso, comparando-se com colírios convencionais que são rapidamente drenados, os sistemas nano/microparticulados podem atingir maior tempo de residência tanto em estruturas internas como na superfície ocular, promovendo assim, aumento local da disponibilidade do fármaco. Após sua administração tópica, as partículas se localizam no saco conjuntival e a liberação do fármaco pode ser iniciada pela degradação ou erosão da partícula ou pela difusão do fármaco através da matriz, dependendo da natureza do polímero, se biodegradável ou inerte (PIGNATELLO *et al.*, 2002b).

Dentre os polímeros que vêm sendo usados na confecção de nano/micropartículas para administração ocular, destacam-se: o poli (ácido láctico – co glicólico) (PLGA) (GAVINI *et al.*, 2004; AYALASOMAYAJULA *et al.*, 2005; HACHICHA *et al.*, 2006; BIN CHOY *et al.*,

2008), a poli (ϵ -caprolactona) (PCL) (CALVO *et al.*, 1997; SINHA *et al.*, 2004), o poli (ácido lactic) (PLA) (KOMPELLA *et al.*, 2003) e o Eudragit[®] (BUCOLO *et al.*, 2002; PIGNATELLO *et al.*, 2002a; PIGNATELLO *et al.*, 2002b; AL KASSAS, 2004; BUCOLO *et al.*, 2004).

Eudragit[®] RS e RL são copolímeros de poli(etilacrilato, metil-metacrilato e clorotrimetil amonio etil metacrilato), contendo grupos amônio quaternários entre 4,5 a 6,8% e 8,8 a 12% para as formas RS e RL, respectivamente (Figura 8). Ambos são insolúveis em meio aquoso no pH fisiológico, mas capazes de sofrerem intumescimento (HAZNEDAR *et al.*, 2004). Estes polímeros vêm sendo largamente utilizados na encapsulação de fármacos para administração oral (GIBSON *et al.*, 2006; GENC *et al.*, 2006; JAVOT *et al.*, 2009; CRUZ *et al.*, 2009; KREJCOVA *et al.*, 2009) e também para vias alternativas como na confecção de “patches” transdérmicos (VERMA *et al.*, 2000; KOTIYAN *et al.*, 2001; RAFIEE-TEHRANI *et al.*, 2001). Recentemente alguns anti-inflamatórios não esteroidais (flurbiprofeno e ibuprofeno) foram nanoencapsulados com Eudragit[®] RS e RL e as nanosuspensões avaliadas em modelo animal como sistemas de liberação oftálmica. Foram observadas maiores concentrações de fármaco no humor aquoso mesmo contendo menor quantidade total de fármaco nas formulações, em comparação com colírios convencionais disponíveis no mercado (PIGNATELLO *et al.*, 2002a; PIGNATELLO *et al.*, 2002c). Nano/micropartículas destes polímeros contendo gentamicina (SAFWAT *et al.*, 2002; AL KASSAS, 2004), piroxicam (ADIBKIA *et al.*, 2007) e aciclovir (DANDAGI *et al.*, 2009) também foram descritas como sistemas de liberação ocular.

Figura 8. Estrutura química do polímero Eudragit[®] RS 100.

A encapsulação de agentes antifúngicos em sistemas nano/microparticulados tem sido feita com o objetivo de se modificar a farmacocinética destes agentes, resultando em tratamentos mais eficientes com menos efeitos colaterais. Dentre os agentes antifúngicos estudados estão o itraconazol (CHOI *et al.*, 2009), o voriconazol (PENG *et al.*, 2008) e a anfotericina B, sendo esta última o antifúngico mais estudado devido a sua alta nefrotoxicidade (ESPUELAS *et al.*, 1997; ESPUELAS *et al.*, 2002; BUCOLO *et al.*, 2004; SANGEETHA *et al.*, 2007; TIYABOONCHAI *et al.*, 2007; REN *et al.*, 2009; ITALIA *et al.*, 2009; AMARAL *et al.*, 2009). Apesar de até o presente momento não haver registros da aplicação destes sistemas no tratamento de infecções fúngicas oculares, eles têm sido estudados no tratamento de infecções fúngicas em outros órgãos apresentando resultados promissores.

Desta forma, micropartículas de fluconazol poderiam oferecer diversas vantagens para o tratamento da ceratite fúngica. No presente trabalho optou-se por estudar a permeação do FLU através da córnea a partir de micropartículas de Eudragit[®], por este polímero demonstrar boa compatibilidade ocular, além de conferir boas propriedades mecânicas e de estabilidade às partículas (PIGNATELLO *et al.*, 2002b; BUCOLO *et al.*, 2004). Outro fator a se considerar é o baixo custo do Eudragit[®] em comparação a outros polímeros (como o PLGA, por exemplo), fator principalmente importante para a possível produção industrial em larga escala. O fato do Eudragit[®] possuir residual de carga positivo também pode contribuir para o aumento do tempo de residência da formulação na superfície ocular, que possui residual de carga negativo (BUCOLO *et al.*, 2004).

2.4.2.1. Métodos de obtenção das micropartículas

Diversos métodos são descritos na literatura para preparação de nano e micropartículas, dentre eles encontram-se métodos químicos de polimerização interfacial e polimerização *in situ*, métodos físico-químicos de coacervação simples e complexa, emulsificação e evaporação do solvente e métodos físicos de revestimento, extrusão e secagem por *spray drying*.

A técnica do *spray drying* é a mais empregada na obtenção de micropartículas poliméricas. Por esta técnica, um gás aquecido é utilizado para secar gotículas da formulação que são aspergidas quando passam sob pressão pelo bico atomizador do aparelho (Figura 9) (CHAN *et al.*, 2003; TEWA-TAGNE *et al.*, 2007).

Figura 9. Representação esquemática de um *spray dryer* (adaptado de CHAN *et al.*, 2003).

O *spray drying* é extensivamente usado no campo farmacêutico por permitir a preparação de pós secos com características específicas de tamanho e forma de partícula. Este método é bastante confiável e reprodutível, sendo as partículas obtidas geralmente bastante esféricas, com boa eficiência de encapsulação e rendimento de processo (RASSU *et al.*, 2008). Micropartículas de Eudragit[®] contendo aciclovir para liberação ocular, por exemplo, foram eficientemente preparadas por *spray drying* (CORTESI *et al.*, 2007). Também Rassu *et al.* (2008) prepararam micropartículas de cetoprofeno em Eudragit[®] por *spray drying* e obtiveram micropartículas esféricas, com alta eficiência de encapsulação e rendimento de processo acima de 50% (RASSU *et al.*, 2008).

Além disso, por *spray drying*, a encapsulação, formação de complexos e até mesmo polimerização ocorrem em um passo único e simples. Isso traz vantagens como rapidez do processo (GENC *et al.*, 2006), possibilidade de modular características físico-químicas dos pós resultantes, além de flexibilidade e potencial de transposição de escala. Trata-se também de um processo barato, se comparado a outros existentes (TEWA-TAGNE *et al.*, 2007). Entretanto, alguns problemas encontrados são eficiência de coleta, que pode comprometer o rendimento do processo, e instabilidade quando se trabalha com materiais termossensíveis. Outro problema é o grande número de variáveis que, além da formulação, podem alterar as

propriedades as partículas produzidas por *spray drying* (CHAN *et al.*, 2003). Cada variável de processo é crítica, o que explica algumas dificuldades encontradas por alguns autores.

A temperatura do ar de secagem, fluxo de alimentação, porcentagem de pós na formulação e razão fármaco:polímero são parâmetros que podem alterar as propriedades das partículas (GIUNCHEDI *et al.*, 1995). A formulação líquida a ser secada varia de acordo com as propriedades do fármaco que se deseja encapsular e do polímero, os quais podem estar dispersos no líquido na forma de solução, dispersão coloidal ou suspensão. A possibilidade de se usar uma suspensão consiste em outra vantagem do *spray dryer* em relação a outros métodos de produção de partículas, pois, uma vez que não há a necessidade de solubilização completa, é possível se optar pelo uso de solventes menos tóxicos, como o etanol. Por exemplo, Bolourtchian *et al.* (2005) obtiveram micropartículas de Eudragit® RS contendo ibuprofeno pelo método de emulsão e evaporação do solvente utilizando o clorofórmio como solvente orgânico (BOLOURTCHIAN *et al.*, 2005). Mesmo sabendo-se que estes solventes podem ser removidos pela evaporação, devido à sua alta toxicidade, torna-se necessário avaliar criteriosamente a presença de resíduos de solvente nas partículas, principalmente visando-se liberação ocular. Como o Eudragit® RS pode ser encontrado disperso em formulação aquosa (Eudragit® RS 30D) ou preparado em solução hidroalcoólica, é possível produzir micropartículas deste polímero por *spray drying* sem a adição de solventes tóxicos.

2.4.3. Iontoforese: princípios básicos

Outra técnica promissora para liberação controlada de fármacos é a iontoforese (aplicação de uma corrente elétrica fraca). Esta técnica vem sendo extensivamente investigada desde o século XX. Estudos *in vitro* (GREEN *et al.*, 1991; LI *et al.*, 2001) e *in vivo* em animais (GELFUSO *et al.*, 2008) têm demonstrado que a iontoforese aumenta a penetração e absorção de fármacos. Além disso, ela tem sido utilizada para a liberação de fármacos através de vários epitélios, como mucosa (MURTHY *et al.*, 1973), pele (LOPEZ *et al.*, 2001; LOPEZ *et al.*, 2003a; LOPEZ *et al.*, 2003b; LOPEZ *et al.*, 2004; GELFUSO *et al.*, 2008), cérvix (SCHAEFFER *et al.*, 1971), unhas (DUTET *et al.*, 2009; NAIR *et al.*, 2009; HAO *et al.*, 2009b) e olhos (CHURCH *et al.*, 1992; SARRAF *et al.*, 1994; YASUKAWA *et al.*, 2004; HAO *et al.*, 2009a) no tratamento de várias patologias.

Na iontoforese, a corrente elétrica de baixa intensidade é fornecida por uma fonte ou baterias e distribuída com o auxílio de um eletrodo positivo (ânodo) e um eletrodo negativo

(cátodo) (LOPEZ *et al.*, 2001; LOPEZ *et al.*, 2003a; LOPEZ *et al.*, 2003b). Os eletrodos convencionalmente usados em iontoforese são os de Ag e AgCl. Eles não causam variação de pH, pois suas trocas eletroquímicas ocorrem a uma voltagem inferior à necessária para a eletrólise da água (PANCHAGNULA *et al.*, 2000; KALIA *et al.*, 2004).

Um dispositivo iontoforético é composto por dois compartimentos: um compartimento no qual o fármaco é aplicado, contendo eletrodo de mesma polaridade e um compartimento de retorno, contendo eletrodo com polaridade oposta que deve ser aplicado em qualquer lugar do corpo, de forma a completar o circuito. Desta maneira, o fármaco com carga serve como condutor de corrente através do tecido. A formulação que o contém deve sempre ser hidrofílica, para permitir a passagem da corrente elétrica.

A Figura 10 ilustra a aplicação de um potencial elétrico e o deslocamento da corrente elétrica pelo circuito. Na superfície do eletrodo positivo (ânodo), a Ag perde um elétron e reage com o Cl^- da solução formando AgCl insolúvel que fica depositado no eletrodo, e esse elétron que transporta a corrente até o cátodo é responsável pela redução do eletrodo de AgCl (negativo). No ânodo, os cátions presentes na solução, inclusive o fármaco com carga positiva, são repelidos durante a passagem da corrente elétrica e migram em direção à pele. Ao mesmo tempo os íons endógenos, por exemplo Cl^- , são transportados para o ânodo. Já no cátodo, ânions são repelidos em direção à pele e, para compensar essa perda, cátions migram da pele em direção ao cátodo (KALIA *et al.*, 2004; GRATIERI *et al.*, 2008).

Figura 10. Iontoforeses utilizando sistema de eletrodos de Ag/AgCl. O ânodo contém um fármaco ionizável D^+ e seu contra-íon A^- e Na^+Cl^- (adaptado de KALIA *et al.*, 2004).

Existem várias análises detalhadas sobre os mecanismos envolvendo o fenômeno iontoforético e o transporte das moléculas de fármaco, sendo os dois mais aceitos, a eletrorrepulsão e a eletrosmose (MARRO *et al.*, 2001; GRATIERI *et al.*, 2008). A eletrorrepulsão refere-se ao movimento ordenado de íons na presença de uma corrente elétrica aplicada ao meio (Figura 11A). A eletrosmose refere-se ao fluxo de um volume de solvente e movimentação de cargas quando uma diferença de potencial elétrico é aplicada em uma membrana biológica (Figura 11B). Isto se deve ao fato de membranas biológicas como a pele (pI entre 4 e 4,5) (MERINO *et al.*, 1997) ou a córnea (pI = 3,2) (ROJANASAKUL *et al.*, 1989) se encontrarem negativamente ionizadas em pH fisiológico, favorecendo o transporte de cátions e dificultando o de ânions. Sendo assim, a aplicação de um campo elétrico induz o movimento de um certo volume de solvente do ânodo para o cátodo e este impulso é transferido para as moléculas neutras presentes no sistema. Portanto, o fluxo de solvente ou fluxo eletrosmótico faz com que: (i) moléculas neutras possam ser liberadas por iontoforese através do ânodo (LOPEZ *et al.*, 2003a) e (ii) os cátions se beneficiem desta segunda força adicional à eletrorrepulsão (GUY *et al.*, 2000).

Figura 11. Esquema do fluxo eletrorrepulsivo (A) e do fluxo eletrosmótico (B) (GRATIERI *et al.* 2009).

2.4.3.1. Iontoforese ocular

O cientista alemão Wirtz documentou o uso da iontoforese em oftalmologia em 1908 no tratamento de ulcerações na córnea (FISCHER, 2005). Porém, os dispositivos então projetados para estudos em animais não eram padronizados e muitas vezes apresentavam-se inconvenientes para uso em humanos. Isto dificultava a reprodutibilidade dos resultados

obtidos após administração iontoforética de diversos ativos (SARRAF *et al.*, 1994). Os primeiros dispositivos danificavam frequentemente o tecido devido a alta corrente elétrica aplicada (300- 600 mA/cm²).

Atualmente, a iontoforese ocular pode ser dividida em iontoforese transescleral e transcorneana (Figura 12). Esta última, aplicada através da córnea, é capaz de liberar maiores concentrações de fármaco na câmara anterior dos olhos, enquanto que a iontoforese aplicada na esclera é capaz de liberar o fármaco através da íris e cristalino e atingir o humor vítreo (ERLANGER, 1954; ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2005). Esta técnica representa, portanto, uma alternativa para as injeções subconjuntivais, intracorneais e intravítreas, com menor risco de infecções e traumas (MOLOKHIA *et al.*, 2009). Ela é capaz de promover, com boa aceitação pelo paciente, a liberação do fármaco em maior quantidade e mais rapidamente (alguns minutos) que os sistemas passivos de liberação (JADOUL *et al.*, 1999). Outros aspectos importantes são a garantia de que a dosagem vai ser respeitada, além da baixa variabilidade biológica paciente/paciente, devido ao controle da liberação proporcionado pela corrente elétrica.

Figura 12. Ilustração esquemática da distribuição de fármaco a partir da iontoforese transcorneal e transescleral (adaptado de ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2006).

A aplicação da iontoforese através da córnea vem sendo investigada, inclusive, para a liberação de macromoléculas, como oligonucleotídeos (ASAHARA *et al.*, 2001; VOIGT *et al.*, 2002; BERDUGO *et al.*, 2003). Um estudo recente demonstrou que macromoléculas de

até 70 kDa foram eficientemente liberadas através da córnea por iontoforese, sendo este método mais efetivo que a eletroporação (HAO *et al.*, 2009a). A iontoforese também vem sendo investigada para a liberação de diversos outros compostos com menor massa molecular, como ciprofloxacino (VAKA *et al.*, 2008), fosfato de dexametasona (ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2005), tobramicina (MAURICE, 1989) e vancomicina (CHOI *et al.*, 1988).

Dispositivos iontoforéticos modernos e específicos para liberação ocular de fármacos têm sido desenvolvidos e patenteados (FISCHER, 2005). A IOMED desenvolveu recentemente um dispositivo de iontoforese escleral chamado OcuPhorTM (Iomed Company, www.iomed.com, 2005), que é descartável e possível de ser utilizado em consultório oftalmológico.

Outros sistemas encontram-se, atualmente, em diferentes fases de estudos clínicos, tais como o Eyegate[®] (Eyegate Pharma, França) (Figura 13), que está sendo testado para o transporte de fármacos visando o tratamento de retinopatia diabética, degeneração macular e retinite pigmentosa (www.eyegatepharma.com) e o Visulex (Aciont Inc., EUA), que está sendo testado para o tratamento de uveíte posterior empregando-se, como fármaco, o fosfato sódico de dexametasona (HASTINGS *et al.*, 2004).

Figura 13. Sistema de liberação iontoforética Eyegate[®]. A) Compartimento doador, B) Dispositivo inserido no olho humano e C) O eletrodo de retorno é colocado na testa do paciente (<http://www.eyegatepharma.com>).

Yoo *et al.* (2002) relatou um caso em que a iontoforese foi aplicada com o auxílio do dispositivo Eyegate[®] para liberação de miconazol no tratamento de ceratite fúngica. Uma corrente total de 1 mA foi utilizada por 4 min. O paciente revelou desconforto quando o dispositivo foi inserido, mas não notou o início de passagem da corrente. A iontoforese transcorneana mostrou-se segura neste caso, no entanto, informações sobre a penetração do

fármaco e eficiência da terapia não foram obtidas, uma vez que o paciente teve de ser submetido a uma ceratoplastia penetrante (YOO *et al.*, 2002). De fato, a iontoforese tem se mostrado segura para o uso ocular. Parkinson *et al.* (2003) realizaram um estudo de tolerância em humanos utilizando 24 indivíduos saudáveis que foram submetidos a iontoforese transescleral de uma solução salina. As sessões foram bem toleradas, sem alterações clínicas significativas, quando uma corrente de 0 a 3,0 mA por 20 min ou 1,5 mA por 40 min foi aplicada.

A grande maioria dos estudos publicados recentemente sobre a iontoforese ocular são estudos clínicos (YOO *et al.*, 2002). Apesar do vasto conhecimento que se obteve na última década sobre os exatos mecanismos de promoção da permeação de moléculas por iontoforese através da pele, não é possível afirmar que os mesmos mecanismos se aplicam à córnea, devido às diferenças fisiológicas desses tecidos. Assim, no presente trabalho pretende-se estudar o efeito da iontoforese na penetração ocular do FLU e os mecanismos envolvidos na promoção desta permeação.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é obter e caracterizar formulações tópicas para a administração ocular do fluconazol (FLU) e avaliar o efeito da iontoforese na penetração ocular deste fármaco a partir dessas formulações.

3.1. Objetivos específicos

- Validar a metodologia para quantificação do FLU por CLAE;
- Determinar as características físico-químicas do FLU;
- Desenvolver e caracterizar uma formulação geleificante “*in situ*” com propriedades mucoadesivas para incorporação do FLU;
- Obter e caracterizar micropartículas contendo FLU;
- Desenvolver e validar uma célula de difusão para os experimentos *in vitro* de permeação passiva e iontoforética;
- Avaliar a integridade da córnea na célula de difusão desenvolvida por 6 h de experimento;
- Estudar a liberação do FLU a partir de diferentes géis e soluções aquosas contendo 0,2% de fármaco;
- Estudar *in vitro* a permeação e retenção na córnea de FLU a partir de diferentes géis e soluções aquosas contendo 0,2% de fármaco;
- Estudar *in vitro* a permeação e retenção na córnea de FLU a partir das micropartículas obtidas dispersas em solução aquosa e na melhor formulação de gel termorreversível previamente desenvolvido;
- Estudar *in vitro* a influência da iontoforese na permeação e retenção ocular do FLU a partir de solução aquosa e dos sistemas desenvolvidos;
- Estudar *in vivo* a cinética de permeação através das córnea do FLU a partir do melhor sistema obtido;
- Avaliar em humanos o tempo de retenção na superfície ocular da melhor formulação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

O FLU utilizado neste trabalho (99,9% de pureza) foi obtido da Galena Química e Farmacêutica Ltda. (Campinas, Brasil). A quitosana MMW (190,000-310,000 Da; 75-85% deacetilação), a mucina tipo III, o diacetato de fluoresceína e a fluoresceína sódica foram adquiridas da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). O Poloxamer 407 foi adquirido da Embrapharma (São Paulo, Brasil). O Eudragit® RS 30D foi cordialmente cedido pela Evonik (Darmstadt, Alemanha). Todos os outros reagentes possuíam grau cromatográfico. Água deionizada (Milli-Q Millipore Simplicity 185, Bedford, MA, USA) foi utilizada no preparo de todas as soluções.

4.1.1. Córnea

As córneas utilizadas nos experimentos *in vitro* foram obtidas de olhos de porco coletados imediatamente após o abatimento do animal e previamente aos procedimentos de escaldagem (Frigorífico Pontal Ltda, Pontal, SP, Brazil). Os olhos foram então mantidos a aproximadamente 4°C enquanto transportados para o laboratório, onde as córneas foram dissecadas e utilizadas de 1 a 2 h após enucleação. Após cuidadosa observação a olho nu, qualquer olho com a câmara anterior danificada foi descartado.

4.1.2. Animais de laboratório

Coelhos brancos machos New Zealand (2,0-2,4 Kg) foram adquiridos no Biotério Central do Câmpus da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram criados e utilizados nos experimentos de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo CEUA- Comissão de Ética no uso de animais de experimentação. Os experimentos realizados com estes animais foram aprovados por este Comitê de Ética (Processo nº 06.1.90.53.8 - anexo 1).

4.2. Métodos

4.2.1. Padronização da metodologia analítica para quantificação do FLU por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O FLU foi quantificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Modelo LC10-AD, Shimadzu) e detecção espectrofotométrica (Modelo SPD-A, Shimadzu).

4.2.1.1. Condições cromatográficas

As amostras de FLU, em solução de tampão Hepes ($\text{pH } 7,4 \pm 0,01$), foram analisadas por CLAE, de acordo com o método desenvolvido no próprio laboratório. Utilizou-se como fase estacionária uma coluna de fase reversa C_{18} (LichroCART[®] RP– C_{18} (5 μm) 125 x 4mm, Merck) , fase móvel água milliQ: acetonitrila:metanol; (80:15:5 v/v), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção correspondente a 50 μL , detecção a λ 210 nm. Foi utilizado forno na coluna cromatográfica na temperatura de 30 °C.

4.2.1.2. Determinação do comprimento de onda (λ) de absorção do FLU

Foram feitas varreduras de soluções de FLU, a 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, em espectrofotômetro (modelo U-3501, Hitachi), na faixa de 190 a 700 nm.

O λ referente ao máximo de absorção do fármaco foi escolhido para detecção do FLU após separação na coluna cromatográfica.

4.2.1.3. Determinação da curva analítica do FLU

Foram preparadas, em triplicata, soluções de FLU em tampão Hepes ($\text{pH } 7,4 \pm 0,01$), nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$. Essas soluções foram analisadas por CLAE (item 4.2.1.1).

4.2.1.4. Validação do método analítico

A metodologia analítica utilizada para a quantificação do FLU foi validada, avaliando-se os parâmetros analíticos de (i) especificidade, (ii) linearidade, (iii) precisão e (iv) exatidão (ICH, 2005).

4.2.1.4.1. Especificidade (estudo dos interferentes)

A especificidade do método foi avaliada “contaminando-se” uma solução aquosa de FLU com as seguintes amostras:

- a) tampão Hepes pH 7,4, isotônico;
- b) córnea triturada;
- c) solução contendo humor aquoso;

Para contaminação da solução aquosa, a córnea (amostra *b*) foi primeiramente picotada, adicionada de 5,0 mL de água, e triturada com auxílio de um homogeneizador de tecidos (Turratrec TE-102, Tecnal) por um minuto, formando uma suspensão, e filtrada. Em seguida 100 µL deste “filtrado de córnea” foi misturado a 100 µL de uma solução aquosa de FLU a 10 µg/mL. Da mesma forma, 100 µL de tampão Hepes (amostra *a*) e de humor aquoso retirado de olhos de porco (amostra *c*) foram misturados a 100 µL de solução aquosa de FLU a 10 µg/mL. As amostras após a contaminação foram analisadas por CLAE e os picos referentes ao FLU foram comparados com o pico obtido a partir de solução aquosa contendo FLU 5 µg/mL.

4.2.1.4.2. Linearidade

A fim de se verificar a linearidade do método analítico foram preparadas, em triplicata, soluções de FLU em tampão Hepes (pH 7,4 ± 0,01), nas concentrações de 0,1; 1,0; 2,0; 4,0; 20; 40 e 200 µg/mL. Essas soluções foram analisadas por CLAE (item 4.2.1.1).

A partir dos resultados encontrados, foram construídas as curvas analíticas relacionando a área dos picos (eixo das abscissas) *versus* suas respectivas concentrações (eixo das ordenadas). A análise estatística dos dados foi obtida pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressa pela equação de primeira ordem $y = ax + b$, em que (a) corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta, e (b) corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de intersecção da reta com o eixo das abscissas. A faixa linear foi calculada utilizando o coeficiente de correlação linear (r) = 0,99.

4.2.1.4.3. Precisão e Exatidão

Para a determinação da precisão e exatidão intra dia, a curva padrão foi injetada em triplicata. Três soluções aquosas (tampão Hepes pH 7,4) foram contaminadas com 0,5; 5,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$ de FLU e injetadas três vezes em um mesmo dia. A precisão intra dia foi calculada a partir do coeficiente de variação entre os pontos injetados. A exatidão intra dia (E%) foi calculada a partir das concentrações mensurada e teórica.

Para a determinação da precisão e exatidão inter dia, o mesmo procedimento foi tomado sendo que as amostras foram injetadas 3 vezes, por três dias consecutivos.

Os resultados de precisão foram expressos matematicamente através do coeficiente de variação (CV%), segundo a Equação I:

$$\text{CV\%} = (\text{desvio padrão} / \text{média}) \times 100 \quad (\text{Equação I})$$

Os resultados de exatidão foram expressos matematicamente (E%), aplicando-se a Equação II:

$$\text{E\%} = (\text{valor mensurado} / \text{valor teórico}) \times 100 \quad (\text{Equação II})$$

4.2.1.4.3.1. Teste de Recuperação- exatidão

Alíquotas da amostra de concentração teórica 1 $\mu\text{g/mL}$ em meio aquoso foram adicionadas de alíquotas de solução padrão (10 $\mu\text{g/mL}$) em balões volumétricos de 10 mL

completando-se o volume com tampão Hepes pH $7,4 \pm 0,1$, conforme a Tabela a seguir (Tabela 1):

Tabela 1. Quantidade de solução padrão de FLU (mL) adicionada a cada amostra no teste de recuperação.

Quantidade (mL) de amostra (1 µg/mL)	Quantidade (mL) de padrão (10 µg/mL)	Cp _(teórico) (µg/mL)
-	5,00	
5,00	1,00	1,5
5,00	2,00	2,5
5,00	3,00	3,5
5,00	-	

Cp(teórico) = a concentração teórica da amostra adicionada de padrão

A porcentagem de recuperação (%R) para cada amostra foi calculada de acordo com a Equação III:

$$\%R = \frac{Cp - Ca}{Pad} \times 100 \quad (\text{Equação III})$$

Em que: *Cp* = a concentração da amostra adicionada de padrão
Ca = a concentração da amostra sem padrão
Pad = a concentração de padrão adicionada na amostra

4.2.1.4.3.2. Teste de Recuperação do FLU a partir da córnea

Primeiramente foram preparados três homogeneizados de córnea com o auxílio de uma tesoura e um bisturi. Esses homogeneizados (~ 0,3 g) foram então transferidos a tubos de ensaio e adicionados de 100 e 50 µL de uma solução de FLU em álcool absoluto (500 µg/mL). O álcool foi então evaporado e 5 mL de tampão Hepes, pH 7,4 foram adicionados a cada tudo para a extração do FLU. A mistura foi levada a um homogeneizador de tecidos por 30 segundos, filtrada e quantificada por CLAE (item 4.2.1.1). Os experimentos foram realizados em triplicata.

A porcentagem de FLU quantificada em relação à quantidade total adicionada foi considerada como sendo a porcentagem de recuperação.

Como controle foi feita uma curva analítica a partir de diferentes alíquotas (10, 25, 50, 75 e 100 µL) de solução de FLU em álcool absoluto (500 µg/mL) submetidas ao processo de secagem e ressuspensão com tampão Hepes, a fim de se evidenciarem quaisquer erros no processo.

4.2.1.4.4. Limite de quantificação

Para a obtenção do limite de quantificação (LQ) empregaram-se concentrações de FLU correspondentes a 0,01; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030 e 0,50 µg/mL, as quais foram analisadas por CLAE (item 4.2.1.1).

Os resultados foram então analisados e o LQ obtido através de duas metodologias distintas e complementares propostas pelo ICH (2005): (i) o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis é considerado o limite de quantificação. No presente trabalho foi considerado aceitável $CV < 5 \%$; e (ii) através de cálculos baseados na curva de calibração utilizando a Equação IV:

$$LQ = (DP \times 10) / ic \quad (\text{Equação IV})$$

Em que: DP = o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de várias curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.
ic = a inclinação da curva de calibração.

4.2.1.4.5. Limite de detecção

Para a obtenção do limite de detecção (LD), empregaram-se concentrações de FLU correspondentes a 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5 µg/mL, as quais foram analisadas por CLAE (item 4.2.1.1).

O LD foi considerado o menor pico detectável (3 vezes maior que a linha de base). Segundo metodologia proposta pelo ICH (2005) pode também ser expresso pela Equação V:

$$LD = (DP \times 3,3) / ic \quad (\text{Equação V})$$

Em que: DP = o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de várias curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.
ic = a inclinação da curva de calibração.

4.2.2. Caracterização dos parâmetros físico-químicos do FLU

4.2.2.1. Solubilidade

A fim de se determinar a solubilidade do FLU em água foram preparadas três suspensões contendo 8, 6 e 4 mg/mL de fármaco. Essas suspensões foram submetidas à agitação intensa, bem como permaneceram sob aquecimento em banho de ultrassom por 30 min. Foram resfriadas à temperatura de aproximadamente 25 °C e a seguir filtradas em filtros de 0.45 µm de diâmetro de poro. O filtrado foi então diluído 2000 vezes para quantificação por CLAE (item 4.2.1.1).

4.2.2.2. Determinação do coeficiente de partilha óleo/água ($K_{O/A}$)

O coeficiente de partilha octanol/água do fluconazol foi determinado baseando-se no método proposto por Lopez *et al.* (2000). Previamente à partição, a fase aquosa (água) foi saturada com o mesmo volume de octanol. Para tanto, a mistura foi agitada por uma noite em agitador magnético a 400 rpm. As fases aquosa e oleosa foram separadas em funil de separação e centrifugadas a 3000 rpm por 10 min.

Preparou-se então 10 mL de uma solução de FLU a 10 µg/mL com a água saturada com octanol. Uma alíquota desta solução foi retirada e quantificada (C_1). Em seguida, 5 mL desta solução foi adicionada de 5 mL de octanol saturado com água e agitada por 30 min. Após esse período, a fase aquosa foi retirada, centrifugada por 10 min e a concentração do fármaco (C_2) aí presente determinada por CLAE como descrito no item 4.2.1.1. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O FLU presente na fase aquosa foi quantificada antes (C_1) e depois da partilha (C_2), e o $K_{O/A}$ determinado segundo a Equação VI:

$$K_{O/A} = \frac{C_1 - C_2}{C_2} \quad (\text{Equação VI})$$

4.2.2.3. Determinação do coeficiente de partilha córnea/água ($K_{\text{córnea/água}}$) e córnea/solução lacrimal ($K_{\text{córnea/sq lacrimal}}$) (SCHEUPLEIN *et al.*, 1969)

Amostras de córnea (0,3 g) foram picotadas e colocadas em contato com 5 mL das seguintes soluções: (i) solução de FLU em água ($K_{\text{córnea/água}}$) a 200 $\mu\text{g/mL}$ e (ii) solução de FLU em solução semelhante ao conteúdo lacrimal (0,67% NaCl, 0,2% NaHCO_3 , 0,008% $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) (MIYAZAKI *et al.*, 2001) a 200 $\mu\text{g/mL}$ ($K_{\text{córnea/sq lacrimal}}$). Essas suspensões foram submetidas à agitação por aproximadamente 12 horas (mesa agitadora para 15 provas, modelo MB 01.15, Marte), a seguir agitadas em agitador de tubos (modelo AP56, Phoenix) por 2 min e filtradas. Para análise por CLAE foram feitas as diluições necessárias.

Os coeficientes de partilha foram determinados através da equação descrita no item 4.2.2.2.

4.2.3. Gel termorreversível

Para a incorporação do FLU e aplicação tópica ocular foi proposta uma formulação constituída pela mistura de dois polímeros: poloxamer 407 e quitosana. A concentração adequada de cada polímero na formulação foi determinada através de um processo de triagem, no qual a primeira etapa foi a verificação da temperatura de geleificação de diversas formulações. Nesta e em todas as outras triagens subsequentes, soluções contendo apenas um dos polímeros e também solução aquosa foram utilizadas como controles.

4.2.3.1. Determinação da temperatura de geleificação

Foi determinada a temperatura de transição solução/gel ($T_{\text{sol/gel}}$) de soluções hidrofílicas de poloxamer contendo diferentes concentrações deste polímero (14, 16, 18 e 20 % m/m) através de ensaios reológicos com solicitações oscilatórias utilizando um reômetro Carri-Med CSL 100 da T.A. Instruments® e varredura de temperatura com o auxílio de um dispositivo “Peltier”. Foi utilizada geometria cone - placa, com 40 mm de diâmetro e 1° de inclinação em relação à placa. Cada amostra foi cuidadosamente aplicada à placa inferior

assegurando o mínimo cisalhamento e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão introduzida antes da análise) de 5 min antes de cada determinação.

Primeiramente, a região viscoelástica linear (RVL) foi investigada através de um aumento da tensão oscilatória (“*torque sweep*”) a uma frequência fixa. A RVL foi identificada como a região onde a tensão e a deformação foram diretamente proporcionais e o módulo de estocagem, ou elástico (G'), permaneceu constante. Uma deformação dentro da RVL coincidente na amostra menos consistente (solução de poloxamer 14% a 15 °C) e na amostra mais consistente (gel poloxamer 20% a 50°C) foi selecionada para todas as análises subsequentes.

A varredura de temperatura foi conduzida através da faixa de 15 a 50 °C, com incrementos de temperatura de 10 °C/min, seguindo a aplicação de uma tensão constante e frequência de 1,0 Hz. O módulo elástico (G'), o módulo viscoso ou de perda (G''), a viscosidade dinâmica (η') e a tangente de perda ou viscosa ($\tan \delta$) foram então determinados utilizando o programa Rheology Advantage (T.A. Instruments®). As análises foram realizadas em, no mínimo, três replicatas para cada formulação.

Em termos reológicos um gel é definido como um material cujo G' é consideravelmente maior que o G'' em uma larga faixa de frequência, resultando em um pequeno ângulo de fase δ ($\tan \delta = G''/G'$) (ROSSMURPHY *et al.*, 1986; ALMDAL *et al.*, 1993).

Neste trabalho, a $T_{\text{sol/gel}}$ foi definida como a temperatura na qual G' é igual à G'' , refletindo similar propriedade elástica e viscosa (“ $G'G''$ crossover”) (DUMORTIER *et al.*, 1991) e foi calculada para as formulações que tiveram aumento significativo da viscosidade dinâmica com o aumento da temperatura (geleificação).

A concentração que conferiu uma $T_{\text{sol/gel}}$ adequada para aplicação oftálmica em países quentes como o Brasil ($T_{\text{sol/gel}} > 30^\circ\text{C}$) foi utilizada nos estudos subsequentes.

Foi verificado o efeito da adição de diferentes concentrações de quitosana (0,5; 0,75; 1,0; 1,25; e 1,5%) na $T_{\text{sol/gel}}$ da formulação. As soluções contendo apenas quitosana foram analisadas como controle. Foi verificado também, por fim, o efeito da adição de FLU (0,2%) na $T_{\text{sol/gel}}$ da formulação.

4.2.3.2. Análise reológica oscilatória

As amostras selecionadas com $T_{\text{sol/gel}}$ adequada foram submetidas à análise reológica, realizada nas temperaturas de 25 e 35°C utilizando um reômetro Carri-Med CSL 100 da T.A. Instruments® e os parâmetros descritos anteriormente (item 4.2.3.1.). Nestas análises a temperatura foi mantida constante. As solicitações oscilatórias foram feitas na faixa de frequência de 0,1 a 10 Hz e a amplitude máxima da tensão de cisalhamento aplicada foi de 0,1 Pa, obtida a partir da RVL. O G' e o G'' foram utilizados como medidas do comportamento reológico. As análises foram realizadas em, no mínimo, três replicatas para cada formulação. Foram também feitas análises reológicas dos controles (formulação contendo apenas poloxamer 16%, e soluções de quitosana em diferentes concentrações).

Realizou-se também análise reológica das formulações poliméricas binárias (poloxamer 16% e diferentes concentrações de quitosana) misturadas a uma solução semelhante à solução lacrimal na razão de 50:7 a fim de mimetizar a condição drástica *in vivo* em que toda formulação aplicada (50 μL) se misturaria imediatamente ao filme lacrimal (7 μL).

4.2.3.3. Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva

A força mucoadesiva das formulações poliméricas foi avaliada *in vitro* através da medida da força necessária para remover a formulação a partir de um disco de mucina (JONES *et al.*, 1997; BRUSCHI *et al.*, 2007) utilizando uma máquina universal de teste Instron® adaptada (KIM *et al.*, 2002) como ilustrado na Figura 14.

Inicialmente, o disco de mucina foi preparado pela compressão de mucina suína crua (250 mg), utilizando um anel de compressão com um diâmetro de 9 mm.

O disco foi fixado horizontalmente na extremidade inferior da prova cilíndrica (1 cm de diâmetro) com uma fita dupla-face. Em seguida, o disco de mucina foi hidratado pela submersão em uma solução aquosa de mucina 5% (p/p) por 30 s. O excesso de líquido na superfície do disco foi removido com o auxílio de um papel absorvente. Na temperatura de 35°C, uma amostra da formulação, previamente acondicionada em frasco de vidro cilíndrico e raso, foi colocada sob a prova analítica, a qual foi abaixada até que o disco de mucina entrasse em contato com a superfície da amostra. A velocidade de abaixamento da prova analítica foi controlada de forma que a força envolvida no contato do disco de mucina com a formulação

não ultrapassasse 1N. O disco e a formulação permaneceram em contato por 30 s. A prova foi então levantada com uma velocidade constante de 1,0 mm/s e a força necessária para remover o disco de mucina da formulação foi determinada a partir da curva força pelo tempo. Para todas as formulações as medidas foram realizadas em, no mínimo, três replicatas.

Figura 14. Esquema do teste *in vitro* de mucoadesão: (A) prova cilíndrica (1cm de diâmetro), disco de mucina (9 mm de diâmetro) e amostra (35 °C) ; (B) Disco de mucina em contato com a formulação (30 s) e (C) Prova cilíndrica movida para cima (1 mm/s) até o rompimento entre o disco e a formulação.

4.2.3.4. Análise do perfil de textura

O método empregado para caracterizar as propriedades mecânicas de cada formulação foi a análise do perfil de textura (APT) das formulações utilizando um analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems®), no modo de força em compressão, de acordo com Jones *et al.* (1997).

As formulações foram acondicionadas em frascos idênticos de 50 mL a uma altura fixa, evitando-se a introdução de bolhas de ar. Foi utilizada uma prova analítica cilíndrica de 35 mm de diâmetro comprimida no interior da amostra com velocidade de 1,0 mm/s, profundidade de 10 mm e velocidade de retorno de 10 mm/s. As análises foram realizadas em, no mínimo, cinco replicatas em cada temperatura (25 e 35°C).

A partir do gráfico resultante da força (N) versus tempo(s) (Figura 15), diversas propriedades mecânicas puderam ser calculadas, incluindo: (i) dureza (N) (força máxima necessária para atingir uma determinada deformação); (ii) firmeza ($\text{N} \cdot \text{mm}^{-1}$) (“gel strength”- razão entre a força exercida para a penetração da prova e a distância, ou profundidade, penetrada por esta prova em um determinado tempo); (iii) compressibilidade ($\text{N} \cdot \text{mm}$) (trabalho necessário para deformar o produto durante uma primeira compressão, dado pela

área do pico de compressão) e (iv) adesividade (N.mm) (o trabalho necessário para superar as forças de atração entre a superfície da amostra e a superfície da prova, dada pela área do pico negativo seguido à compressão).

Figura 15. Curva típica de análise do perfil de textura (APT): (A1) compressibilidade; (A2) adesividade.

4.2.4. Micropartículas

4.2.4.1. Obtenção de micropartículas contendo o FLU

A microencapsulação do FLU utilizando o polímero Eudragit[®] foi realizada pela técnica de *spray drying*. Assim, soluções contendo determinadas quantidades de Eudragit[®] RS 30D e FLU foram obtidas dissolvendo-se ambos os componentes em uma solução hidroalcoólica etanol: água (90:10). 500 mL de cada uma das soluções foram levados ao mini *spray dryer* (Labmaq, modelo MSD 0.5), onde passaram a um fluxo de 5 mL/min por um bico atomizador pressurizado de 1,2 mm de diâmetro com ar de atomização a 40 L/min. O fluxo de ar quente de secagem foi utilizado numa taxa de 5 m³/min e a temperatura de saída do ar foi de 90°C. As quantidades de Eudragit[®] e FLU em cada uma das soluções que passaram pelo processo de secagem estão descritas na Tabela 2.

As micropartículas obtidas em cada um dos experimentos foram então caracterizadas de acordo com o rendimento do processo de obtenção e distribuição do tamanho de partícula. Com base nestes parâmetros, os melhores sistemas obtidos foram escolhidos e procedeu-se então às caracterizações quanto à morfologia, à eficiência de encapsulação do fármaco e potencial zeta.

Tabela 2. Quantidade de fármaco (FLU) e polímero (Eudragit®) por 100 mL de cada uma das soluções secas por *spray drying*.

Sistema	Quantidade de FLU (g)	Quantidade de Eudragit® (g)	Proporção fármaco:polímero
MP01	1,00	1,00	1:1
MP02	0,50	1,50	1:3
MP03	0,350	1,750	1:5
MP04	0,175	1,750	1:10

4.2.4.2. Rendimento do processo

As micropartículas obtidas por *spray drying* foram pesadas e o rendimento do processo foi calculado como porcentagem em função da quantidade de sólidos adicionados durante o processo de preparação (PARIKH *et al.*, 2003), segundo a Equação VII:

$$R\% = \left(\frac{Q_i}{Q_f} \right) \times 100 \quad (\text{Equação VII})$$

Em que: $R\%$ = rendimento do processo;

Q_i = quantidade de sólidos adicionados durante o processo de preparação; e

Q_f = quantidade de micropartículas obtidas no final do processo.

4.2.4.3. Distribuição de tamanho

A distribuição de tamanho de partículas foi determinada por difração a laser em um Beckman Coulter LS 13 320 (Beckman Coulter Particle Characterization, Miami, FL). Para tanto, 1 mg das micropartículas obtidas foram suspensas em 2 mL de solução aquosa de poloxamer 0,5 % e estas suspensões foram levadas ao aparelho para análise.

4.2.4.4. Morfologia

A morfologia das micropartículas obtidas foi verificada por sua análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Desta forma, amostras de cada um dos sistemas microparticulados obtidos foram metalizadas com ouro e analisadas em MEV (Modelo XL 30 FEG, Philipps) num aumento de 2000 a 50000 vezes.

4.2.4.5. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada avaliando-se a quantidade de FLU encapsulada nas micropartículas de Eudragit[®]. Assim, 10 mg de cada uma das micropartículas obtidas (Tabela 2) foram dispersos em 5 mL de etanol sob agitação em vórtex por 2 min. A dispersão foi deixada então por 10 min em banho de ultrassom, e a solução obtida foi diluída em água (1:10) e quantificada por CLAE-UV (item 4.2.1.1.), obtendo-se a quantidade encapsulada de FLU ($Q_{\text{mensurada}}$). Os experimentos de eficiência de encapsulação foram feitos em triplicata. A eficiência de encapsulação foi calculada a partir da Equação VIII:

$$EE\% = \left(\frac{Q_{\text{mensurada}}}{Q_{\text{teórica}}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação VIII})$$

Em que: $EE\%$ = eficiência de encapsulação de FLU na micropartícula;

$Q_{\text{mensurada}}$ = quantidade de FLU extraído das micropartículas de Eudragit[®]; e

$Q_{\text{teórica}}$ = quantidade de FLU que teoricamente estaria presente em 10 mg das micropartículas.

4.2.4.5.1. Eficiência real de encapsulação

Para se determinar a quantidade de fármaco dentro da matriz polimérica, ou seja, para se excluir a quantidade de fármaco que poderia estar na superfície da partícula e prontamente disponível em solução após a dispersão das partículas (“*burst effect*”), 5 mg de partículas foram dispersas em 10 mL de solução aquosa contendo poloxamer 0,5 % (a fim de facilitar a dispersão das partículas) e levadas a banho de ultrassom por 5 min. Após este tempo a dispersão foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min e o sobrenadante (livre de partículas) quantificado. A ausência de partículas no sobrenadante foi confirmada por difração a laser

(Zetasizer Nano ZS, Malvern, USA). Os experimentos foram feitos em triplicata. A porcentagem real de encapsulação foi calculada de acordo com a Equação IX:

$$E_R \% = 100 - \left(\frac{Q_{mensurada}}{Q_{encap}} \times 100 \right) \quad (\text{Equação IX})$$

Em que: $E_R\%$ = eficiência de encapsulação real de FLU na micropartícula;

$Q_{mensurada}$ = quantidade de FLU presente no sobrenadante; e

Q_{encap} = quantidade de FLU que estaria presente em 5 mg das micropartículas, calculado pelo EE% obtido anteriormente.

4.2.4.6. Potencial zeta

Aproximadamente 1 mg das micropartículas MP03 foi suspenso em uma solução aquosa contendo poloxamer 0,5% (m/m). O potencial zeta das micropartículas suspensas foi determinado por dispersão de luz com o auxílio de um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK).

4.2.5. Iontoforese

4.2.5.1. Eletrodos

Os eletrodos utilizados nos experimentos de iontoforese foram os eletrodos de prata (Ag) e cloreto de prata (AgCl) confeccionados no próprio laboratório (GREEN *et al.*, 1991). Com o auxílio de um bico de Bunsen, em um cadinho de porcelana, foi fundida uma quantidade de cloreto de prata (AgCl) suficiente para mergulhar um pequeno fio de prata com a ponta dobrada conforme a Figura 16. Após a imersão do fio de prata, este foi retirado completamente coberto com cloreto de prata solidificado. Desta maneira foi obtido o eletrodo negativo (cátodo).

Figura 16. Procedimento para a cobertura do eletrodo de prata com cloreto de prata. O eletrodo é dobrado (1) e mergulhado (2) em um cadinho com o cloreto de prata fundido. Após a retirada do eletrodo e a solidificação do cloreto de prata nele depositado (3) o eletrodo está pronto para o uso (SIMONETTI, 2004).

Para o preparo do eletrodo positivo (ânodo), uma solução salina de 5,78 M NaCl foi utilizada para reduzir o AgCl, com o auxílio de um pedaço de fio de platina e a passagem de corrente elétrica (0,3 mA). O terminal positivo do gerador foi conectado em um pedaço de fio de platina e o terminal negativo foi conectado no eletrodo de AgCl, que foi reduzido em Ag, através da passagem de uma corrente elétrica de 0,3 mA por 24 horas (Figura 17).

Figura 17. Preparo do ânodo (eletrodo +) em solução salina (5,78mM NaCl) e com corrente elétrica (0,3 mA) por 24 horas (SIMONETTI, 2004).

4.2.5.2. Corrente total e densidade de corrente.

No decorrer dos experimentos de iontoforese as correntes elétricas utilizadas foram de 0,3 e 0,6 mA, mantidas constantes e contínuas por 6 h. Para isso foi utilizado o gerador Kepco Power Supply, modelo APH 500DM. A densidade da corrente, em função da área exposta, foi de 0,5 e 1,0 mA/cm², respectivamente. Para garantir o mínimo de íons necessários para carregar a corrente elétrica por 6 h de experimento foi necessário adicionar NaCl na formulação doadora, segundo a Equação X:

$$T = \frac{i(A) \times t(s)}{F(C)} \quad (\text{Equação X})$$

Em que: T = número de mols necessários para transportar a corrente elétrica;
 i = corrente elétrica contínua e constante;
 t = tempo em segundos; e
 F = constante de Faraday = 96500 C.

Sendo assim, na iontoforese a 0,3 mA foram adicionados 67,15 mM de NaCl na formulação contendo o fármaco. A quantidade de NaCl utilizada foi o dobro quando se aplicou o dobro da corrente.

4.2.5.3. Estabilidade do FLU após aplicação da corrente elétrica

Antes da realização dos experimentos de iontoforese verificou-se o impacto da corrente elétrica sobre a estabilidade do fármaco. Para isso, 10 mL de soluções aquosas contendo 0,2% (p/p) de FLU e 67,15 mM de NaCl foram preparadas e analisadas em quintuplicata antes e após serem submetidas a uma corrente elétrica de 0,6 mA por 6 h. A análise quantitativa das amostras foi feita por CLAE (item 4.2.1.1.).

4.2.6. Estudos *in vitro* de liberação e permeação passiva e iontoforética

4.2.6.1. Células de difusão e condições dos ensaios

A fim de se determinar a razão de liberação do FLU das formulações propostas foram desenvolvidas novas células de difusão. Essas células são divididas em duas partes de forma que uma metade fica sobre a outra metade (célula vertical) (Figura 18). A membrana ou córnea deve ser colocada entre as duas células horizontalmente e a formulação contendo o fármaco na metade superior da célula. As duas partes da célula de difusão são presas com o auxílio de um grampo. Para melhor encaixe da membrana (e da córnea, ressaltando que esta é levemente côncava) as bordas do compartimento inferior são levemente elevadas. A solução receptora (tampão Hepes isotônico com NaCl, pH 7,4) foi mantida a 35°C e agitada a 600 rpm.

As células de difusão desenvolvidas foram validadas antes dos ensaios segundo Cordoba-Diaz *et al.* (CORDOBA-DIAZ *et al.*, 2000) como descrito a seguir.

Figura 18. Representação esquemática de célula de difusão iontoforética desenvolvida: a) compartimento doador; b) eletrodo positivo; c) córnea; d) compartimento receptor; e) eletrodo negativo; f) porta de coleta; g) banho térmico e h) barra magnética para agitação (GRATIERI *et al.*, 2010).

4.2.6.2. Validação dos elementos mecânicos da célula de difusão desenvolvida

Algumas variáveis relacionadas a componentes mecânicos das células de difusão foram validadas por possuírem dramática influência nos experimentos de difusão, sendo que, pequenas variações nos valores destas variáveis podem ocasionar diferenças significativas nos resultados obtidos. Sendo estas variáveis:

A) Volume do compartimento receptor

As células de difusão foram vedadas e o volume do compartimento receptor de cada célula foi determinado. Utilizou-se método gravimétrico através do qual os compartimentos foram preenchidos com água Milli-Q assumindo-se a densidade 1 g/mL. Todas as determinações foram feitas em triplicata para cada célula.

B) Área de difusão

A área de difusão de cada célula (9 células no total) foi calculada medindo-se o diâmetro da circunferência no compartimento receptor com o auxílio de um paquímetro.

C) Estabelecimento e manutenção da temperatura nos diversos compartimentos

O sistema de difusão foi montado e um filme plástico (ParafilmTM) foi colocado entre o compartimento doador e receptor de cada célula. O compartimento receptor foi preenchido com tampão Hepes pH 7,4 e 1 mL da mesma formulação foi colocado no compartimento doador. As células foram colocadas dentro de um banho com aquecimento em duas temperaturas distintas (35 e 37°C). A temperatura foi medida em cada compartimento após 10, 15, 20 e 30 min com o auxílio de um termômetro calibrado.

D) Eficiência de agitação

Barras magnéticas de 15 mm de comprimento foram colocadas no interior do compartimento receptor. Uma placa agitadora manteve o sistema a 600 rpm. Uma alíquota de 25 µL de solução de azul de metileno foi adicionada no compartimento receptor. O tempo necessário para que se observasse visualmente a homogeneização da solução foi determinado.

4.2.6.3. Estudos de integridade da córnea

4.2.6.3.1. Microscopia de transmissão eletrônica

Nos estudos de integridade, as córneas foram imersas em solução fixadora de glutaraldeído (2 %), diluído em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,4 a 4 °C nos seguintes tempos experimentais:

- a) imediatamente após o abatimento do animal (t_0);
- b) após o transporte do abatedouro para o laboratório (t_{30});
- c) após a montagem de todas as córneas nas células de difusão (t_{ex0});
- d) após duas horas decorridas do experimento de permeação (t_{ex2});
- e) após quatro horas decorridas do experimento de permeação (t_{ex4}), e
- f) após seis horas decorridas do experimento de permeação (t_{ex6}).

Os tecidos permaneceram em solução de glutaraldeído por 24 h. Após este período, foram armazenadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,4 até o processamento de

rotina para microscopia eletrônica de transmissão, quando as córneas foram então recortadas em amostras menores e refixadas em tetraóxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 por um período de 2 a 3 horas a 4°C e a seguir lavadas no mesmo tampão e desidratadas com passagens em soluções crescentes de acetona. A seguir, foram embebidas em uma mistura de araldite (Ladd Res. Lab. Inc.) e acetona pura (1:1), por 24 horas à temperatura ambiente. A inclusão foi feita em mistura plena de araldite e a polimerização dos blocos de resina foi feita por 72 horas em estufa a 60° C. As amostras foram então seccionadas e coradas com azul de toluidina 1% em ácido bórico à saturação para seleção das áreas a serem observadas em microscopia eletrônica. Para isto, cortes ultrafinos, com 60 nm de espessura foram obtidos, montados em grades de cobre malha 200 e contrastados com acetato de uranila (WATSON, 1958) e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) e então observados e fotografados no microscópio eletrônico (Modelo EM208, Phillips) com aumentos finais entre 3.200 a 30.000 x para análise morfológica ultraestrutural do epitélio corneano.

4.2.6.3.2. Função barreira da córnea

De acordo com dados da literatura (THIEL *et al.*, 2001; TOROPAINEN *et al.*, 2003), sabe-se que o epitélio corneano íntegro é praticamente impermeável à fluoresceína. Assim, a fim de se confirmar a integridade e manutenção da função barreira do epitélio, a permeação da fluoresceína através da córnea foi estudada por 6 h. Para tanto uma solução de fluoresceína 10 µM foi colocada no compartimento doador da célula de difusão e a quantidade que atravessou a córnea a cada hora, presente no compartimento receptor, foi analisada por espectrofluorimetria (fluorímetro modelo F4500, Hitachi) ($\lambda_{ex}=493nm$ e $\lambda_{em}=517nm$). A confirmação da integridade do tecido se dá na ausência de fluorescência no compartimento receptor ao fim do experimento. Foi realizado também um experimento controle (“branco”) contendo apenas solução aquosa no compartimento doador. O controle positivo consistiu de uma solução contendo diacetato de fluoresceína 10 µM como doadora. O diacetato de fluoresceína é essencialmente não fluorescente, no entanto, é capaz de penetrar a córnea e ser hidrolisado intracelularmente a fluoresceína por esterases presentes neste tecido. A fluoresceína proveniente da hidrólise se difunde para o compartimento receptor e pode ser quantificada por espectrofluorimetria. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas.

4.2.6.4. Formulações

A liberação e permeação passiva do FLU 0,2% foram estudadas a partir das seguintes formulações:

- a) Solução aquosa (sç aquosa);
- b) Solução aquosa contendo quitosana 0,5% (Q0,5);
- c) Solução aquosa contendo quitosana 1,0% (Q1,0);
- d) Solução aquosa contendo quitosana 1,5% (Q1,5);
- e) Gel poloxamer 16% (P16);
- f) Gel poloxamer 16% e quitosana 0,5% (Q0,5 P16);
- g) Gel poloxamer 16% e quitosana 1,0% (Q1,0 P16);
- h) Gel poloxamer 16% e quitosana 1,5% (Q1,5 P16);
- i) Micropartículas em solução aquosa de poloxamer 0,5% (MP03 em sç) e
- j) Micropartículas em gel de poloxamer 16% e quitosana 1,0% (MP03 em Q1,0 P16).

A permeação iontoforética do FLU 0,2% foi estudada a partir das seguintes formulações:

- a) Solução aquosa (sç aquosa);
- b) Gel poloxamer 16% e quitosana 1,0% (Q1,0 P16) e
- c) Micropartículas em solução aquosa de poloxamer 0,5% (MP03 em sç).

4.2.6.5. Liberação do FLU a partir de diferentes formulações.

A célula de difusão foi montada com uma membrana de acetato de celulose separando o compartimento doador do compartimento receptor. O compartimento doador, na metade superior da célula, foi adicionado de 1g das formulações apropriadas (selecionadas de acordo com o item 4.2.6.4.) e fechado, com o auxílio de uma tampa de plástico, para minimizar a evaporação da formulação aí contida.

A solução receptora (tampão Hepes isotônico com NaCl, pH 7,4) foi mantida a 35°C e agitada a 600 rpm por 6 h. As amostras (1 mL) foram coletadas a cada hora e o mesmo volume de solução receptora foi repostado. A concentração do FLU liberado foi determinada

conforme metodologia descrita no item 4.2.1.1. O modelo cinético e o fluxo do fármaco a partir de cada formulação foram determinados.

4.2.6.5.1. Determinação da concentração de FLU liberado

Devido à reposição de solução receptora depois da retirada das amostras para análise a cada hora, fez-se necessária a correção dessa diluição no cálculo da quantidade liberada acumulada de FLU ao longo das seis horas de experimento, segundo a Equação XI:

$$Q_{\text{real}, t} = C_{\text{mensurada}, t} \cdot V_r + V_a \cdot \sum^{n-1} C_a \quad (\text{Equação XI})$$

Em que: $Q_{\text{real}, t}$ = quantidade real liberada acumulada no tempo t
 $C_{\text{mensurada}, t}$ = concentração mensurada da amostra no tempo t
 V_r = volume do receptor (35 mL)
 V_a = volume de amostra coletada (1,0 mL)
 C_a = concentração de amostra coletada

Dessa forma, a quantidade real liberada acumulada de ativo no tempo t é igual à quantidade mensurada no tempo t , somada à quantidade total retirada do compartimento receptor para quantificação das amostras anteriores.

O perfil de liberação do FLU foi analisado por meio de métodos gráficos, relacionando-se a quantidade de fármaco liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h). Foram construídas curvas em regressão linear para determinar o modelo cinético de permeação do FLU a partir das formulações estudadas. A melhor curva foi utilizada para calcular o fluxo (J) (velocidade de permeação através da membrana, representado pela inclinação da curva).

O coeficiente de difusão do fármaco através das formulações foi calculado segundo a Equação XII:

$$Q = 2 C_o (Dt / \pi)^{1/2} \quad (\text{Equação XII})$$

Em que: Q = quantidade total do fármaco liberado por área
 C_o = concentração do fármaco na formulação
 D = coeficiente de difusão
 t = tempo de experimento

Esta equação é válida quando a liberação do fármaco é menor que 60% da concentração inicial do mesmo.

4.2.6.6. Permeação passiva e iontoforética do FLU através da córnea de porco

Nos estudos de permeação foram utilizados os mesmos modelos descritos anteriormente, com exceção da membrana: em vez de membrana de acetato de celulose utilizou-se córnea de porco. Para se determinar a quantidade de FLU permeado através da córnea a partir das formulações estudadas (item 4.2.6.4.) foram utilizados os cálculos descritos no item 4.2.6.5. Nos experimentos de iontoforese foram mantidas as mesmas condições, sendo as únicas diferenças a inserção dos eletrodos e a passagem da corrente. O eletrodo positivo foi inserido no compartimento doador e o eletrodo negativo no compartimento receptor de acordo com a Figura 18.

4.2.6.6.1. Determinação da contribuição do fluxo eletrosmótico na iontoforese do FLU

O paracetamol (PCT) foi utilizado como marcador eletrosmótico nos experimentos de iontoforese para verificar a contribuição dos fluxos passivo e eletrosmótico na iontoforese do FLU. O fluxo passivo dessa substância foi primeiramente determinado a partir de solução aquosa contendo 6,53 mM de paracetamol e 67,15 mM de NaCl e pH 6,0. A composição dos compartimentos que não continham o fármaco, assim como o tempo e a corrente elétrica aplicada, foram as mesmas dos experimentos descritos anteriormente para o FLU.

As amostras de paracetamol coletadas foram analisadas por CLAE (FRANETA *et al.*, 2002). Utilizou-se como fase estacionária uma coluna de fase reversa C₁₈, fase móvel acetonitrila:água (15:85 v/v), pH 2,50 (ajustado com H₃PO₄), vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 50 µL. Foi utilizado detector espectrofotométrico a 240 nm. Este método já havia sido validado em nosso laboratório com relação à sua linearidade, precisão, exatidão e limite de quantificação (HERAI, 2004). A eficiência de recuperação do paracetamol a partir da córnea foi verificada de maneira semelhante ao FLU (item 4.2.1.4.3.2.) e apresentou recuperação acima de 90%.

4.2.6.6.2. Porcentagem de hidratação da córnea após iontoforese

A porcentagem de hidratação da córnea foi verificada ao final do experimento de iontoforese. Após 6 h de experimento passivo ou iontoforético as córneas foram pesadas e a massa hidratada (M_h) foi obtida. A seguir as córneas foram secas ($n = 4$) em câmara de ar circulante a 60°C por 12 h para obtenção da massa seca (M_s). A porcentagem de hidratação ($H\%$) (MONTI *et al.*, 2003) foi então calculada segundo a Equação XIII:

$$H\% = (1 - (M_s/M_h)) \times 100 \quad (\text{Equação XIII})$$

4.2.6.7. Estudo de retenção

No final dos experimentos de permeação descritos anteriormente (item 4.5.4), a córnea foi removida da célula de difusão, picotada e a quantidade de fármaco aí presente extraída com 5 mL de tampão Hepes isotonicado com NaCl pH 7,4 com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (item 4.2.1.4.3.2.). Após filtração, a solução foi analisada por CLAE (item 4.2.1.1.) para determinação da quantidade de fármaco retida neste tecido.

4.2.7. Ensaio de irritação ocular *in vitro* – modelo organotípico HET-CAM

A irritação ocular promovida pelo gel contendo quitosana/poloxamer foi avaliada *in vitro* utilizando a membrana corioalantoide (CAM) do ovo de galinha como modelo experimental (LUEPKE, 1985).

Os ovos de galinha embrionados foram cuidadosamente colocados na posição vertical sobre um suporte, de forma que a parte mais larga e plana ficasse voltada para cima. Com o auxílio de uma tesoura foi realizado um pequeno furo no centro da parte superior da casca de modo a expor a CAM, a qual é caracterizada por sua transparência e pela presença de vasos sanguíneos.

Em seguida, 300 μL da formulação a ser testada (gel termorreversível de poloxamer/quitosana contendo 0,2% m/m de FLU) foram aplicados diretamente sobre a

CAM. Após 20 s da aplicação, as CAM foram lavadas com solução tampão fosfato isotônico, pH 7,4, para retirada da formulação, e foram analisadas visualmente durante 5 min.

A Figura 19 ilustra os procedimentos descritos acima para realização do ensaio de irritação *in vitro* utilizando o modelo ornanotípico HET-CAM.

Figura 19. Ensaio de irritação *in vitro* – modelo organotípico HET-CAM. (a) retirada da casca do ovo; (b) exposição da CAM e aplicação das formulações a serem testadas; (c) visualização dos fenômenos ocorridos durante 5 min.

Durante os 5 min de observação da membrana, foram analisados sinais de irritação, como hiperemia, hemorragia e coagulação sanguínea, com base no seguintes critérios:

- *Hiperemia*: relacionada com o aparecimento de capilares que não eram visíveis anteriormente, ou com o aumento da intensidade de cor daqueles que já eram visíveis;
- *Hemorragia*: relacionada com o claro extravasamento de sangue no meio;
- *Coagulação sanguínea*: é detectada pela agregação de plaquetas que formam uma espécie de mancha rosada sob a membrana, ou pela agregação de proteínas que confere à amostra um aspecto esbranquiçado.

Cada formulação foi testada em triplicata. Uma solução de dodecil sulfato de sódio a 10% foi utilizada como controle positivo de irritação e a própria solução tampão fosfato isotônica, pH 7,4, foi utilizada como controle negativo.

Uma pontuação em função do tempo de aparecimento de cada um dos sinais de irritação foi estabelecida (Tabela 3). A partir dessa pontuação, determinou-se a categoria em que se inseriu cada uma das formulações, segundo a classificação indicada na Tabela 4.

Tabela 3. Pontuação atribuída para o aparecimento de cada sinal indicativo de irritação em função do tempo no teste de irritação *in vitro* em modelo organotípico HET-CAM (LUEPKE, 1985).

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

Tabela 4. Classificação das formulações quanto ao grau de irritação de acordo com a pontuação atribuída (P) para os sinais de irritação segundo o teste de irritação *in vitro* em modelo organotípico HET-CAM (LUEPKE, 1985).

Pontuação atribuída à amostra	Classificação quanto ao grau de irritação
$P \leq 1$	Praticamente não irritante
$1 < P \leq 5$	Ligeiramente irritante
$5 < P \leq 9$	Moderadamente irritante
$P > 9$	Irritante

4.2.8. Estudos *in vivo*: Padronização da técnica de microdiálise da câmara anterior e estudos de permeação *in vivo* do FLU

4.2.8.1. Sistema de microdiálise

O sistema empregado nos estudos consiste de uma bomba de microinjeção equipada com seringas de 1 mL e um controlador (Bioanalytical systems). Solução isotônica de tampão fosfato 0,1M pH $7,4 \pm 0,1$ foi empregada como meio de perfusão a um fluxo de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. As sondas empregadas neste estudo foram confeccionadas manualmente empregando-se tubo de diálise (10 x 0,3 mm, Cuprofan, massa molecular “*cut off*” de 3000 Da, CMA Microdialysis, Suécia) colado a um tubo de polietileno (comprimento padronizado de 50 mm) com cianoacrilato, conforme descrito por Navegantes *et al.* (2003) e esquema ilustrado na Figura 20. O dialisado foi coletado a cada 30 min.

Figura 20. Sonda linear confeccionada para os estudos de microdiálise. Membrana semipermeável de 10 x 0,3 mm, Cuprofan, 3000 Da de “cut off” conectada a tubos de polietileno.

4.2.8.2. Estudos de permeação *in vivo*

Os coelhos utilizados nos experimentos *in vivo* foram mantidos sob anestesia pela administração intramuscular de hidrocloreto de quetamina (35 mg/Kg) e xilazina (3,5 mg/Kg) a cada 40 min. Ao final do experimento, ainda anestesiados, os animais foram sacrificados pela inalação de CO₂ em câmara saturada.

Para inserção no humor aquoso, a sonda linear foi acoplada em uma das extremidades a uma agulha de 22 G. Primeiramente, um dos olhos do animal foi luxado e preso com o auxílio de uma luva cirúrgica. A seguir foi feita uma pequena incisão a aproximadamente 2 mm do limbo córneo-escleral para passagem da agulha através da câmara anterior. A agulha foi retirada do outro lado, permanecendo a sonda inserida no centro da câmara. As extremidades da sonda (entrada e saída) foram conectadas a microtubos de polietileno que levavam ao sistema de microinjeção e ao tubo de amostragem. Após esta conexão a perfusão foi iniciada a um fluxo de 2 µL/min. Os animais foram então deixados em estabilização por duas horas. Este tempo de estabilização é necessário para o restabelecimento da pressão intraocular e reposição do humor aquoso perdido durante o processo de implantação da sonda (ANAND *et al.*, 2004). Após as 2 h de estabilização, 50 µL (correspondente a 1 gota) de formulação foram aplicados sobre o olho do animal. As formulações empregadas foram aquelas que apresentaram os melhores resultados nos estudos *in vitro* (uma solução de quitosana, Q1,0, e uma formulação polimérica binária, Q1,0 P16) contendo 0,4% de FLU. Uma solução aquosa contendo 0,4% de FLU foi utilizada como controle. O experimento prosseguiu por 6 horas, sendo que as amostras foram coletadas a cada 30 min e analisadas por CLAE (item 4.2.1.1). Quando a solução de quitosana foi utilizada, as amostras foram coletadas a cada hora. A Figura 21 apresenta uma sequência de fotos mostrando todas as etapas de inserção da sonda. A Figura 22 apresenta o sistema montado.

Figura 21. Sequência de fotos representando as etapas de inserção da sonda nos estudos de microdiálise: (A) luxamento do globo ocular; (B) incisão na córnea; (C) inserção da agulha conectada à sonda; (D) passagem da agulha; (E) posicionamento da sonda no centro da câmara anterior retornando o globo ocular para posição normal e (F) sonda inserida na câmara anterior.

Figura 22. Foto apresentando a configuração do experimento de microdiálise: (A) controlador de fluxo; (B) bomba e seringa de microperfusão; (C) sonda linear inserida na câmara anterior conectada aos microtubos de polietileno e (D) microtubos coletores.

4.2.8.3. Validação da metodologia

Para caracterizar a taxa de transferência (ou troca) de FLU através da sonda (ou membrana) de microdiálise foram realizados estudos de recuperação *in vitro* e *in vivo*.

Para determinar a recuperação *in vitro* de FLU, a sonda foi colocada em contato com soluções do fármaco em várias concentrações (1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL) e perfundida com solução isotônica de tampão fosfato 0,1M pH 7,4 ± 0,1 a um fluxo de 2 µL/min. As concentrações de FLU no dialisado foram quantificadas e a recuperação foi calculada de acordo com a Equação XIV (ANAND *et al.*, 2004):

$$R\% = \frac{C_{\text{dialisado}}}{C_{\text{solução}}} \times 100 \quad (\text{Equação XIV})$$

A recuperação *in vivo* foi determinada através da técnica da retrodiálise (STAHLE *et al.*, 1991; RITTENHOUSE *et al.*, 1998). Neste estudo a sonda foi inserida na câmara anterior do olho do coelho, como descrito no item 4.2.8.2., no entanto, neste caso, foi perfundida uma solução isotônica de tampão fosfato 0,1M pH 7,4 $\pm$ 0,1 contendo 5 μ g/mL de FLU. A seguir, a concentração de FLU foi quantificada no dialisado e determinou-se a recuperação *in vivo* pela seguinte fórmula:

$$R\% = 100 - \left[\left(C_{\text{dialisado}} / C_{\text{perfusado}} \right) \times 100 \right] \quad (\text{Equação XV})$$

Esta técnica parte do princípio que no processo de diálise a troca através da membrana é bidirecional e que a recuperação independe da concentração de fármaco (LE QUELLEC *et al.*, 1995).

4.2.8.4. Análise dos dados

Os dados obtidos nos estudos de permeação *in vivo* (μ g/mL de FLU no dialisado) foram corrigidos pelo dado médio obtido nos estudos de recuperação *in vivo* (retrodiálise), de acordo com a Equação XVI, para determinação da concentração real de FLU (μ g/mL) na câmara anterior do globo ocular.

$$C_{\text{real}} = \left(C_{\text{amostra}} / R_{\text{invivo}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação XVI})$$

Com os dados assim obtidos, construiu-se o gráfico relacionando concentração de FLU (μ g/mL) e o tempo (horas). Foram determinados os seguintes parâmetros cinéticos: (i) área sob a curva (AUC), (ii) concentração máxima permeada ($C_{\text{máx}}$) e (iii) tempo necessário para atingir concentração máxima ($t_{\text{máx}}$).

4.2.9. Estudos *in vivo* do tempo de retenção da formulação por Cintilografia

O tempo de retenção na córnea da formulação termorreversível desenvolvida foi avaliada através de cintilografia gama de voluntários saudáveis. Os exames foram realizados no setor de Medicina Nuclear do HCFMRP-USP e têm a aprovação deste Comitê de Ética desta unidade (Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP- Protocolo nº12190/2007 – anexo 2).

O aparelho usado na cintilografia lacrimal é composto por uma gama-câmara (Orbiter Stand, modelo 6603, Siemens gama sonics[®]) acoplada a um microcomputador (Sophy NXT). A gama-câmara é equipada com um colimador cujo orifício estenopecico (“*pinhole*”) possui 4 mm de diâmetro.

Os pacientes sentaram-se diante de uma mesa com queixeira e apoio para a testa. Tanto a altura da mesa, como a queixeira foram reguladas de modo a posicionar o centro da córnea do paciente na mesma altura da abertura do colimador. A distância da córnea ao colimador foi de 5 cm. Foram instilados (no canto externo da fenda palpebral) 50 µL da formulação estudada (sem o ativo) contendo Tecnécio com 1 mCi de atividade (Figura 23). A osmolalidade da formulação foi corrigida pela adição de NaCl para que se encontrasse dentro da faixa aceitável para aplicações oftálmicas. A osmolalidade foi determinada pelo método de diminuição do ponto de fusão com o auxílio de um osmômetro (Semi-micro osmometer, modelo K 7400, Knauer). Após aplicação da formulação (ou soro fisiológico- controle) a gama-câmara foi disparada. Foram feitas aquisições dinâmicas de imagens, uma a cada 15 s, durante 10 min. Os pacientes foram instruídos a permanecerem imóveis e a piscarem normalmente. Após o exame as imagens adquiridas foram analisadas utilizando o programa de análise de imagens “Image J”. Em todos os casos as imagens proporcionaram detalhes suficientes para demarcação da posição da córnea/esclera e dos ductos lacrimais. Regiões de interesse (ROI_s) foram criadas a cada análise a fim de evitar erros devido à variação de posicionamento. Os dados foram expressos como porcentagem da dose de marcador administrada, sendo a primeira imagem (15 s) considerada como 100%. Assim, a curva do “*clearance*” radioativo em função do tempo foi obtida e os valores de AUC calculados.

Figura 23. Fotos retiradas de voluntárias submetidas ao exame de cintilografia lacrimal. (A) administração da formulação em voluntária posicionada e (B) voluntária posicionada durante aquisição das imagens cintilográficas.

4.2.10. Análise dos Resultados

Todos os resultados obtidos foram analisados estatisticamente comparando-se dois resultados de cada vez pelo Student-t teste não paramétrico. Foram considerados significativamente diferentes quando apresentaram $p < 0,05$ (LOPEZ *et al.*, 2003b). Para melhor entendimento dos resultados os dados obtidos nestas análises são apresentados ao longo da Discussão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Padronização da metodologia analítica para quantificação do FLU por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

5.1.1. Determinação do comprimento de onda (λ) de excitação do FLU

A varredura de soluções de FLU, a 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram absorção máxima em 210 e 260 nm. Foi então escolhido o λ **210 nm** para quantificação do FLU no detector espectrofotométrico acoplado ao CLAE.

5.1.2. Fase Móvel

A fase móvel que apresentou melhor separação e tempo de retenção, bem como picos mais finos e simétricos, foi a que continha **água: acetonitrila: metanol** na proporção de **80:15:5**. Esta fase móvel foi então escolhida, uma vez que possibilitou eluição rápida (5,3 min) e pico bem definido. O tempo de eluição foi considerado adequado, uma vez que é capaz de separar o pico de interesse (FLU) do pico observado no início da eluição (Figura 25) referente ao Hepes, presente na solução.

Os picos também foram avaliados quanto ao volume de injeção da amostra. O volume de injeção de **50 μL** foi escolhido, uma vez que não aumentou significativamente a largura dos picos e conferiu maior sensibilidade ao método. Para aumentar a reprodutibilidade do método foi utilizado forno a 30°C.

5.1.3. Determinação da curva analítica

A curva analítica do FLU nas concentrações de 0,1 a 10,0 $\mu\text{g/mL}$ em solução tampão Hepes pH 7,4 está representada na Figura 24.

Figura 24. Representação gráfica da curva analítica do FLU na faixa de concentração de 0,1 a 10,0 µg/mL. Equação da reta; $y = 82776x - 740,66$; coeficiente de correlação linear: $(r) = 1,0$.

Na Figura 25 estão representados os cromatogramas sobrepostos de soluções de FLU nas concentrações de 0,1; 0,5; 2,5; 5,0 e 10 µg/mL.

Figura 25. Cromatogramas sobrepostos de soluções de FLU nas concentrações de 0,1; 0,5; 2,5; 5,0 e 10 µg/mL. Fase móvel: água: acetonitrila: metanol 80:15:5, tempo de retenção do FLU = 5,3 min; fluxo de 1,0 mL/min; volume de injeção de 50 µL detecção a 210 nm.

A curva analítica está inserida na faixa de linearidade do método, uma vez que apresentou coeficiente de correlação linear $(r) = 1,0$. A faixa de concentração foi escolhida de acordo com as concentrações obtidas nas amostras dos experimentos de liberação e permeação *in vitro* do FLU.

5.1.4. Validação da Metodologia

Órgãos como ICH, IUPAC, ISO, ANVISA e INMETRO exigem o item validação de métodos como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica. Ainda, a validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionada como “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado a fazer” (RIBANI *et al.*, 2004).

No processo de validação é importante detectar erros sistemáticos dos procedimentos analíticos e oferecer evidências comprovadas que o método realiza o que se pretende. Inicialmente, é necessário validar o método analítico em termos de precisão, exatidão, curva de calibração/linearidade, especificidade/seletividade, limites de detecção e quantificação (ICH, 2005; RIBANI *et al.*, 2004). Sendo assim o método aqui proposto foi validado com base nos parâmetros descritos acima.

5.1.4.1. Linearidade

Foram preparadas, em triplicata, soluções de FLU em tampão Hepes ($\text{pH } 7,4 \pm 0,01$), nas concentrações de 0,1; 1,0; 2,0; 4,0; 20; 40 e 200 $\mu\text{g/mL}$. A curva analítica do FLU nas concentrações de 0,1 a 200 $\mu\text{g/mL}$ está representada na Figura 26.

Figura 26. Representação gráfica da curva analítica do FLU na faixa de concentração de 0,1 a 200 $\mu\text{g/mL}$. Equação da reta; $y = 75931x + 34070$; coeficiente de correlação linear: $(r) + 0,9999$.

Sendo assim, o método proposto apresentou-se linear em toda a faixa de concentração estudada (0,1 a 200 $\mu\text{g/mL}$).

5.1.4.2. Seletividade (estudo dos interferentes)

A especificidade diz respeito à habilidade do método em identificar inequivocadamente o analito na presença de outros compostos que esperam-se presentes na amostra.

Para verificar a possibilidade de interferência na análise do FLU em amostragens futuras, soluções aquosas de FLU foram “contaminadas” com estes possíveis interferentes. O tampão Hepes, pH 7,4, isotônico faz parte da formulação receptora de FLU nos estudos de permeação e liberação. Quando uma solução do fármaco em tampão Hepes foi analisada por CLAE não se observou alteração no tempo de eluição do pico do fármaco e na área do pico. Além disso, resíduos da córnea podem estar presentes nas amostras de FLU obtidas após os experimentos de permeação e retenção *in vitro*. Portanto, um “filtrado de córnea” também foi analisado. Da mesma forma, quando se misturou 100 µL deste homogeneizado a uma solução de FLU não houve alteração do tempo de retenção nem da área do pico do fármaco. Portanto, o método de quantificação demonstrou especificidade para o FLU nas condições de estudo.

5.1.4.3. Precisão e Exatidão

As Tabelas 5 e 6 mostram os valores de precisão e exatidão obtidos nos estudos intra e inter dia, respectivamente.

Tabela 5. Análise da Precisão e da Exatidão intra dia.

Parâmetros	FLU		
Concentração teórica (µg/mL)	0,5	5,0	50,0
Concentração mensurada (µg/mL) ¹	0,507 ± 0,0067	5,10 ± 0,027	50,7 ± 0,067
N	3	3	3
Precisão (CV %) ²	1,31	0,527	0,132
Exatidão (E %) ³	101,39	102,01	101,40

N = correspondente ao número de determinações

¹ média ± desvio padrão (n = 3)

² Precisão = (desvio padrão / média) x 100

³ Exatidão = (concentração mensurada / concentração teórica) x 100

Tabela 6. Análise da Precisão e da Exatidão inter dia.

Parâmetros	FLU		
Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	0,5	5,0	50,0
Concentração mensurada ($\mu\text{g/mL}$) ¹	$0,491 \pm 0,025$	$5,13 \pm 0,037$	$51,3 \pm 0,547$
N	3	3	3
Precisão (CV %) ²	5,00	0,717	1,065
Exatidão (E %) ³	98,29	102,51	102,60

N = correspondente ao número de dias (3 determinações em cada dia)

¹ média $\pm$ desvio padrão (n = 9)

² Precisão = (desvio padrão / média) x 100

³ Exatidão = (concentração mensurada / concentração teórica) x 100

A precisão (CV %) e a exatidão (E%) do método analítico aqui proposto foram testadas por análises intra e inter dia. Esses estudos permitem concluir sobre o erro analítico do método (CAUSON, 1997). Assim, a exatidão é definida como a diferença entre o valor mensurado e o valor tido como verdadeiro da amostra, enquanto a precisão (dada pelos coeficientes de variação inter e intraensaio), é definida como a concordância entre medidas de replicatas, seja a repetibilidade (variação intraensaio) ou a reprodutibilidade (variação inter ensaio). O método em estudo para a análise do FLU apresentou bons valores de exatidão (mostrou-se aproximadamente 100% exato) e de coeficiente de correlação, com valores abaixo de 5% para os estudos inter e intra dia.

5.4.1.3.1. Teste de recuperação – exatidão

A recuperação (ou fator de recuperação), R, é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. No presente trabalho foi determinada a porcentagem de recuperação (R%) de acordo com as normas e procedimentos preconizados pelo ICH (2005).

Os resultados obtidos no teste de recuperação estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Representação do resultado do teste de recuperação aplicando-se as condições cromatográficas descritas no item 4.2.1.1.

Cp ($\mu\text{g/mL}$)	Ca ($\mu\text{g/mL}$)	Pad ($\mu\text{g/mL}$)	% Recuperação
-	-	$5,11 \pm 0,066$	
$1,57 \pm 0,003$	0,55	1,02	100,10
$2,61 \pm 0,002$	0,55	2,04	101,09
$3,68 \pm 0,026$	0,55	3,06	102,02
-	$0,55 \pm 0,003$	-	

Cp = a concentração da amostra adicionada de padrão, *Ca* = a concentração da amostra sem padrão e *Pad* = a concentração de padrão adicionada na amostra. Os valores representam a média de três determinações (n=3).

A recuperação de uma quantidade conhecida de padrão adicionado na amostra (solução receptora) foi praticamente completa, o que fica evidente através dos percentuais de recuperação obtidos (bem próximos de 100%) assegurando assim a exatidão da metodologia.

5.4.1.3.2. Teste de Recuperação do FLU a partir da córnea

O teste de recuperação do FLU da córnea foi realizado utilizando o método de extração recomendado pela literatura (LOPEZ *et al.*, 2000; LOPEZ *et al.*, 2003a; LOPEZ *et al.*, 2003b).

A Tabela 8 representa a porcentagem de recuperação do FLU adicionado em um homogeneizado de córnea.

Tabela 8. Porcentagem de recuperação do FLU adicionado em um homogeneizado de córnea, extraído com 5 mL de tampão Hepes pH 7,4.

Concentração calculada adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	% de Recuperação*
4,42	$3,74 \pm 0,003$	$84,72 \pm 0,07$
9,79	$8,85 \pm 0,775$	$90,39 \pm 7,92$

*Os valores representam a média de três determinações (n=3).

Como pode ser observado na Tabela 8, o experimento de extração do FLU da córnea apresentou-se satisfatório mostrando uma recuperação superior a 84%.

5.4.1.4. Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD)

Utilizando-se a metodologia proposta pelo ICH (2005) obteve-se o valor do desvio padrão (DP) do intercepto com o eixo Y de várias curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação (0,015; 0,020; 0,025; 0,03; 0,04 e 0,05 $\mu\text{g/mL}$) de $DP = 674,21$. Portanto, substituindo-se este valor nas equações IV e V, o LQ do FLU foi de 0,082 $\mu\text{g/mL}$ e o LD de 0,026 $\mu\text{g/mL}$.

A Tabela 9 mostra a média das concentrações obtidas após 5 repetidas análises de amostras contendo baixas concentrações do fármaco, com seus respectivos desvio padrão, precisão (CV %) e exatidão (E %).

Tabela 9. Precisão e exatidão do limite de quantificação do FLU e valores abaixo deste limite.

Concentração real (ng/mL)	Concentração mensurada ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	E (%)
0,015	-	-	-
0,02	- *	-	-
0,025	$0,0315 \pm 0,0035$	11,14	126,15
0,03	$0,0312 \pm 0,0024$	7,75	104,15
0,04	$0,0451 \pm 0,0055$	12,27	112,71
0,05	$0,0508 \pm 0,0022$	4,24	101,66

* não foi obtido pico detectável. Os LD e LQ encontram-se grifados.

Os resultados obtidos através das equações propostas pelo ICH foram muito próximos dos dados obtidos através de repetidas análises de amostras contendo baixas concentrações do fármaco. Considerou-se o limite de quantificação aquele onde a precisão não ultrapassou 5% e a exatidão ficou entre 95 e 105%. Sendo, portanto, o limite de quantificação **0,05 $\mu\text{g/mL}$** . Já o limite de detecção foi considerado o menor pico detectável (3 vezes maior que a linha de base), valor de concentração que coincidiu com o valor obtido através dos cálculos propostos pela ICH, de **0,025 $\mu\text{g/mL}$** (Tabela 9).

5.2. Caracterização dos parâmetros físico-químicos do FLU

5.2.1. Solubilidade em meio aquoso

Os valores obtidos no teste de solubilidade do FLU estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Quantidade de FLU obtida após filtração de suspensões do fármaco em diferentes concentrações.

FLU em suspensão aquosa (mg/mL)	Concentração obtida após filtração (mg/mL)*
8,0	4,321 ± 0,034
6,0	4,157 ± 0,043
4,0	4,322 ± 0,024

*Os valores obtidos foram corrigidos quanto a diluição (2000x).

Os estudos de solubilidade em água mostraram que o FLU é hidrossolúvel (~ **4,0 mg/mL**) (Tabela 10). Este dado foi utilizado para a certificação de que os experimentos *in vitro* de liberação e permeação do FLU sejam conduzidos em condições de “*sink*”, ou seja, a concentração do fármaco na solução receptora não deve ultrapassar 10% de sua solubilidade. Assim, nos estudos de permeação e liberação optou-se por utilizar soluções doadoras e formulações contendo uma concentração correspondente à metade da solubilidade do fármaco em água. Foi então utilizado 1 mL de formulação doadora contendo 0,2% de FLU, ou seja, soluções de 2 mg/mL. Assim, se todo o FLU (2 mg) passasse para o meio receptor (35 mL) a concentração final seria ~ 60 µg/mL, valor este muito abaixo do limite para se trabalhar em “*sink condition*” (400 µg/mL), garantindo, portanto, essa condição.

5.2.2. Determinação do coeficiente de partilha $K_{O/A}$, $K_{\text{córnea/água}}$ e $K_{\text{córnea/sq lacrimal}}$

Na Tabela 11 estão representados os seguintes coeficientes de partilha (K) do fluconazol: a) $K_{\text{óleo/água}}$, b) $K_{\text{córnea/água}}$ e c) $K_{\text{córnea/sq lacrimal}}$.

Tabela 11. Determinação dos coeficientes de partilha óleo/água ($K_{\text{óleo/água}}$), córnea/água ($K_{\text{córnea/água}}$) e córnea/solução lacrimal ($K_{\text{córnea/sq lacrimal}}$), através da verificação da quantidade remanescente de FLU por CLAE, na fase aquosa, após contato com a fase oleosa (octanol ou córnea).

Tipo de partilha	Fluconazol			
	C_1^* (µg/mL)	C_2^* (µg/mL)	$K^{\#}$	log K
Octanol/água	10,87 ± 0,60	3,77 ± 1,19	2,04 ± 0,68	0,31
córnea/água	193,68 ± 0,36	180,60 ± 0,16	0,07 ± 0,001	-1,14
córnea/sq lacrimal	190,90 ± 0,18	183,58 ± 0,22	0,04 ± 0,0002	-1,40

* C_1 = concentração de FLU na fase aquosa antes da partilha; C_2 = concentração de FLU na fase aquosa após a partilha. $^{\#}$ Coeficiente de partilha $K = (C_1 - C_2)/C_2$. Os resultados representam a média de três determinações com seus respectivos desvios padrão.

Devido a suas características de lipofilicidade e relativa capacidade de solubilizar água, o octanol tem sido largamente empregado nos estudos de partilha (TOMIDA *et al.*, 1978; MILOSOVICH *et al.*, 1993; CALPENA *et al.*, 1994; LAN *et al.*, 1994). Diversos autores relacionaram o coeficiente de partilha octanol/água ($K_{o/a}$) com a permeabilidade através da córnea (WU *et al.*, 1993; TAKACSNOVAK *et al.*, 1992). Schoenwald & Ward (1978) investigaram a permeabilidade *in vitro* através de córneas de coelho de 11 esteroides e estabeleceram que o log K que o fármaco deve apresentar para ter uma máxima penetração pela córnea é de 2,9 (SCHOENWALD *et al.*, 1978). Kato & Iwata (1988) ao estudarem a permeabilidade *in vitro* do bunazosin através de córnea de coelhos observaram que ao adicionarem ácidos que aumentavam o coeficiente de partilha óleo/água do fármaco, aumentavam também a permeabilidade (KATO *et al.*, 1988). Wang *et al.* (1991) afirmaram que modificações na permeabilidade através da córnea são mais significativas quando os valores de log K estão entre 1,5 e 2,5.

Sendo assim, o coeficiente de partilha do FLU foi determinado a fim de se predizer a atividade do fármaco em um sistema biológico complexo.

O log $K_{\text{óleo/água}}$ obtido neste experimento foi de 0,31. Este valor coincide exatamente com valores encontrados na literatura ($0,31 \pm 0,74$) (MUSIOL *et al.*, 2006). Mathy *et al.* (2005) determinaram o valor do coeficiente de partilha do FLU entre a derme de ratos e o plasma, encontrando um valor de log K $1,02 \pm 0,04$ (MATHY *et al.*, 2005). Estes valores pequenos demonstram mais uma vez a alta hidrossolubilidade do FLU, sendo este, um dos fatores limitantes de sua permeação.

A determinação do $K_{\text{córnea/água}}$, ou $K_{\text{córnea/solução lacrimal}}$ confere informações sobre o coeficiente de permeabilidade (P) do fármaco. O P está diretamente relacionado com a passagem do fármaco através do tecido e é determinado por dois fatores: (i) a dissolução do fármaco no tecido (medida pelo coeficiente de partilha (K)) e (ii) a difusão do fármaco através do tecido (medida pelo coeficiente de difusão (D)). Portanto, determinando-se o coeficiente de partilha do FLU entre a córnea e a solução lacrimal, pode-se inferir sobre a permeabilidade do fármaco em estudo, ou seja, quanto maior o K maior o P e, conseqüentemente, maior o fluxo (J) do fármaco através da córnea (BOSMAN *et al.*, 1998; ROSS JS *et al.*, 2000). Na Tabela 11 pode-se observar que o FLU apresenta alta afinidade pela solução semelhante à solução lacrimal (devido aos baixos valores de K). Estes coeficientes de partilha obtidos podem explicar a baixa permeabilidade passiva do FLU através da córnea e também a menor quantidade de fármaco retido nesta camada a partir de soluções aquosas. Um veículo oleoso seria, portanto, o melhor para aumentar a permeabilidade do FLU através da córnea, uma vez que esse veículo seria capaz de liberar o fármaco mais facilmente. No entanto, como se trata de administração ocular, é dada preferência para as formas hidrossolúveis. Ainda, como já foi dito anteriormente, quando se fala em permeabilidade, deve-se também levar em conta o coeficiente de difusão (D) do fármaco. Portanto, substâncias que alteram temporariamente a organização celular da córnea, levam a um aumento do D, com conseqüente aumento de P. A partir destas considerações optou-se por avaliar a quitosana como um dos polímeros constituintes da formulação estudada, pois a literatura relata que esta substância promove a absorção de ativos em diversas membranas biológicas (ARTURSSON *et al.*, 1994; SCHIPPER *et al.*, 1997; DODANE *et al.*, 1999; ZAMBITO *et al.*, 2006; FOGERT *et al.*, 2007).

5.3. Géis termorreversíveis

A administração tópica de fármacos tem sido extensivamente usada no tratamento de doenças oculares, no entanto, é limitada pela baixa biodisponibilidade devido à rápida drenagem lacrimal e absorção conjuntival (GHATE *et al.*, 2008). Além disso, com os colírios convencionalmente usados há a necessidade de administrações frequentes, o que leva à baixa adesão dos pacientes ao tratamento (SCHOENWALD, 1990).

Tais limitações poderiam ser superadas de duas maneiras: (i) aumentando-se a permeabilidade de fármacos pela incorporação de promotores de permeação na formulação e

(ii) utilizando-se veículos que prolongassem o tempo de contato da formulação com a superfície ocular (KAUR *et al.*, 2002b). Isto poderia ser conseguido empregando-se géis reversíveis *in situ*. Estes sistemas são administrados como uma solução aquosa e em seguida se geleificam devido a alterações físico-químicas na superfície ocular (NANJAWADE *et al.*, 2007). Isto leva a uma administração fácil como a obtida por colírios convencionais e de dosagem reprodutível. Já a transição para a forma de gel na superfície ocular pode acarretar aumento do tempo de retenção da formulação e, conseqüentemente, do fármaco.

Nesse sentido, um dos sistemas que este trabalho busca caracterizar para liberação ocular do FLU é um sistema polimérico binário composto por quitosana e poloxamer 407. A escolha destes polímeros se justifica pelas suas propriedades. Entre os poloxamers disponíveis, o 407 é um dos menos tóxicos, sendo inerte em relação à mucosa (TALASAZ *et al.*, 2008). Além disso, possui alta capacidade solubilizante e proporciona géis transparentes com baixas concentrações de polímero em relação aos outros tipos (DUMORTIER *et al.*, 1991). Já a quitosana, como mencionado anteriormente, possui excelente compatibilidade ocular (ALONSO *et al.*, 2003; DE SALAMANCA *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2009), propriedades mucoadesivas (HASSAN *et al.*, 1990; LEHR *et al.*, 1992; MAKHLOF *et al.*, 2008) e promotoras da absorção de fármacos (DI COLO *et al.*, 2004; MAJUMDAR *et al.*, 2008; DI COLO *et al.*, 2008).

Tais formulações, preparadas com proporções diversas de quitosana e poloxamer apresentaram aparência e consistência diversa. A avaliação das propriedades das formulações desenvolvidas, monopoliméricas e poliméricas binárias, é importante para prever e entender o comportamento *in vivo* dos sistemas bioadesivos termorreversíveis propostos. Tais propriedades foram determinadas e serão discutidas a seguir.

5.3.1. Temperatura de geleificação

A propriedade termorreversível das formulações monopoliméricas de poloxamer foi avaliada pela temperatura de transição sol/gel ($T_{\text{sol/gel}}$) e os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Temperatura de transição sol/gel ($T_{\text{sol/gel}}$) obtida para as formulações monopolímericas de poloxamer.

Poloxamer (% p/p)	$T_{\text{sol/gel}}$ (°C)*
14	$42 \pm 2,3$
16	$32 \pm 1,2$
18	$25 \pm 0,9$
20	$23 \pm 0,4$

*Os valores representam a média de três determinações. A formulação escolhida encontra-se grifada.

As formulações contendo poloxamer nas concentrações estudadas apresentaram módulos elástico e viscoso dependentes da temperatura e da concentração polimérica. A viscosidade η de todas as formulações aumentou significativamente com o aumento da temperatura. Além disso, o valor do módulo G' foi baixo no estado de solução e aumentou significativamente no estado de gel. No entanto, quando a concentração de poloxamer foi de 14% (p/p) (Tabela 12) esse aumento começou a acontecer a partir de 35°C, sendo que, para estas formulações a $T_{\text{sol/gel}}$, ou seja, a temperatura na qual G' se iguala à G'' (“ $G'G''$ crossover”) foi de 42°C. Desta forma, esta formulação não é adequada para administração oftálmica, uma vez que na temperatura ocular (34-35°C) a forma líquida persistiria. Em contrapartida, quando a concentração de poloxamer foi de 20% (p/p) a geleificação ocorreu a 23°C (Tabela 12). Esta formulação, portanto, já se apresenta como um gel na temperatura ambiente não conferindo vantagem em relação à facilidade de administração tópica, ao invés disso, dificultaria a manufatura, o manuseio e a administração. A $T_{\text{sol/gel}}$ ideal seria entre 25°C e 32°C, correspondendo às formulações contendo 18 e 16% de poloxamer, respectivamente. Como este trabalho visa o desenvolvimento de uma formulação oftálmica para viabilizar o tratamento tópico da ceratite fúngica em países quentes, como o Brasil, a formulação contendo 16% de poloxamer foi escolhida, pelo fato de a temperatura ambiente muitas vezes ultrapassar os 25°C. Além disso, deve-se levar em consideração que a manutenção das formulações em geladeira, com a finalidade de facilitar a administração, poderia irritar a superfície ocular sensível à temperatura, levando a um lacrimejamento pronunciado, que após uma administração tópica não é desejado (WEI *et al.*, 2002).

O mecanismo mais aceito para se explicar a termogeificação do poloxamer diz que este fenômeno é resultante de interações entre os diferentes segmentos do copolímero (ALEXANDRIDIS *et al.*, 1994; DUMORTIER *et al.*, 2006). As moléculas individuais dos

blocos de copolímeros (unímeros) do poloxamer 407 possuem a habilidade de se auto-organizarem em micelas quando em dispersões aquosas (micelização), em concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC) a fim de minimizar a energia livre da solução. Estas micelas são esféricas, constituídas pelo núcleo desidratado de POP e pela coroa de cadeias hidratadas de POE (JUHASZ *et al.*, 1989; DUMORTIER *et al.*, 2006). Um aumento na temperatura leva à maior desidratação e mudança conformacional nas regiões hidrofóbicas de POP, ocasionando aumento de fricção e entrelaçamento da rede polimérica (VADNERE *et al.*, 1984; MILLER *et al.*, 1984). Assim, mais água livre é disponibilizada às regiões hidrofílicas do gel (GILBERT *et al.*, 1987), e, como consequência disso, as cadeias externas de PEO se interpenetram extensivamente no gel. Neste ponto a geleificação ocorre e as micelas se encontram de forma organizada (MORTENSEN *et al.*, 1993). Trata-se de um processo reversível. Com a diminuição da temperatura as cadeias de POP são reidratadas e as micelas voltam à forma desorganizada na solução.

Conforme observado, a temperatura necessária para a formação da rede é menor quanto maior a concentração de polímero. Da mesma maneira, o aumento de concentração acarreta maior densidade da rede formada, e, conseqüentemente, maior viscosidade (JUHASZ *et al.*, 1989). A $T_{sol/gel}$ corresponde à temperatura necessária para que se dê a organização das micelas a uma determinada concentração.

A inclusão de fármacos ou outros aditivos poderia interferir na micelização do poloxamer e alterar a desidratação dos blocos hidrofóbicos de POP (DUMORTIER *et al.*, 1991; CHANG *et al.*, 2002). Desta forma, além de se determinar a concentração ideal de poloxamer na formulação, é necessário verificar a influência dos outros aditivos presentes na formulação (fármaco e quitosana) na $T_{sol/gel}$, como discutido a seguir.

Os módulos elástico (G'), viscoso (G''), viscosidade dinâmica (η') e tangente viscosa ($\tan \delta$) determinados a partir da rampa de temperatura (15-50°C) de formulações contendo 16% de poloxamer e diferentes concentrações de quitosana (0,5; 0,75; 1,0; 1,25; e 1,5%) ou FLU (0,2%) estão apresentados na Figura 27. O reograma obtido a partir da análise de uma formulação contendo apenas quitosana (1,0%), considerada como controle, está apresentado na Figura 28.

Figura 27. Reogramas de formulações poliméricas binárias contendo 16% de poloxamer e diferentes concentrações de quitosana: (A) 0,5%; (B) 0,75%; (C) 1,0%; (D) 1,25%; (E) 1,5% e (F) 0% de quitosana e 0,2% de FLU. Eixo x: temperatura ($^{\circ}\text{C}$); Eixo y G' G'' (Pa). São apresentados: módulo elástico (G'), módulo viscoso (G''), viscosidade dinâmica (η') e tangente de perda ($\tan \delta$) determinados a partir de rampa de temperatura (15-50 $^{\circ}\text{C}$). Foi aplicada frequência de 1 Hz. Cada reograma é a média de, no mínimo, três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 28. Reograma de formulação monopolimérica de quitosana 1,0%. São apresentados: módulo elástico (G'), módulo viscoso (G''), viscosidade dinâmica (η) e tangente de perda ($\tan \delta$) determinados a partir de rampa de temperatura (15-50°C).

Tanto a adição de diferentes concentrações de quitosana (0,5; 0,75; 1,0; 1,25; e 1,5%) quanto a adição de FLU (0,2%) a uma formulação contendo 16% de poloxamer não alteraram significativamente a $T_{\text{sol/gel}}$ desta formulação (Figura 27). Nas formulações contendo quitosana, no final da transição sol/gel, o módulo G' apresenta-se independente ao longo de uma faixa variável de temperatura e, depois, aproximadamente ao atingir 40°C, diminui. As soluções contendo apenas quitosana, ao contrário das formulações contendo poloxamer, apresentaram leve diminuição da viscosidade η com o aumento da temperatura. Esta diminuição da viscosidade η com o aumento da temperatura observada nas formulações contendo quitosana pode ser responsável pela diminuição do valor do módulo G' acima de 40°C na mistura binária. Estas análises mostram que a quitosana não possui propriedades termorreversíveis e que se apresenta como uma solução líquida de 15 a 50°C em todas as concentrações estudadas ($G'' > G'$). Sendo assim, levando em consideração a definição reológica de um gel, dispersões de quitosana em água, apesar de apresentarem certa viscosidade, não devem ser consideradas como tal forma farmacêutica (HAGERSTROM *et al.*, 2001).

Portanto, quando a uma concentração de 16%, a 25 °C, o poloxamer se apresenta como uma solução e a administração é facilitada. Após o contato com a superfície ocular, a 35 °C, a formulação se geleifica, possuindo maior viscosidade η e maior valor de módulo elástico (G').

5.3.2. Análise reológica oscilatória

Em condições fisiológicas, espera-se na superfície ocular uma determinada tensão de cisalhamento dependente de diversos fatores. Nos intervalos entre cada piscar, enquanto os olhos encontram-se abertos, esta tensão depende apenas da força gravitacional, podendo ser considerada, portanto, próxima a 1 s^{-1} (OECHSNER *et al.*, 1999). Já no momento do piscar a tensão de cisalhamento pode ser calculada pela espessura do filme lacrimal, $7 - 8 \text{ }\mu\text{m}$ (MISHIMA, 1965), e pela velocidade do piscar, 10 cm s^{-1} (PATTON *et al.*, 1975), sendo de aproximadamente 10000 s^{-1} (OECHSNER *et al.*, 1999). Entretanto, alguns autores reportam tensões de cisalhamento de até 40000 s^{-1} (DUDINSKI *et al.*, 1983). Dessa forma, após a aplicação de uma formulação oftálmica geleificante *in situ* é provável que um filme mais espesso seja formado, devido à maior viscosidade do sistema, e, assim, maior força de cisalhamento durante o piscar é esperada.

A habilidade final da melhor formulação desenvolvida em suportar altas tensões de cisalhamento durante o piscar foi avaliada em humanos de maneira indireta (uma vez que está relacionada ao tempo de residência na superfície ocular) durante os estudos de cintilografia, apresentados ao final deste trabalho.

Para se avaliar as propriedades mecânicas das formulações desenvolvidas quando submetidas a baixas tensões de cisalhamento, condição esta semelhante ao que se espera no intervalo entre cada piscar, análises de reologia oscilatória foram empregadas. A pequena amplitude oscilatória aplicada nestes estudos evita a destruição da estrutura do gel, fato que normalmente ocorre em análises de cisalhamento contínuo (WEI *et al.*, 2002).

Os módulos elásticos (G') e os módulos viscosos (G'') de formulações contendo poloxamer 16% e diferentes concentrações de quitosana (0,0; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5%) obtidos a partir de solicitações oscilatórias em diferentes frequências (de 0,1 a 10Hz) e temperatura constante de 25°C estão apresentados na Figura 29. Os resultados obtidos quando a temperatura das amostras foi de 35°C estão apresentados na Figura 30. Os gráficos obtidos a partir da análise de um controle de uma formulação contendo apenas quitosana (1,0%) em ambas as temperaturas estão apresentados na Figura 31. As análises foram realizadas em, no mínimo, três replicatas para cada formulação.

Além desses estudos, análises reológicas também foram realizadas para se verificar a habilidade da formulação de suportar a diluição lacrimal em duas condições extremas: (a) sem diluição, presumindo-se geleificação imediata nos olhos após a administração e (b) após completa diluição, considerando-se o pior caso possível, onde toda a formulação aplicada (50

μL) seria imediatamente misturada com o filme lacrimal (7 μL) (EDSMAN *et al.*, 1998), de acordo com o item 4.2.3.2. O resultado destas análises reológicas está apresentado na Figura 32.

Figura 29. Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') determinados a partir de varredura de frequência (0,1-10Hz) de formulações contendo 16% de poloxamer e diferentes concentrações de quitosana: (A) 0,0%; (B) 0,5%; (C) 0,75%; (D) 1,0%; (E) 1,25% e (F) 1,5%. A temperatura foi mantida a 25°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 30. Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') determinados a partir de varredura de frequência (0,1-10Hz) de formulações contendo 16% de poloxamer e diferentes concentrações de quitosana: (A) 0,0%; (B) 0,5%; (C) 0,75%; (D) 1,0%; (E) 1,25% e (F) 1,5%. A temperatura foi mantida a 35°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 31. Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') determinados a partir de varredura de frequência (0,1-10Hz) de formulação monopolimérica de quitosana 1,0%. (A) 25°C e (B) 35°C. Cada reograma é a média de, no mínimo, três replicatas com coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 32. Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') determinados a partir de varredura de frequência (0,1-10Hz) de formulações contendo 16% de poloxamer e diferentes concentrações de quitosana: (A) 0,5%; (B) 0,75%; (C) 1,0%; (D) 1,25% e (E) 1,5%. A temperatura foi mantida a 35°C. Todas as formulações foram misturadas a uma solução semelhante à solução lacrimal na razão de 50:7.

Em medidas de reologia oscilatória uma torção sinoidal é aplicada a uma amostra e a resposta mecânica é medida em função de uma frequência oscilatória ou em função da temperatura. No caso de um sólido puro a maior resposta torcional é observada quanto maior for a força aplicada por unidade de área. Desta forma, nestes sistemas, a energia aplicada é usada para garantir a recuperação instantânea do próprio sistema após o término do “*stress*” (força por unidade de área- Pa) aplicado. De maneira contrária, em um líquido Newtoniano a energia aplicada não é armazenada, é dissipada como calor no processo de escoamento. Materiais viscoelásticos exibem propriedades intermediárias entre sólidos e líquidos. Nas análises reológicas G' representa a energia armazenada por ciclo, é o módulo de armazenamento, real ou elástico (“resposta de sólido”), enquanto que G'' representa a energia dissipada por ciclo, é o módulo de perda, imaginário ou viscoso (“resposta de líquido”) (JONES, 1999).

O processo de mudança de uma fase líquida para uma semissólida pode ser descrito em função do incremento do módulo elástico. As medidas oscilatórias fornecem informações a respeito das propriedades dinâmicas de um material, como valores de módulo elástico (G') ou módulo viscoso (G''), ao investigarem a resposta do material submetido a uma torção sinoidal. Assim, os valores obtidos de G' e G'' podem ser utilizados para se predizer o desempenho das formulações (JONES *et al.*, 1997). Na temperatura ambiente a formulação deve ser líquida, a fim de possibilitar uma fácil administração. Portanto, espera-se que $G'' > G'$. Após a administração, no entanto, a 35°C, se o módulo de armazenamento (G') da preparação oftálmica é muito baixo em relação ao módulo de perda (G''), a drenagem lacrimal é facilitada. A fim de se diminuir a drenagem, a característica elástica deve ser alta. Espera-se, portanto, que após a administração ocorra a transição do sistema para a forma de um gel ($G' > G''$) que seja capaz de suportar tanto as tensões de cisalhamento na superfície ocular, como também a diluição lacrimal (EDSMAN *et al.*, 1996).

A Figura 29 mostra que, à temperatura ambiente, todas as formulações apresentaram $G'' > G'$, ou seja, todas as formulações comportam-se como soluções viscoelásticas (JONES *et al.*, 2001). No entanto, a Figura 30 mostra que, a 35°C, ou seja, em condições fisiológicas o módulo G' excedeu o módulo G'' sobre toda a faixa de frequência aplicada e, assim, esses sistemas são mais apropriadamente descritos como géis nesta temperatura.

Pode-se observar pelas Figuras 29 e 30 que o aumento da frequência em ambas as temperaturas provoca aumento da característica elástica em relação à viscosa, ou seja, a relação G'/G'' é aumentada proporcionalmente à frequência. Isto indica estruturação do

sistema. Ao se desenvolver um sistema de liberação ocular concentração dependente, deve-se considerar a diluição lacrimal após a administração da formulação. Essa diluição aumentaria o módulo viscoso do sistema, ou seja, diminuiria a relação G'/G'' . No entanto, como há estruturação do sistema com aumento da frequência é possível que o ato de piscar (que é a aplicação de uma força sobre o material), desencadeado pelo lacrimejamento, compense o efeito da diluição, prevenindo que a formulação seja rapidamente escoada.

A Figura 32 mostra que as formulações poliméricas binárias diluídas ao extremo apresentaram módulo $G'' > G'$ a baixas frequências. No entanto, conforme esperado, com o aumento da frequência a relação G'/G'' aumentou, provando que houve reestruturação do sistema. Ainda, a quitosana auxilia neste processo, uma vez que, quanto maior a concentração de quitosana na formulação, menor a frequência necessária, ou seja, menor a energia necessária para reestruturação do sistema. Apesar da adição de 0,5 a 1,5% de quitosana não interferir na temperatura de geleificação (Figura 27), ela provavelmente facilita a acomodação de água livre derivada da desidratação do núcleo hidrofóbico de POP das micelas, e, portanto, facilita a organização micelar, contribuindo para as características elásticas do sistema.

As frequências nas quais o módulo elástico passa a ser maior que o módulo viscoso ($G' > G''$) a 35°C, para cada formulação misturada a uma solução semelhante à solução lacrimal na proporção de 50:7, estão relacionadas na Tabela 13.

Tabela 13. Frequências nas quais o módulo elástico passa a ser maior que o módulo viscoso ($G' > G''$). Os valores foram obtidos a partir de uma varredura de frequência (0,1 - 10 Hz) a 35°C de formulações contendo 16% de poloxamer e diferentes concentrações de quitosana (0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5%) misturadas a uma solução semelhante à solução lacrimal na razão de 50:7.

Formulação	Frequência (Hz)*
Q0,5 P16	5,307 ± 0,385
Q0,75 P16	5,307 ± 0,142
Q1,0 P16	4,521 ± 0,449
Q1,25 P16	1,489 ± 0,346
Q1,5 P16	0,6722 ± 0,101

*Os valores representam a média de três determinações.

Através destes dados é possível concluir que a quitosana pode contribuir para a estruturação do sistema, o que será particularmente útil nas condições fisiológicas. Aliás, a situação *in vivo* se encontrará provavelmente entre os dois extremos: sem a diluição (Figura

30) e com diluição no pior cenário (Figura 32). Ainda, considerando a utilização proposta dessas formulações, tem sido reportado que a elasticidade, ou seja, resistência à deformação, é importante para a retenção da formulação no local de aplicação (JONES *et al.*, 2001). Dentro desse contexto, a utilização das formulações poliméricas binárias é apropriada.

5.3.3. Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva

A mucoadesão ocular baseia-se na interação entre o polímero presente na formulação e a camada de mucina que reveste a superfície da córnea e conjuntiva (QI *et al.*, 2007). A quitosana tem sido descrita como um polícatión linear que se adere prontamente a superfícies com carga negativa (EL KAMEL *et al.*, 2002). As interações com a mucina parecem ser tanto eletrostáticas, entre os grupamentos amino positivos da quitosana e os resíduos negativos da mucina e/ou hidrofóbicas, entre os grupamentos metila desses compostos (DEACON *et al.*, 2000). No entanto, fatores como a conformação das cadeias poliméricas e a concentração podem influenciar a capacidade mucoadesiva (ROSSI *et al.*, 2000; ROSSI *et al.*, 2001). Dessa forma, para se determinar se as propriedades mucoadesivas da quitosana seriam mantidas após incorporação nos géis de poloxamer, que apresentam alta força mecânica na temperatura ocular, e para se avaliar ainda se há uma relação entre a capacidade mucoadesiva e a concentração de quitosana no sistema, os testes *in vitro* de mucoadesão foram realizados.

A força necessária para remover o disco de mucina de cada formulação (tida como a força mucoadesiva) está apresentada na Tabela 14. Quando formulações contendo 16% de poloxamer foram usadas, fragmentos de formulação foram encontrados aderidos ao disco de mucina (Figura 33) indicando, portanto, que as forças de coesão da amostra eram menores que a força mucoadesiva (JONES *et al.*, 1997; BONFERONI *et al.*, 2006). Por esta razão, para se verificar a manutenção da propriedade mucoadesiva da quitosana em função da sua concentração em géis de poloxamer, formulações contendo 18% m/m de poloxamer foram usadas.

Tabela 14. Força mucoadesiva das formulações poliméricas binárias contendo poloxamer e quitosana.

Concentração (%p/p)		Força (mN/cm ²)*
Poloxamer	Quitosana	
18	-	32,78 ± 5,88
18	0,5	39,49 ± 3,14
18	0,75	40,98 ± 8,24
18	1,0	41,25 ± 6,27
18	1,25	43,57 ± 8,63
18	1,5	50,00 ± 3,92

*Os valores representam a média de três determinações (n=3).

Figura 33. Foto ao final do experimento de avaliação da força mucoadesiva *in vitro* demonstrando a falha de coesão da amostra contendo 16% de poloxamer e 0,75 de quitosana.

Muitas vezes a força de coesão associada a géis farmacêuticos é menor que a força de ligação entre a formulação e a mucina e, por isso, a quantificação direta da mucoadesão não pode ser realizada (JONES *et al.*, 1997). Jones *et al.* (1997) investigaram a mucoadesão de géis de hidroxietilcelulose (HEC) e carboximetilcelulose (CMC) em discos de mucina e observaram que formulações contendo menos de 5% de HEC e menos de 12% de CMC exibiram falha coesiva gel-gel nos testes de força de destaque, e, de maneira semelhante à falha observada no presente trabalho (para as formulações contendo 16% de poloxamer ou somente quitosana), a força de adesão entre estas formulações e o disco de mucina não pôde ser determinada.

Normalmente, a força implicada na movimentação das pálpebras durante o ato de piscar varia de 0,2 a 0,8 N (YAMAGUCHI *et al.*, 2009). Dessa forma, buscou-se não ultrapassar de 1 N a força aplicada no contato da formulação com o disco de mucina.

Na Tabela 14 pode-se observar que a força vertical de remoção necessária para quebrar a ligação mucoadesiva das formulações com o disco de mucina foi significativamente aumentada com o aumento da concentração de quitosana para as formulações contendo 0,5; 1,0 e 1,5% do polímero. Para as outras formulações não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Devido à composição, propriedades físico-químicas e estruturais do filme lacrimal, vários fatores influenciam a mucoadesão em sistemas de liberação ocular (LEE *et al.*, 2000). Várias teorias (interação eletrônica, adsorção, solvatação, difusão ou interpenetração) foram propostas para explicar a bioadesão bem como a mucoadesão. As interações dependem da concentração do polímero bioadesivo (como sugerem os resultados apresentados), da força iônica e do pH do veículo, uma vez que mudanças na ionização de grupos funcionais ou campo elétrico influenciam as repulsões eletrostáticas, podendo ocasionar expansão da cadeia de muco (MORTAZAVI *et al.*, 1994). A fim de se obter um bom adjuvante mucoadesivo, o polímero ou sistema de liberação deve ter íntimo contato com a camada de muco. As cadeias poliméricas devem ser móveis e flexíveis o suficiente para se interdifundirem na camada de muco e penetrar o suficiente até formar uma rede. As cadeias poliméricas devem interagir com a mucina através de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas ou até mesmo hidrofóbicas (LEE *et al.*, 2000).

Dessa forma, os resultados apresentados confirmam que, apesar da grande firmeza do gel de poloxamer, a quitosana, quando incorporada neste sistema, mantém as suas propriedades mucoadesivas. É possível inferir, portanto, que a linearidade das cadeias de quitosana é mantida garantindo sua flexibilidade entre a estrutura do gel e o estabelecimento de interações com a camada de muco (EL KAMEL *et al.*, 2002). Acredita-se que tais interações sejam tanto iônica, entre os amino grupos com carga positiva da quitosana e resíduos de ácido siálico e sulfônico do muco (HASSAN *et al.*, 1990; LEHR *et al.*, 1992; ROSSI *et al.*, 2000; KAUR *et al.*, 2002b), como, em menor extensão, por ligações de pontes de hidrogênio, entre as regiões não ionizadas de ambas moléculas (EL KAMEL *et al.*, 2002; CHAYED *et al.*, 2007).

5.3.4. Análise do perfil de textura

As propriedades mecânicas (firmeza, compressibilidade e adesividade) de todas as formulações testadas a 25°C e 35°C estão apresentadas nas Figuras 34, 35 e 36.

Figura 34. Firmeza (N) das formulações compostas de poloxamer e quitosana e suas misturas binárias determinadas através da análise do perfil de textura a 25° e 35°C. Os símbolos #, ##, * e ** representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Formulações marcadas com o mesmo símbolo não apresentaram diferença estatística entre si. Os valores representam a média e o desvio padrão de cinco determinações ($n=5$).

Figura 35. Compressibilidade (N.mm) das formulações compostas de poloxamer e quitosana e suas misturas binárias determinadas através da análise do perfil de textura a 25° e 35°C. Os símbolos #, ## e * representam diferença estatística significativa entre si ($p < 0,05$). Formulações marcadas com o mesmo símbolo não apresentaram diferença estatística entre si. Os valores representam a média e o desvio padrão de cinco determinações ($n=5$).

Figura 36. Adesividade (N.mm) das formulações compostas de poloxamer e quitosana e suas misturas binárias determinadas através da análise do perfil de textura a 25° e 35°C. Os símbolos #, ##, * e ** representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Formulações marcadas com o mesmo símbolo não apresentaram diferença estatística entre si. Os valores representam a média e o desvio padrão de cinco determinações ($n=5$).

As formulações contendo apenas quitosana (Q0,5; Q1,0 e Q1,5) não apresentaram diferenças estatísticas significativas de suas propriedades mecânicas em função da temperatura (25°C e 35°C). Logo, estas análises confirmam que as propriedades mecânicas das formulações monopoliméricas de quitosana não sofrem influência da temperatura. Já o aumento da concentração deste polímero teve influência significativa nas propriedades mecânicas, uma vez que houve aumento dos valores de firmeza, dureza, compressibilidade e adesividade. A dureza pode ser descrita como a força máxima necessária para se atingir uma determinada deformação, enquanto a firmeza é a razão entre a força máxima exercida para se penetrar uma prova na amostra e a distância, ou profundidade, penetrada por esta prova em um determinado tempo (FERRARI *et al.*, 1994; FERRARI *et al.*, 1995). Como neste estudo penetrou-se uma prova através da amostra a uma profundidade de 10 mm, os valores de firmeza são representados pelos valores de dureza divididos por 10. Desta forma, os termos dureza e firmeza, ao se comparar as diversas formulações, puderam ser utilizados intercambiavelmente, e, por isso, o gráfico de dureza foi omitido.

Em relação a formulação monopolimérica de poloxamer (16% m/m), a adição de 0,5% de quitosana não alterou a dureza, compressibilidade e adesividade do sistema a 35°C, apesar do aumento destes valores a 25°C. A adição de concentrações maiores de quitosana

(1,0 e 1,5%) à formulação monopolimérica de poloxamer aumentou significativamente a firmeza, dureza, compressibilidade e adesividade das amostras.

Durante o desenvolvimento de formulações para uso tópico é importante avaliar as propriedades de textura das formulações, como, por exemplo: facilidade de remoção da embalagem, facilidade de espalhamento sobre a superfície a ser tratada, retenção do produto no local de aplicação e propriedades sensoriais do produto (JONES *et al.*, 1997). As informações derivadas dos estudos de textura (APT) têm demonstrado correlação com o desempenho de um material *in vivo*.

Encontram-se na literatura diversos trabalhos relatando a relação entre firmeza de um gel (“*gel strength*”) e a mucoadesão: quanto maior a firmeza, maior a força de adesão. Hägersröm & Edsman (2001) investigaram a mucoadesão de géis de polímeros derivados do ácido poliacrílico à mucosa nasal e observaram que maior firmeza conferiu maior adesão. Trabalho similar foi realizado por Jones *et al.* (1997). Os autores investigaram a mucoadesão de géis de hidroxietilcelulose e carboximetilcelulose em discos de mucina e observaram que maior concentração de polímero conferiu maior força de adesão, ao mesmo tempo que maior concentração conferiu maior firmeza à formulação. No entanto, este aumento na força de adesão atingiu um platô a uma determinada concentração, além da qual o aumento de concentração não proporcionava maior adesão. Através dos resultados obtidos é possível inferir que as formulações poliméricas binárias contendo 16% de poloxamer e 1,0 ou 1,5% de quitosana possuirão maior tempo de retenção que as soluções monopoliméricas. Ainda, de maneira semelhante aos estudos citados, foi observado que o aumento da concentração de quitosana nas formulações poliméricas binárias conferiu maior dureza e também maior força de adesão ao disco de mucina (item 5.3.3).

A compressibilidade descreve o trabalho requerido para comprimir o material por uma distância fixa. Dada a natureza desta análise, este parâmetro também se relaciona ao trabalho requerido para espalhar o produto sobre uma superfície. A compressibilidade dos géis de poloxamer foi alterada quando se adicionou 1,0 ou 1,5% de quitosana. Logo, quanto maior a concentração de quitosana na formulação, maior a dificuldade de espalhamento. A compressibilidade e a dureza são parâmetros reológicos que quantificam a deformação do material sobre compressão e torção. Por conseguinte, o efeito da adição de quitosana nestes parâmetros pode ser explicado pelo efeito concentração dependente sobre a viscosidade das soluções de quitosana (LUCERO *et al.*, 1994).

A adesividade é o trabalho necessário para superar as forças de atração entre a superfície da amostra e a superfície da prova (TUNICK, 2000; PARK, 2007). Esta

propriedade tem sido relacionada com o tempo de retenção do produto no local de aplicação, consequentemente, com a eficácia (WOOLFSON *et al.*, 1992; BRUSCHI *et al.*, 2007). Assim sendo, a adição de no mínimo 1,0% de quitosana ao gel de poloxamer pode conferir maior tempo de retenção ao sistema.

5.4. Micropartículas

Uma outra alternativa para se conseguir liberação sustentada do fármaco e maior tempo de residência na superfície ocular seria a encapsulação do fármaco, obtendo-se assim liberação sustentada a partir de micropartículas biocompatíveis. Trata-se de um sistema interessante, devido à facilidade de preparo, simplicidade de administração e possibilidade de liberação localizada do ativo (VARDE *et al.*, 2004).

5.4.1. Obtenção e caracterização das micropartículas de Eudragit[®] contendo FLU

As micropartículas de Eudragit[®] contendo FLU foram preparadas pelo método de *Spray drying*. O Eudragit[®] RS 30D, foi o polímero escolhido para a encapsulação do FLU, por ser um polímero barato, solúvel em etanol e possuir residual de carga positivo, o que poderia aumentar o tempo de residência das partículas na superfície ocular e facilitar a liberação iontoforética. As condições iniciais para a obtenção dessas partículas foram baseadas nos trabalhos realizados por Cortesi *et al.* (2007) e Rassu *et al.* (2008), que obtiveram micropartículas de Eudragit[®] para carrear cetoprofeno e aciclovir, respectivamente. No entanto, várias condições tiveram de ser modificadas. Os primeiros autores utilizaram para secagem soluções de Eudragit[®] em diclorometano, enquanto os segundos utilizaram uma suspensão aquosa do polímero. Nos testes preliminares de obtenção de micropartículas de Eudragit[®] e FLU, quando uma suspensão aquosa do polímero foi utilizada, partículas com diâmetro maior que 20 µm foram obtidas. Este tamanho de partícula não é desejável para administração ocular tópica, uma vez que pode causar sensação de desconforto ao paciente após sua aplicação (CHIANG *et al.*, 2001; BIN CHOY *et al.*, 2008). O uso de diclorometano não foi considerado por se tratar de um solvente muito tóxico. Optou-se então por utilizar uma solução hidroalcoólica de fármaco e polímero. A proporção etanol:água que apresentou melhores resultados foi a de 90:10.

Os parâmetros do aparelho, como tamanho do bico atomizador (1,2 mm), fluxo de ar de atomização (40 L/min), fluxo de alimentação da formulação (5 mL/min), fluxo de ar quente de secagem (5 m³/min) e temperatura de saída de ar (90°C) também foram modificados com relação ao trabalho realizado por Rassu *et al.* (2008) no intuito de se obter sistemas mais adequados aos propósitos que se deseja estudar.

As partículas obtidas conforme a metodologia descrita anteriormente (item 4.2.2.) foram então caracterizadas quanto ao rendimento e eficiência de encapsulação do processo, bem como distribuição de tamanho, morfologia e potencial zeta.

5.4.2. Rendimento do processo

Os valores de rendimento do processo de obtenção das micropartículas de Eudragit[®] a partir das formulações estudadas (Tabela 2) estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Caracterização das micropartículas de Eudragit[®] (Eud) contendo o FLU.

Sistema	Proporção FLU:Eud	Quantidade de pó (%)	Rendimento (%)	Eficiência encapsulação (%)	Diâmetro médio (µm)
MP01	1:1	2,0	2,23	85,46 ± 4,53	13,03 ± 12,54
MP02	1:3	2,0	3,45	92,34 ± 2,63	8,12 ± 6,37
MP03	1:5	2,10	2,89	93,93 ± 3,12	1,35 ± 0,50
MP04	1:10	1,93	2,64	89,45 ± 4,45	1,77 ± 0,75

O sistema escolhido encontra-se grifado.

De maneira geral, o processo de obtenção das micropartículas de Eudragit[®] por *spray drying* resultou em rendimentos que variaram de 2,0 a 3,5 %. O Eudragit[®] é um polímero que, entre outras propriedades, é capaz de formar filme facilmente quando seco sobre uma superfície lisa (HEGAZY *et al.*, 2002). Sendo assim, durante o processo de secagem da formulação uma parte do material encontrou-se adsorvido ao longo do aparelho (câmara inicial e ciclone). Por ter-se trabalhado em uma escala laboratorial, com quantidades relativamente pequenas de pó na formulação (de 9,6 a 10,5 g de pó em 500 mL por secagem), acredita-se que esta perda de material foi mais significativa no rendimento final do processo do que seria caso se trabalhasse numa escala maior. Rassu *et al.* (2008) utilizaram um Mini *Spray dryer* (Buchi Labortechnik AG) equipado com um ciclone de alta performance e

obtiveram rendimento de 59% no preparo de micropartículas de Eudragit[®] e cetoprofeno. Cortesi *et al.* (2007), utilizando o mesmo tipo de equipamento, obtiveram um rendimento de 47% no preparo de micropartículas de Eudragit[®] RS e aciclovir. Já Genc *et al.* (2006) obtiveram de 22 a 33% de rendimento no preparo de micropartículas de Eudragit[®] e claritromicina, enquanto que Al Zoubi *et al.* (2008) obtiveram rendimento de 7 a 31% na obtenção de micropartículas de bupiriona. No entanto, para a obtenção das informações desejadas no presente trabalho (como o comportamento dessas partículas na permeação do FLU e frente a corrente elétrica), a quantidade de partículas obtidas foi suficiente para a realização de todos os experimentos.

5.4.3. Distribuição de tamanho das micropartículas

Na Figura 37 estão representados gráficos de distribuição de tamanho das micropartículas de Eudragit[®] contendo o FLU obtidas por *spray drying*.

Figura 37. Distribuição de diâmetro em razão da porcentagem de volume diferencial das micropartículas de Eudragit[®] contendo FLU. As leituras foram feitas após dispersão das micropartículas em solução aquosa de poloxamer 0,5%.

Quando se trabalhou com uma proporção FLU:Eudragit[®] de 1:5 o diâmetro médio das partículas obtidas foi o menor obtido (**MP03; $1,3 \pm 0,50 \mu\text{m}$**), sendo que a curva de distribuição de tamanho praticamente se sobrepôs à curva das partículas obtidas com o dobro de polímero em relação ao fármaco (**MP04; $1,7 \pm 0,75 \mu\text{m}$**).

Apenas as formulações MP03 e MP04 apresentaram uma distribuição de tamanho monomodal e diâmetros adequados para administração ocular tópica (< 5 a $10\ \mu\text{m}$) (CHIANG *et al.*, 2001; KAUR *et al.*, 2004; BIN CHOY *et al.*, 2008). A polidispersividade dessas micropartículas foi semelhante à da maioria das micropartículas descritas na literatura obtidas por *spray drying* (CEVHER *et al.*, 2006; GAVINI *et al.*, 2008). Nas formulações MP01 e MP02 contendo maior proporção de fármaco observou-se aumento significativo do tamanho médio das partículas, que parecem ter se aglomerado quando dispersas em meio aquoso. De maneira semelhante, Rivera *et al.* (2004) obteve micropartículas de FLU e PLGA por *spray drying*. Quando a relação fármaco: polímero foi de 1:50 ou 1:10, estes autores obtiveram partículas com cerca de $4,5\ \mu\text{m}$ de diâmetro em média. No entanto, ao se aumentar a proporção de fármaco para 1:5 e 2:5 os tamanhos de partícula também aumentaram para $7,29$ e $22,43\ \mu\text{m}$, respectivamente (RIVERA *et al.*, 2004).

Com base nestes resultados procedeu-se aos estudos de morfologia para as formulações **MP03** e **MP04**, uma vez que estas micropartículas parecem possuir características adequadas para a possível aplicação ocular tópica desejada.

5.4.4. Morfologia das micropartículas

A Figuras 38 apresenta fotomicrografias das micropartículas de Eudragit[®] contendo FLU (MP03 e MP04) obtidas por *spray drying*.

Figura 38. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV Philipps XL 30 FEG) em aumentos de 2000 a 50000 vezes para as micropartículas MP03 (A e B) e MP04 (C e D).

Pela observação das fotos, pode-se notar, segundo a técnica de análise empregada, que as características morfológicas das micropartículas obtidas mostraram-se dependentes da proporção fármaco:polímero de cada sistema. Ao se empregar a formulação MP03 (proporção fármaco: polímero 1: 5) as micropartículas apresentaram uma forma bastante esférica, sem ranhuras ou falhas. Não foi possível observar poros na partícula. Também não observaram-se cristais de fármaco na superfície das partículas. Acredita-se que o aspecto escamado observado no aumento de 20000 vezes de uma micropartícula (Figura 38B) se deva à forma de organização desse polímero. No entanto, ao se empregar a formulação MP04 (proporção fármaco:polímero 1:10) as partículas se mostram bastante disformes.

Dessa forma, as micropartículas MP03 foram selecionadas para se dar continuidade aos estudos de caracterização e proceder aos estudos de permeação através da córnea por apresentarem tamanho de partícula ($1,3 \pm 0,50 \mu\text{m}$) e morfologia adequados.

5.4.5. Eficiência da microencapsulação

A eficiência de encapsulação representa a porcentagem de fármaco que o sistema é capaz de encapsular. Neste trabalho, tal parâmetro foi obtido pela razão entre a quantidade de FLU extraído de 10 mg da micropartícula polimérica e a quantidade de FLU teoricamente presente na mesma quantidade de partícula, levando-se em consideração a proporção fármaco:polímero da formulação. A Tabela 15 apresenta os valores encontrados de eficiência de encapsulação do FLU para cada uma das micropartículas de Eudragit[®] obtidas. Esses valores se mostraram em torno de 90%. Os maiores valores de eficiência de encapsulação foram obtidos quando se trabalhou com maiores proporções de fármaco em relação a polímero (1:5), no entanto a diferença entre as formulações não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Al Zoubi *et al.* (2008) também obtiveram altas eficiências de encapsulação (entre 98 e 102%) quando prepararam micropartículas de Eudragit[®] para encapsular a Buspirona, independente da proporção fármaco:polímero utilizada (AL ZOUBI *et al.*, 2008).

5.4.5.1. Eficiência real de microencapsulação

A liberação de fármacos a partir de sistemas nano/microencapsulados normalmente apresenta “*burst effect*”, ou seja, uma quantidade de fármaco é rapidamente liberada no meio em que as partículas são dispersas e depois essa liberação torna-se sustentada. Provavelmente essa primeira quantidade de fármaco liberada não se encontra em associação íntima com a matriz polimérica, está presente na superfície da partícula ou representa moléculas individuais de fármaco dissolvidas na matriz polimétrica e rapidamente solúveis em meio aquoso (RIVERA *et al.*, 2004).

A partir dos resultados de eficiência de encapsulação da formulação MP03 (que apresentou melhor diâmetro médio) tem-se que cada 100 mg de partículas contém 15,59 mg de FLU. Ou seja, a proporção teórica de fármaco:polímero era de 1:5, referente a 16,66% de fármaco. Como obteve-se eficiência de encapsulação de 93,93%, a porcentagem de fármaco real foi de 15,59%. Sendo assim, 5mg de micropartículas contém 779,5 µg de FLU.

Após dispersão de 5 mg de micropartículas em 10 mL de solução aquosa de poloxamer 0,5%, banho de ultrassom e centrifugação, foi encontrado no sobrenadante

$395,4 \pm 0,870$ µg de FLU. Aplicando-se a Equação IX tem-se eficiência real de encapsulação de **$49,28 \pm 1,12$ %**.

A partir destes cálculos é possível inferir ainda que a cada 100 mg de partículas, 7,68 mg de FLU encontram-se associados à matriz polimérica, enquanto que 7,91 mg são prontamente liberados.

Estes cálculos são importantes para se determinar qual a concentração de micropartículas necessária para uma determinada terapia e também para previsão da janela de segurança, a fim de se evitar efeitos tóxicos locais causados pela liberação imediata (“*burst effect*”) de praticamente metade da quantidade total de fármaco da formulação.

5.4.6. Potencial zeta

O valor de potencial zeta obtido para as micropartículas foi de + **$30,4 (\pm 5,95)$ mV**. Este residual de cargas positivas em torno delas deve ter sido conferido pelo Eudragit[®] RS, um polímero catiônico. Também Socha *et al.* (2009) ao caracterizarem nanopartículas de insulina observaram que o potencial zeta foi positivo sempre que Eudragit[®] foi parte constituinte da matrix (SOCHA *et al.*, 2009). Como já foi exposto anteriormente, estas cargas podem trazer algumas vantagens ao sistema, à medida que evita a aglomeração das micropartículas, além de possibilitar interações com a superfície ocular que possui residual negativo, aumentando, assim, o tempo de residência da formulação.

Dessa forma, as micropartículas MP03 foram selecionadas para se dar continuidade aos estudos de permeação através da córnea por apresentarem tamanho de partícula ($1,3 \pm 0,50$ µm), morfologia e eficiência de encapsulação (aproximadamente 50%) adequados.

5.5. Estudos *in vitro* de liberação e permeação

5.5.1. Células de difusão: validação dos elementos mecânicos

O volume do compartimento receptor de cada célula de difusão bem como o diâmetro e a área de difusão medidos nas células de difusão desenvolvidas encontram-se apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Volume do compartimento receptor, diâmetro e área de difusão de cada célula de difusão.

Célula de difusão	Volume do compartimento receptor (mL)*	Diâmetro (mm)	Área (cm ²) [#]
1	34,58 ± 0,06	88	0,61
2	34,10 ± 0,10	93	0,68
3	33,81 ± 0,18	93	0,68
4	36,16 ± 0,23	91	0,65
5	33,53 ± 0,11	91	0,65
6	35,29 ± 0,13	88	0,61
7	35,09 ± 0,10	90	0,64
8	34,51 ± 0,07	90	0,64
Média	34,63 ± 0,86	90,50 ± 1,93	0,64 ± 0,03

*Os valores representam a média de cinco determinações (n=5); # Valores obtidos através da equação $A = \pi r^2$

Os volumes do compartimento receptor e a área de difusão se mostraram, portanto, homogêneos, com coeficientes de variação de apenas 2,48 e 4,26%, respectivamente.

Quanto ao controle de temperatura, o tempo necessário para o compartimento receptor (inicialmente a 27°C) atingir a mesma temperatura do banho externo (35°C) foi de 15 min. Foi observada uma diferença de 1°C entre o compartimento receptor e o compartimento doador. Nestes experimentos, após 15 min o compartimento doador atingiu as temperaturas de 35°C ± 1°C. Isto garante que a temperatura na superfície da membrana, uma vez que o sistema é montado com banho circulante a 35°C, seja mantida entre 34 e 36°C.

O fármaco difundido do compartimento doador deve distribuir-se de forma homogênea no compartimento receptor para que, no momento da coleta, a fração coletada corresponda à verdadeira concentração de fármaco difundida. Para que isso ocorra o sistema de agitação interno deve ser eficiente.

Quando 25 µL de corante foi adicionado ao compartimento receptor, foi observada homogeneização imediata. Desta forma, pode-se assegurar que nos experimentos de permeação e liberação *in vitro* a concentração de fármaco amostrada corresponde à concentração presente no compartimento receptor.

5.5.2. Estudos de integridade da córnea

As córneas utilizadas nos experimentos provêm de porcos na idade de abatimento. A córnea de porco vem sendo muito usada *in vitro* porque é de fácil aquisição e apresenta permeabilidade semelhante à humana (ZENG *et al.*, 2001; BAYDOUN *et al.*, 2003; CHUNG *et al.*, 2007). Além disso, diversos comitês de Ética do mundo todo vêm impondo restrições ao uso de córneas de coelhos em experimentos *in vitro* e têm sido constante a busca de pesquisadores por membranas alternativas ou por materiais de animais que seriam abatidos para consumo humano (REICHL *et al.*, 2005). Por exemplo, córneas de ovelhas, carneiros e búfalos já foram utilizadas na avaliação *in vitro* dos efeitos de diversos promotores de absorção para permeação da moxifloxacina (PAWAR *et al.*, 2006).

A córnea é o principal tecido através do qual se dá a entrada de fármacos aplicados topicamente nos olhos. Ela é composta por três regiões com diferentes propriedades físico-químicas: epitélio (lipofílico), estroma (hidrofílico) e endotélio (lipofílico). Foi observado que o epitélio é a maior barreira para penetração de fármacos, uma vez que suas células superficiais estão unidas por “*tight junctions*” e desmossomos (JARVINEN *et al.*, 1995; BECKER *et al.*, 2007). Ashton *et al.* (1991) avaliaram *in vitro* através da córnea de coelho a permeação do levobunolol e concluíram que as três camadas celulares mais externas do epitélio são a principal barreira à penetração deste fármaco. Além disso, estudos indicam que a permeação após desbridação epitelial é significativamente aumentada (O'DAY *et al.*, 1984; SASAKI *et al.*, 1995; YEE *et al.*, 1997). Yee *et al.* (1997) demonstraram que a permeação do FLU através da córnea de coelhos é aumentada em quase sete vezes após este procedimento. Também Sasaki *et al.* (1995) avaliaram *in vitro* através da córnea de coelho a permeação da FITC-dextrana, um modelo peptídico, e observaram que a penetração foi muito maior quando o epitélio havia sido previamente removido.

Assim, em um estudo *in vitro* de permeação através da córnea é necessário assegurar a integridade deste tecido durante todo o tempo de experimento e, principalmente, a manutenção da função barreira normal do epitélio para que os resultados obtidos sejam confiáveis. No presente trabalho, procurou-se avaliar primeiramente, através dos estudos de microscopia, se a integridade do epitélio é mantida após o transporte para o laboratório, retirada da córnea e durante 6 horas de experimento na célula de difusão desenvolvida. Em seguida avaliou-se com o auxílio da fluoresceína se a função barreira do epitélio é mantida durante todo o tempo de experimento.

5.5.2.1. Microscopia eletrônica de transmissão

Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão do epitélio corneano imediatamente após o abatimento do animal e após seis horas nas células de difusão estão apresentadas, respectivamente, nas Figuras 39 e 40.

Figura 39. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (EM 208-Philips) do controle de epitélio corneano (t_0), contrastado com acetato de uranila e acetato de chumbo. A) Típico epitélio corneano é observado, consistindo de células basais (BC), duas a três camadas de células intermediárias (WC) e camada superficial de células poligonais (SC). Conforme esperado, complexos de adesão são observados em abundância unindo as células superficiais (aumento de 2000 x); B) Células superficiais em maior aumento (SC). As setas mostram os desmossomos entre as células. Alta densidade de microvilos (mv) na superfície das células superficiais (aumento de 8000 x) e C) Células intermediárias com limites sinoidais contendo desmossomos (aumento de 8000 x). Nu = núcleo.

Figura 40. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (EM 208-Philips) do epitélio corneano após 6 horas de experimento (t_{ex6}), contrastado com acetato de uranila e acetato de chumbo. A) O epitélio corneano encontra-se bem preservado com junções intercelulares em abundância (aumento de 8000 x); B) Células superficiais (sc) em maior aumento apresentando desmossomos (setas) e microvilos (mv). Estas estruturas permaneceram intactas (aumento de 25000 x); C) Células intermediárias (WC) mantiveram aparência original com desmossomos em abundância entre as células (aumento de 40000 x) e D) Duas células basais (BC) com superfície basal achatada e membrana de Descemet (Dc). A membrana basal encontrou-se bem preservada contendo hemidesmossomos (pontas de seta) (aumento de 32000 x). St = stroma; cm = membrana celular.

As imagens obtidas mostram que não houve diferenças entre o grupo controle (t_0) e as córneas fixadas ao final do experimento de permeação (t_{ex6}). O epitélio encontrou-se bem preservado, consistindo de uma camada de células colunares basais, aproximadamente três camadas de células intermediárias (aladas) e de duas camadas de células superficiais poligonais. Conforme esperado, complexos de adesão (“*tight junctions*” ou “*zonula ocludens*”) foram observados em abundância unindo as células superficiais. Espaços

intercelulares foram maiores entre as células basais. No tempo t_{ex6} as células superficiais encontraram-se normais e bem integradas. Os microvilos observados na superfície destas células também se encontraram bem preservados. As células intermediárias mostraram limites sinoidais, fator que assegura a boa adesão entre as células, e também apresentaram desmossomos em abundância. As células basais não apresentaram alterações visíveis. A membrana basal permaneceu intacta com grande número de hemidesmossomos.

Dessa forma, os resultados mostraram que as condições experimentais foram capazes de manter as principais estruturas do tecido por 6 horas.

5.5.2.2. Função barreira da córnea

A fluoresceína é utilizada em humanos para determinação da integridade do epitélio (MAURICE, 1967) devido a sua baixa solubilidade (1,77 $\mu\text{g/mL}$) e alto log P (3,35), que acarretam uma permeabilidade através da córnea muito baixa. No presente estudo, quando aplicada na superfície das córneas, a fluoresceína foi detectada no compartimento receptor após 3 horas e a intensidade de fluorescência foi levemente aumentada após 5 horas de experimento. Os valores obtidos foram, no entanto, muito próximos aos valores do experimento controle (branco) indicando a integridade do epitélio.

Thiel *et al.* (2001) ao verificarem por este método a integridade de córneas de porco também detectaram fluoresceína após 3 horas de experimento. Os autores concluíram que este “lag time” indicava a baixa permeabilidade do composto no tecido. Eles verificaram ainda que, após remoção mecânica do epitélio, a permeação de fluoresceína aumentou cerca de 200 vezes.

A concentração de fluoresceína encontrada no compartimento receptor em seis horas de experimento, utilizando uma solução de diacetato de fluoresceína como solução doadora (controle positivo) está apresentada na Figura 41. A determinação da fluoresceína foi realizada conforme o método descrito no item 4.2.6.3.2.

Figura 41. Concentração de fluoresceína no compartimento receptor em seis horas de experimento de permeação *in vitro* de diacetato de fluoresceína (10 µM) como solução doadora. Os valores representam a média e o desvio padrão de quatro determinações (n = 4).

O epitélio da córnea possui reconhecidamente atividade metabólica, devido à ação de esterases, peptidases e proteases. O diacetato de fluoresceína é essencialmente não fluorescente, mas é hidrolizado intracelularmente a fluoresceína, que se difunde para o compartimento receptor. A fluoresceína quantificada no compartimento receptor é, portanto, um indicador de atividade de esterases no tecido (TOROPAINEN *et al.*, 2003).

Conforme esperado, quando o diacetato de fluoresceína foi utilizado como doador, uma alta concentração de fluoresceína foi obtida no compartimento receptor (Figura 41) já nas primeiras horas e não somente após a terceira hora, como foi obtido com a fluoresceína.

Toropainen *et al.* (2003) utilizaram esta metodologia para verificar a viabilidade de um modelo de epitélio para estudos de permeação *in vitro* a partir de células humanas comparando-o a córneas de coelhos. Os autores observaram que a permeação de diacetato de fluoresceína foi 49 e 31 vezes maior no modelo de epitélio e nas córneas de coelho, respectivamente, que a permeação de fluoresceína. No presente trabalho a permeação do pró-fármaco foi 86 vezes maior que a permeação da fluoresceína. Esta maior diferença, no entanto, pode ser relacionada a diferenças na atividade de esterases em córneas de porcos e de coelhos, mas também ao tempo total de experimento. No estudo mencionado anteriormente a permeação foi realizada por 2,5 h no modelo de epitélio e por 4 h nas córneas de coelhos, enquanto que no presente trabalho o experimento foi conduzido por 6 h.

5.5.3. Estudos de liberação *in vitro* do FLU a partir de diferentes formulações

Os resultados referentes ao perfil de liberação *in vitro* do FLU a partir das formulações desenvolvidas, realizados segundo metodologia descrita no item 4.2.6.5. encontram-se na Figura 42.

Figura 42. Perfil de liberação do FLU 0,2%, através de membrana de acetato de celulose, a partir de: (A) solução de quitosana 0,5% (Q0,5), formulação contendo poloxamer 16% e quitosana 0,5% (Q0,5 P16), gel de poloxamer 16% (P16) e uma solução aquosa (sç aquosa); (B) solução de quitosana 1,0% (Q1,0), formulação contendo poloxamer 16% e quitosana 1,0% (Q1,0 P16) e gel de poloxamer 16% (P16) e (C) solução de quitosana 1,5% (Q1,5), formulação contendo poloxamer 16% e quitosana 1,5% (Q1,5 P16) e gel de poloxamer 16%. Os valores representam a média e o desvio padrão de quatro determinações ($n = 4$).

O perfil de liberação do FLU a partir das formulações propostas contendo 0,2% do fármaco incorporado foi analisado por meio de métodos gráficos, relacionando-se a quantidade de fármaco liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h) (Figura 42). Foram utilizados três modelos cinéticos de liberação de fármacos: (i) ordem zero

(concentração $\times$ tempo), (ii) pseudo-primeira ordem (concentração $\times \sqrt{\text{tempo}}$) e (iii) primeira ordem ($\log$ concentração $\times$ tempo). A melhor correlação linear foi obtida quando a concentração de FLU liberado foi relacionada com a $\sqrt{\text{tempo}}$, portanto, a liberação do FLU através da membrana sintética de acetato de celulose, segue cinética de pseudo-primeira ordem (GUY *et al.*, 1990), ou seja, o fluxo do fármaco independe da concentração inicial somente nas primeiras horas.

Os parâmetros cinéticos obtidos nos experimentos de liberação estão relacionados na Tabela 17.

Tabela 17. Parâmetros cinéticos das curvas de liberação do FLU ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo^{1/2}.

Formulação	Q _{6h} (%)	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{1/2}$)	r	D ($\text{cm}^2/\text{s} \times 10^{-5}$)
Q 0,5	37,12 $\pm$ 4,84	724,48 $\pm$ 78,25	0,999	2,00
Q 1,0	33,84 $\pm$ 5,67	657,29 $\pm$ 91,89	0,993	1,67
Q 1,5	24,23 $\pm$ 3,95	562,77 $\pm$ 41,84	0,995	0,85
Q 0,5 P16	11,61 $\pm$ 0,98	248,34 $\pm$ 38,21	0,998	0,20
Q1,0 P16	17,18 $\pm$ 3,21	336,90 $\pm$ 67,95	0,999	0,43
Q 1,5 P16	15,31 $\pm$ 2,90	322,90 $\pm$ 62,60	0,997	0,34
P16	29,51 $\pm$ 2,21	613,06 $\pm$ 68,53	0,993	1,27
Sç aquosa	43,66 $\pm$ 4,30	940,37 $\pm$ 77,81	0,999	2,77

Q quantidade liberada no período de 6 horas de experimento (n=4); J fluxo obtido pela equação da reta do intervalo linear da curva de liberação (“*steady state*”); r coeficiente de correlação linear; D coeficiente de difusão. Cores diferentes representam diferença estatística significativa de fluxos ($p < 0,05$).

A solução aquosa foi aquela que significativamente proporcionou a maior liberação do fármaco (Tabela 17). Consequentemente, o FLU também apresentou o maior coeficiente de difusão a partir da solução aquosa ($2,77 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$). O retardo na liberação do FLU pelas outras formulações pode ser atribuído tanto a maior viscosidade destas em relação à solução aquosa, quanto à afinidade do fármaco pelo polímero. No entanto, não houve diferença estatística significativa entre as formulações monopoliméricas contendo ou somente quitosana em diferentes concentrações ou somente poloxamer 16%. Visto que os experimentos de liberação foram conduzidos a 35°C e que, nesta temperatura, a formulação contendo 16% de poloxamer é um gel, muito mais consistente que as soluções de quitosana (Figura 34) é

possível supor que a menor liberação de FLU a partir de um gel de poloxamer em relação à solução aquosa se dê pela maior consistência do primeiro, enquanto que, a menor liberação a partir das soluções de quitosana em relação à solução aquosa se dê por uma interação entre o polímero e o fármaco.

A quantidade de FLU liberada foi significativamente menor a partir das formulações poliméricas binárias em comparação com todas as outras formulações estudadas. E, entre elas, não houve diferença significativa. Portanto, é possível afirmar que a concentração de quitosana (de 0,5 a 1,5%) não alterou o perfil de liberação do fármaco, enquanto que, estas mesmas soluções de quitosana apresentam propriedades mecânicas (firmeza, dureza, compressibilidade e adesividade) significativamente diferentes (Figuras 34 a 36).

Estes dados reforçam a hipótese de mecanismos diferentes pelos quais tanto o poloxamer, quanto a quitosana retardam a liberação do FLU. E é possível que a menor liberação a partir das formulações poliméricas binárias aconteça devido ao somatório destes mecanismos.

5.5.4. Estudos de permeação *in vitro* do FLU a partir de diferentes formulações

5.5.4.1. Géis termorreversíveis

Os perfis de permeação ocular *in vitro* do FLU a partir dos géis termorreversíveis de poloxamer contendo diferentes concentrações de quitosana (0,5; 1,0 e 1,5% p/p) encontram-se apresentados na Figura 43. Formulações contendo ambos os polímeros separadamente ou apenas solução aquosa do fármaco foram utilizados como controle. Os resultados obtidos dos controles também encontram-se apresentados na Figura 43.

Figura 43. Perfil de permeação do FLU 0,2%, através da córnea de porco, a partir de: (A) solução de quitosana 0,5% (Q0,5), formulação contendo poloxamer 16% e quitosana 0,5% (Q0,5 P16), gel de poloxamer 16% (P16) e uma solução aquosa (sç aquosa); (B) solução de quitosana 1,0% (Q1,0), formulação contendo poloxamer 16% e quitosana 1,0% (Q1,0 P16) e gel de poloxamer 16% (P16) e (C) solução de quitosana 1,5% (Q1,5), formulação contendo poloxamer 16% e quitosana 1,5% (Q1,5 P16) e gel de poloxamer 16%. Os valores representam a média e o desvio padrão de quatro determinações (n = 4).

A Tabela 18 apresenta os parâmetros cinéticos de permeação ocular *in vitro* do FLU a partir das diferentes formulações poliméricas.

Tabela 18. Parâmetros cinéticos de permeação ocular *in vitro* do FLU a partir de diferentes formulações.

Formulação	Q_{6h} (%)	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$)	r	FP
Q 1,5	$12,59 \pm 1,80$	$83,31 \pm 11,79$	0,998	5,29
Q 1,0	$11,06 \pm 0,80$	$73,27 \pm 12,43$	0,998	4,65
Q 0,5	$9,07 \pm 2,02$	$59,24 \pm 13,90$	0,995	3,81
Q 1,5 P16	$5,26 \pm 0,22$	$33,38 \pm 4,59$	0,996	2,21
Q1,0 P16	$6,16 \pm 0,79$	$40,09 \pm 4,35$	0,994	2,59
Q 0,5 P16	$5,46 \pm 0,16$	$35,43 \pm 3,71$	0,994	2,29
P16	$2,83 \pm 0,40$	$19,70 \pm 2,47$	0,993	1,19
Sç aquosa	$2,38 \pm 1,34$	$15,79 \pm 0,94$	0,993	-

Q quantidade permeada no período de 6 horas de experimento (n=4); J fluxo obtido pela equação da reta do intervalo linear da curva de permeação (“*steady state*”); r coeficiente de correlação linear; FP fator de promoção (relação entre o fluxo das formulações poliméricas e a solução aquosa controle). Cores diferentes representam diferença estatística significativa de fluxos ($p < 0,05$).

A quantidade de FLU que permaneceu retido na córnea ao final dos experimentos *in vitro* de permeação a partir das formulações poliméricas está apresentada na Figura 44.

Figura 44. Quantidade de FLU que permaneceu retido na córnea ao final dos experimentos *in vitro* de permeação. Diferentes cores representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Os valores representam a média e o desvio padrão de quatro determinações (n = 4).

A melhor correlação linear foi obtida quando a concentração de FLU permeado foi relacionada com o tempo, portanto, a permeação do FLU através da córnea de porco, segue

cinética de ordem zero, ou seja, a velocidade de permeação independe da concentração de fármaco presente no doador (GUY *et al.*, 1990).

A Figura 43 mostra o perfil de permeação do FLU a partir de formulações contendo 0,2% do fármaco. As soluções de quitosana foram as que proporcionaram a maior permeação do fármaco (Tabela 18), sendo que, estatisticamente, a concentração de quitosana não alterou a permeação. Quanto à quantidade de fármaco retido na córnea após seis horas de experimento, as soluções de quitosana também foram aquelas que proporcionaram maior retenção do fármaco no tecido. Estes estudos comprovam o efeito esperado para a quitosana de atuar como promotor de permeação.

Por exemplo, Felt *et al.* (2001) relataram que simplesmente adicionando-se quitosana a uma solução de ofloxacina aumentou-se a biodisponibilidade do fármaco e o tempo de permanência da formulação na região de aplicação em comparação com a solução oftálmica comercial de ofloxacina. Também Yamaguchi *et al.* (2009) relataram aumento de quase quatro vezes na quantidade de indometacina permeada através da córnea a partir de uma emulsão contendo quitosana, em comparação com a mesma formulação sem a adição de quitosana.

A quantidade de FLU permeado foi significativamente menor a partir da solução aquosa e do gel de poloxamer, sendo que não houve diferença estatística entre os fluxos de permeação a partir destas formulações (Tabela 18), apesar da liberação do fármaco ter sido maior a partir da solução aquosa (Figura 42). Este fato sugere que, a partir destas duas formulações, o fator limitante para a permeação *in vitro* é a própria impermeabilidade da córnea.

Quando ocorre adição de quitosana ao gel de poloxamer, a quitosana atua como um promotor de absorção, alterando a função barreira do tecido. Isso explica a maior quantidade de FLU permeado a partir das formulações poliméricas binárias em relação à solução aquosa e ao gel de poloxamer (Figura 43). Uma vez que a função barreira é alterada, a quantidade de fármaco passível de ser liberada passa a ter maior relevância. Como observado anteriormente (Figura 42), a liberação do FLU é significativamente menor a partir das formulações poliméricas binárias, o que poderia explicar a menor permeação do fármaco a partir destas em relação às soluções monopoliméricas de quitosana. De maneira semelhante, a quantidade de fármaco que permaneceu retido na córnea foi maior quando soluções de quitosana foram utilizadas. A variação da concentração de quitosana de 0,5 a 1,5% m/m não resultou em diferença significativa, tanto nas soluções, como nos géis.

Para incorporação das micropartículas nos estudos subsequentes, foi escolhido o gel de poloxamer/quitosana 16:1 por apresentar maior mucoadesão que a formulação contendo 16:0,5 (Tabela 14) e não apresentar diferença estatística significativa quanto a permeação da formulação contendo 16:1,5 destes polímeros. Além disso, a formulação Q1,0 P16 é mais facilmente administrada, devido ao fato de apresentar menor dureza (Figura 34) que aquela contendo 1,5% de quitosana.

5.5.4.2. Micropartículas

A Figura 45 mostra a quantidade de FLU permeado passivamente através da córnea quando livre em solução aquosa (0,2 mg/mL) ou quando presente na forma microencapsulada (12,82 mg de partículas/mL, que contém 0,2 mg/mL de FLU). Em seguida, o mesmo experimento de permeação foi repetido. No entanto, em vez da solução aquosa utilizou-se o gel termorreversível de poloxamer/quitosana 16:1. A Figura 46 apresenta o perfil de permeação do FLU quando 12,82 mg de partículas/mL foram incorporadas no gel. A comparação é feita com o perfil de permeação do fármaco livre (0,2 mg/mL) no gel termorreversível. Os parâmetros cinéticos e os dados obtidos nos experimentos de permeação e retenção ocular do FLU a partir das diferentes formulações contendo micropartículas e os respectivos controles contendo o fármaco livre para comparação estão apresentados na Tabela 19.

Figura 45. Perfil de permeação do FLU 0,2%, através da córnea de porco quando livre em solução aquosa (sç aquosa) e quando presente na forma de micropartículas de Eudragit® (MP03 em sç). As micropartículas (12,82 mg de partículas/mL) foram suspensas em solução aquosa de poloxamer 0,5%. Os valores representam a média e o desvio padrão de quatro determinações (n = 4).

Figura 46. Perfil de permeação do FLU 0,2%, através da córnea de porco, a partir de micropartículas de Eudragit® (12,82 mg de partículas/mL) incorporadas no gel de poloxamer/quitosana (16 e 1,0%, respectivamente) (MP03 em Q1,0 P16). A comparação é feita com o perfil de permeação do fármaco livre no gel termorreversível (Q1,0 P16). Os valores representam a média e o desvio padrão de quatro determinações (n = 4).

Tabela 19. Parâmetros cinéticos e os dados obtidos de permeação e retenção ocular *in vitro* do FLU na forma livre e encapsulada (MP03) a partir das diferentes formulações.

Formulação	Q _{6h} (%)	Q _{retida} (µg/cm ²)	J (µg/cm ² .h ⁻¹)	R
Livre em sç aquosa	2,38 ± 1,19	45,59 ± 3,08	15,79 ± 0,94	0,993
MP03 em sç	0,99 ± 0,19	30,88 ± 9,83	8,07 ± 1,91	0,996
Livre em Q1,0 P16	6,16 ± 0,79	68,20 ± 8,98	40,09 ± 4,35	0,994
MP03 em Q1,0 P16	3,13 ± 0,50	59,29 ± 3,03	25,35 ± 4,05	0,997

Q_{6h} quantidade permeada no período de 6 horas de experimento (n=4); Q_{retida} quantidade de fármaco retido na córnea após 6 horas de experimento (n=4); J fluxo obtido pela equação da reta do intervalo linear da curva de permeação (“steady state”); r coeficiente de correlação linear.

A melhor correlação linear foi obtida quando a concentração de FLU permeado foi relacionada com o tempo, portanto, a permeação do FLU através da córnea de porco, segue cinética de ordem zero, ou seja, a velocidade de permeação independe da concentração de fármaco presente no doador (GUY *et al.*, 1990).

A quantidade de FLU permeado a partir das micropartículas foi significativamente menor que a quantidade permeada quando o fármaco estava livre, independentemente da formulação (se solução aquosa ou gel). O fluxo de permeação do fármaco encapsulado foi cerca de 50% do fluxo de permeação do fármaco livre, independentemente da formulação. Estes valores podem ser explicados pela encapsulação real do fármaco (item 5.4.5.1.), ou seja,

foi confirmado que quando as micropartículas são suspensas em uma solução aquosa ou incorporadas em um gel, cerca de 50% do fármaco é prontamente liberado das partículas para o meio. Dessa forma, 50% do total de fármaco deve permanecer associado à partícula, que funcionaria como um sistema de reserva. A atividade termodinâmica do sistema então se equivale à metade da atividade termodinâmica de um sistema contendo 100% de fármaco livre, e, conseqüentemente, a permeação passiva é reduzida. O conceito de atividade termodinâmica representa a tendência que o fármaco tem em “liberar-se” do veículo, sendo diretamente proporcional à quantidade de fármaco solúvel no veículo e máxima em soluções saturadas (HIGUCHI, 1960; MATSUDA *et al.*, 1999). Portanto, supõe-se que o aumento nesta atividade leve ao aumento da velocidade de permeação do fármaco através da córnea, ou seja, que leve ao aumento do fluxo de permeação, o que explica o maior fluxo obtido quando o fármaco estava livre na formulação.

O fato de 50% do fármaco não ter sido prontamente liberado pode ser vantajoso para uma ação prolongada. No entanto, para uma aplicação tópica, mais estudos seriam necessários, a fim de se verificar se há maior retenção do sistema. Como as micropartículas foram capazes de controlar a liberação do FLU, elas poderiam ser utilizadas para aplicação intraocular, em casos em que a infecção atingisse estruturas mais internas do globo ocular. Além disso, o tamanho das micropartículas obtidas é adequado para a aplicação intraocular, ou seja, de 1 a 12 μm (HACHICHA *et al.*, 2006). De fato, a aplicação intraocular de sistemas particulados oferece inúmeras vantagens à terapia, como proteção e liberação controlada do fármaco, possibilidade de diminuição da dose, evitando toxicidade local e aumento do tempo de intervalo entre aplicações, reduzindo os riscos dessa aplicação invasiva (BEJJANI *et al.*, 2003). Foi verificado, por exemplo, que microesferas de PLA podem permanecer no humor vítreo por até um mês e meio após sua aplicação em olhos de coelho (HSU, 2007). No entanto, para a aplicação intraocular das micropartículas de Eudragit® e FLU mais estudos seriam necessários.

Em relação à quantidade de fármaco retido na córnea ao final do experimento de permeação, mesmo apesar de o fármaco microencapsulado aparentemente ter ficado menos retido, não houve diferença estatística significativa entre o fármaco livre e encapsulado nas diferentes formulações. Uma possível hipótese para este fato é que a concentração de fármaco que permanece retido na córnea depende mais das características da membrana que da concentração de fármaco no sistema dentro das faixas de concentração utilizadas. Corrobora para esta hipótese o fato da retenção ter sido significativamente aumentada na presença de um promotor de permeação (a quitosana presente na formulação do gel). Tanto o fármaco livre,

quanto encapsulado apresentaram maior retenção quando um promotor estava presente no sistema, e, também neste caso, a condição do fármaco (livre ou encapsulado) não influenciou significativamente na retenção.

Encontram-se na literatura vários estudos a respeito da utilização da quitosana como promotor de absorção (ALONSO *et al.*, 2003; ZAMBITO *et al.*, 2006; FOGERT *et al.*, 2007). Os próprios resultados obtidos confirmaram esta propriedade. A modulação das junções intercelulares e a alteração da permeabilidade do epitélio podem alterar as propriedades da córnea, aumentando o coeficiente de partilha solução/córnea, aumentando, portanto, o acúmulo de fármaco no tecido.

5.5.4.3. Iontoforese ocular *in vitro*

A iontoforese transcorneana tem sido capaz de liberar altas concentrações de fármaco nos segmentos da câmara anterior do globo ocular (córnea, humor aquoso, corpo ciliar, íris e cristalino), com o potencial de tratar doenças que atingem estas estruturas, como: ceratites, glaucoma, úlceras corneanas e inflamações, entre outras (ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2006). A iontoforese transcorneana de antibióticos para o tratamento de úlceras corneanas, por exemplo, tem-se demonstrado promissora. Diversos estudos relatam a maior permeação do fármaco na câmara anterior após aplicação da corrente em comparação com colírios convencionais (ROOTMAN *et al.*, 1988; CHOI *et al.*, 1988; GROSSMAN *et al.*, 1990; FRUCHT-PERY *et al.*, 2004; ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2004). A eficácia de tal tratamento foi investigada em modelo animal com infecção induzida por pseudomonas. A iontoforese de gentamicina, tobramicina e ciprofloxacino resultou em número significativamente menor de colônias na córnea em comparação com a administração frequente de colírios convencionais (ROOTMAN *et al.*, 1988; HOBDEN *et al.*, 1989; HOBDEN *et al.*, 1990; FRUCHT-PERY *et al.*, 2006). Também a concentração de cetonaazol na córnea e humor aquoso após iontoforese transcorneana demonstrou-se superior à injeção subconjuntival (GROSSMAN *et al.*, 1989).

No entanto, o primeiro passo na investigação do potencial de aplicação da iontoforese a uma determinada terapia é a confirmação da estabilidade do fármaco após a passagem da corrente elétrica. No presente estudo o FLU mostrou-se estável após a passagem de uma corrente de 0,6 mA. Após 6 horas de experimento $99,46 \pm 2,87\%$ do fármaco foi recuperado da solução salina.

Apesar de a iontoforese ter sido muito estudada para a liberação transdérmica de fármacos e os mecanismos de eletrorepulsão e eletrosmose terem sido elucidados, o conhecimento adquirido para a via transdérmica não se aplica necessariamente à via transcorneana, principalmente por duas razões: primeiramente pelas diferentes características dessas duas membranas (em termos de composição e porosidade) e segundo, devido à diferente densidade de corrente que pode ser aplicada em cada caso. De fato, a literatura sobre iontoforese transdérmica normalmente limita a densidade da corrente a $0,5 \text{ mA/cm}^2$ (LOPEZ *et al.*, 2003a; LOPEZ *et al.*, 2003b; GELFUSO *et al.*, 2008; GRATIERI *et al.*, 2008). Já no caso da iontoforese transcorneana, encontram-se descritos experimentos utilizando de $0,5 \text{ mA/cm}^2$ até densidades mais altas como 21 mA/cm^2 (HUGHES *et al.*, 1984; GROSSMAN *et al.*, 1989; FRUCHT-PERY *et al.*, 2004), sendo que, recentemente, Vaka *et al.* (2008), por exemplo, demonstraram que a aplicação de $6,25 \text{ mA/cm}^2$ por 5 minutos na córnea de coelhos foi segura.

A possibilidade de se aplicar maior intensidade de corrente (i) deve-se ao fato de a córnea possuir menor resistência elétrica (R) que a pele. De acordo com a lei de Ohm ($V = iR$), se a resistência é menor, a intensidade da corrente pode ser aumentada sem que a voltagem (V) aumente, não ocasionando, portanto, dano ao tecido (NICOLI *et al.*, 2009).

Neste trabalho optou-se por investigar a iontoforese do FLU através da córnea utilizando duas intensidades de corrente: $0,3$ e $0,6 \text{ mA}$, correspondentes às densidades de $0,5$ e $1,0 \text{ mA/cm}^2$. As voltagens foram acompanhadas em cada célula e a resistência do tecido calculada. Os resultados obtidos nos experimentos de iontoforese a $1,0 \text{ mA/cm}^2$ estão apresentados na Figura 47.

Figura 47. Perfil de resistência da córnea ao longo do experimento de iontoforese empregando corrente de $1,0 \text{ mA/cm}^2$. Os valores representam a média e o desvio padrão de quatro determinações ($n = 4$).

A resistência da córnea se deve principalmente às junções intercelulares das células do epitélio, o que, como dito anteriormente, é responsável pela função barreira deste tecido (KUSANO *et al.*, 2010). A córnea apresentou uma alta resistência no início dos experimentos *in vitro* de iontoforese e, após cerca de 30 min de passagem da corrente elétrica até 5 horas de experimento tal valor se manteve estável. Durante a última hora de experimento a voltagem do sistema variou consideravelmente (cerca de 84%). No entanto, tal fenômeno está mais relacionado às condições eletrolíticas do sistema que à variação da resistência da córnea, uma vez que, se houvesse algum dano ao tecido, a tendência seria a diminuição desse valor. Provavelmente, após 5 horas de experimento, a voltagem variou devido à depleção de prata na superfície do eletrodo positivo, ou à depleção de NaCl em solução, necessário para as trocas eletrolíticas nos eletrodos.

Esta alta resistência no início da passagem da corrente e declínio ao longo do experimento também foi observada por Rojanasakul *et al.* (1990). Estes autores obtiveram valores de resistências de aproximadamente $700 \Omega \cdot \text{cm}^2$ no início dos experimentos *in vitro* utilizando córneas de coelho e de aproximadamente $400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ após cerca de duas horas. Os autores concluíram que a alta resistência no início da passagem da corrente é induzida pela mudança de potencial na membrana (ROJANASAKUL *et al.*, 1990).

Dessa forma, os valores encontrados no presente trabalho ($\sim 450 \Omega \cdot \text{cm}^2$) se correlacionam bem com os valores encontrados na literatura ($\sim$ de 400 a $700 \Omega \cdot \text{cm}^2$) (ROJANASAKUL *et al.*, 1990; KUSANO *et al.*, 2010), sendo que os valores de resistência da córnea são próximos aos encontrados para a mucosa bucal ($\sim$ de 100 a $335 \Omega \cdot \text{cm}^2$) (MOSCICKA-STUDZINSKA *et al.*, 2009) e menores que aqueles encontrados para a pele ($\sim 1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$) (PIKAL *et al.*, 1990).

A Figura 48 mostra a influência da iontoforese na permeação do fármaco livre em solução. Uma comparação é feita com a permeação passiva do fármaco. A Tabela 20 apresenta os parâmetros cinéticos e os dados obtidos de permeação e retenção ocular *in vitro* do FLU com ou sem a aplicação da corrente elétrica.

Figura 48. Perfil de permeação iontoforética do FLU 0,2%, através da córnea de porco, a partir de solução aquosa (iontoforese 0,5 mA/cm² e iontoforese 1,0 mA/cm²). As soluções doadoras foram acrescidas de NaCl 67,15 e 134,3 mM, respectivamente, e colocadas em contato com o eletrodo positivo (ânodo) por 6 horas de experimento. Os valores representam a média e o desvio padrão de quatro determinações (n = 4). Uma comparação é feita com a permeação passiva do fármaco livre em solução aquosa (passivo).

Tabela 20. Parâmetros cinéticos e os dados obtidos de permeação e retenção ocular *in vitro* do FLU com ou sem a aplicação da corrente elétrica.

Densidade de corrente	Q _{perm} (µg)	Q _{perm} (%)	Q _{retida} (µg)	J (µg/cm ² .h ⁻¹)	r
0,5 mA/cm ²	113,09 ± 13,78	5,65 ± 0,69	76,42 ± 14,57	37,15 ± 4,11	0,996
1,0 mA/cm ²	118,42 ± 8,98	5,92 ± 0,45	59,06 ± 8,23	39,95 ± 2,39	0,995
- *	47,61 ± 5,67	2,38 ± 0,05	29,18 ± 1,97	15,75 ± 0,94	0,993

Q_{perm} quantidade de fármaco permeada no período de 6 horas de experimento (n=4); Q_{retida} quantidade de fármaco retido na córnea após 6 horas de experimento (n=4); J fluxo obtido pela equação da reta do intervalo linear da curva de permeação (“steady state”); r coeficiente de correlação linear; - * permeação passiva. Cores diferentes representam diferença estatística significativa de fluxos (p < 0,05).

Os estudos de iontoforese do FLU a partir de uma solução aquosa demonstraram primeiramente a viabilidade da célula iontoforética desenvolvida (Figura 18). O desenvolvimento desta célula de difusão foi necessário devido à pequena área da córnea, fator que impedia a inserção de dois eletrodos no compartimento superior da célula. Assim, a fim de evitar o uso de pontes salinas, optou-se pela inserção do eletrodo negativo no compartimento receptor (GRATIERI *et al.*, 2010).

Foi observado que a permeação iontoforética do FLU foi aproximadamente duas vezes maior que a passiva e não houve diferença estatística significativa entre a iontoforese

utilizando uma corrente de 0,5 ou 1,0 mA/cm². Nos estudos de iontoforese, as soluções contendo o FLU foram colocadas em contato com o eletrodo positivo. O FLU é uma base extremamente fraca e não ionizável em pH fisiológico, tendo pKa = 2,03 (MATHY *et al.*, 2005). Já a córnea (pI = 3,2) (ROJANASAKUL *et al.*, 1989) se encontra negativamente ionizada neste pH. Sendo assim, a aplicação de um campo elétrico provoca um fluxo eletrosmótico no sentido do ânodo para o cátodo fazendo com que moléculas neutras possam ser liberadas por iontoforese através do ânodo (BURNETTE *et al.*, 1987; LOPEZ *et al.*, 2003a). Portanto, o fluxo eletrosmótico seria o responsável pelo aumento de permeação do FLU provocado pela iontoforese.

A fim de se investigar se tal hipótese é verdadeira, estudou-se também a iontoforese de quantidades equimolares de paracetamol (PCT) (987 µg/mL), uma vez que se trata de uma molécula também hidrossolúvel e neutra nas condições utilizadas (Log P 0,51; pKa 9,7) e de pequena massa molecular (151,17 Da), que vem sendo muito utilizada como marcador de fluxo eletrosmótico (UITTO *et al.*, 2003; ABLA *et al.*, 2005a; ABLA *et al.*, 2005b; NICOLI *et al.*, 2009; TAVEIRA *et al.*, 2009). Os parâmetros cinéticos e os dados obtidos de permeação e retenção ocular *in vitro* do PCT com ou sem a aplicação da corrente elétrica estão apresentados na Tabela 21. Os dados foram analisados segundo metodologia descrita no item 4.2.6.6.1.

Tabela 21. Parâmetros cinéticos e os dados obtidos de permeação e retenção ocular *in vitro* do PCT com ou sem a aplicação da corrente elétrica.

Densidade de corrente	Q _{perm} (µg)	Q _{retida} (µg)	J (µg/cm ² .h ⁻¹)	r
0,5 mA/cm ²	67,28 ± 2,09	32,80 ± 3,79	25,45 ± 0,48	0,999
1,0 mA/cm ²	61,86 ± 7,16	36,72 ± 2,91	23,35 ± 2,17	0,998
-*	30,97 ± 7,03	22,28 ± 1,09	11,68 ± 2,84	0,999

Q_{perm} quantidade de fármaco permeada no período de 6 horas de experimento (n=4); Q_{retida} quantidade de fármaco retido na córnea após 6 horas de experimento (n=4); J fluxo obtido pela equação da reta do intervalo linear da curva de permeação (“steady state”); r coeficiente de correlação linear; -*permeação passiva. Cores diferentes representam diferença estatística significativa de fluxos (p < 0,05).

De maneira semelhante ao que ocorreu com o FLU o aumento da corrente de 0,5 para 1,0 mA/cm² não influenciou a liberação iontoforética do PCT. Isso pode ser explicado pela maior quantidade de NaCl presente na formulação doadora no segundo caso. Essa maior quantidade de íons foi adicionada devido a necessidade de ter mais íons presentes na solução

para transportar a corrente elétrica de maior intensidade. Estudos na literatura mostram que o aumento de espécies iônicas como o NaCl pode diminuir o fluxo eletrosomótico (PIKAL *et al.*, 1990; HAO *et al.*, 2009a) e assim, teria havido uma compensação em relação ao aumento provocado pelo aumento da corrente.

De acordo com a teoria de Nernst-Planck, o fluxo total de uma molécula durante a iontoforese (J_{ionto}) corresponde a:

$$J_{ionto} = J_P + J_{EM} + J_{EO} \quad (\text{Equação VXII})$$

Em que: J_P = fluxo passivo do fármaco;

J_{EM} = contribuição da eletromigração ou eletrorepulsão; e

J_{EO} = contribuição da eletrosmose;

No caso de moléculas neutras como FLU e PCT, o J_{EM} é igual a zero e o J_{EO} depende do volume de solvente transportado por unidade de área em cada tempo (EO ($\mu\text{L}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$)), ou seja, do fluxo de solvente através da córnea induzido pela passagem da corrente elétrica, que pode ser calculado de acordo com a seguinte equação:

$$EO = \frac{J_{EO}}{CD} \times 1000 = \frac{J_{ionto} - J_P}{CD} \times 1000 \quad (\text{Equação XVIII})$$

Em que: CD = concentração de fármaco no doador ($\mu\text{g}/\text{mL}$);

Este cálculo assume que o transporte eletrosmótico da molécula estudada é proporcional à sua concentração na solução doadora. Este conceito foi demonstrado como verdadeiro para a permeação transdérmica (MARRO *et al.*, 2001) e utilizado para o cálculo do fluxo eletrosmótico através da esclera (NICOLI *et al.*, 2009), e pode ser aplicado também neste caso.

Portanto, aplicando-se a equação acima aos dados obtidos com a permeação iontoforética do PCT a $0,5 \text{ mA}/\text{cm}^2$, tem-se que o fluxo eletrosmótico (EO) é de $13,95 \pm 0,49 \mu\text{L}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$. Ainda, em 6 h de experimento de iontoforese através de $0,64 \text{ cm}^2$ de área, tem-se que o fluxo de solvente é de **$53,57 \pm 1,88 \mu\text{L}$** .

Considerando-se que a solução doadora contém $2000 \mu\text{g}/\text{mL}$ de FLU, a quantidade de fármaco “carregada” por este volume de solvente seria de $107,14 \pm 3,76 \mu\text{g}$. Assim, se o mecanismo envolvido na permeação iontoforética do FLU for somente o fluxo eletrosmótico

é possível se predizer que a quantidade total de fármaco permeado ($Q_{teórica}$ (μg)) corresponderia a:

$$Q_{teórica} = Q_{retida\ P} + Q_{EM} + Q_P \quad (\text{Equação XIX})$$

Em que: $Q_{retida\ P}$ = quantidade de fármaco retido na córnea ao final da permeação passiva (μg);
 Q_{EM} = quantidade de fármaco “carregada” pelo fluxo eletrosmótico (μg);
 Q_P = quantidade de fármaco permeado através da córnea ao final da permeação passiva (μg);

De acordo com a equação apresentada, $Q_{teórica}$ corresponde a **$183,92 \pm 3,96 \mu\text{g}$** . A quantidade total de fármaco permeado ($Q_{observado}$) corresponde ao somatório da quantidade total de FLU permeado através da córnea após 6 h de experimento e da quantidade que permaneceu retida no tecido. Dessa forma $Q_{observado} = \mathbf{189,52 \pm 25,62 \mu\text{g}}$.

Portanto, nas condições do experimento de iontoforese, a eletrosmose foi o único mecanismo responsável pela promoção da permeação do FLU. Ao estudar a permeação iontoforética de macromoléculas através da córnea, Hao *et al.* (2009) verificaram o aumento significativo da permeação de moléculas não ionizadas após iontoforese anódica, sendo que a iontoforese catódica não foi efetiva. Neste caso, também a eletrosmose mostrou-se ser o mecanismo envolvido na permeação de moléculas neutras, descartando a possibilidade de uma “eletro-permeabilização” da membrana induzida pela passagem da corrente (HAO *et al.*, 2009a). Também Nicoli *et al.* (2009) empregou estes cálculos para predizer a permeação iontoforética transescleral de moléculas neutras de pequena massa molecular. No entanto, neste estudo, apesar da quantidade teórica de fármaco ter sido próxima ao valor observado experimentalmente, os autores não consideraram a quantidade que permaneceu retida no tecido (NICOLI *et al.*, 2009).

Através do presente estudo é possível se observar que a quantidade de fármaco que permanece retido na córnea não é negligenciável. Aliás, a aplicação da iontoforese aumentou em quase três vezes a quantidade de fármaco retido em comparação com a solução aquosa e em quase duas vezes em comparação com o gel de poloxamer/quitosana, formulação que proporcionou o maior fluxo passivo do fármaco.

De acordo com dados apresentados na literatura, sabe-se que, na pele, o transporte eletrosmótico é observado através de vias alternativas de baixa resistência, como através dos folículos pilosos e glândulas sebáceas (UITTO *et al.*, 2003). No entanto, a córnea não possui tais estruturas. Dessa forma, é possível supor que uma parte desse volume de solvente fique retido no tecido, aumentando a hidratação e portanto alterando o coeficiente de partilha do

fármaco solução aquosa/córnea. No entanto, após 6 h de iontoforese *in vitro* as córneas apresentaram aumento de hidratação de apenas 1,4% em relação às córneas submetidas à permeação passiva. Mesmo sendo este resultado estatisticamente não significativo, e mesmo a córnea tendo permanecido transparente ao final dos experimentos, mais estudos para se verificar esse efeito *in vivo* e para garantir a segurança da metodologia são necessários.

Apesar da promoção da permeação do FLU após aplicação da iontoforese não ter sido maior que a promoção promovida passivamente pelo gel termorreversível desenvolvido (cerca de 2 a 3 vezes), a iontoforese pode ser um sistema promissor no tratamento das ceratites fúngicas, pois favorece a retenção do fármaco na córnea.

Nas ceratites fúngicas os fungos se localizam na maioria das vezes no interior da córnea, mais precisamente no estroma. Dessa forma é muito importante a aplicação de sistemas e formulações que favoreçam a retenção de fármaco neste tecido. Nesse sentido, a iontoforese demonstrou ser um sistema muito promissor pois poderia, por exemplo, ser aplicada em consultórios oftalmológicos no início da terapia e o tratamento mantido com a aplicação tópica do gel termorreversível pelo próprio paciente. Neste caso, a iontoforese proporcionaria a liberação rápida e localizada de uma alta concentração de fármaco exatamente no local infectado, evitando exposição sistêmica e toxicidade. A concentração terapêutica seria então mantida com a aplicação tópica do gel termorreversível. De fato, a iontoforese já demonstrou ser capaz de aumentar a retenção de fármacos na córnea. Encontrase descrita na literatura, por exemplo, o acúmulo de gentamicina na parte central da córnea após aplicação de iontoforese por 60 segundos em uma área de 0,2 cm² e corrente de 0.6 mA (FRUCHT-PERY *et al.*, 1999). Neste estudo os autores relataram que o fármaco rapidamente se difundiu por toda a córnea após a aplicação da corrente, sendo que, um estudo subsequente demonstrou concentrações terapêuticas do fármaco mesmo após 8 horas do término da aplicação da corrente (ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2004).

No presente estudo, a iontoforese conseguiu fazer com que o FLU ultrapassasse a primeira barreira hidrofóbica (o epitélio corneano) mas, como o FLU é hidrofílico, ele permaneceu retido no estroma hidrofílico, não se partilhando para a última camada lipofílica (o endotélio). Ao se observar os resultados de retenção do FLU na córnea após aplicação da iontoforese com duas intensidades de corrente (Tabela 20), nota-se que a penetração do fármaco parece depender da intensidade da corrente, ou seja, quando se aumentou a intensidade da corrente de 0,5 para 1,0 mA/cm² a quantidade retida parece ter diminuído, mesmo estes resultados não sendo estatisticamente significativos. Isto significa que, com o aumento da corrente, uma parte do fármaco foi capaz de se partilhar do estroma para o

endotélio e então para o compartimento receptor. Estes resultados podem indicar que aumentando-se ainda mais a corrente o fluxo seria também aumentado. Dessa forma, a quantidade de fármaco hidrofílico permeado ou retido pode ser controlada, portanto, modificando-se a densidade de corrente aplicada. Assim, mais estudos, a fim de se determinar o tempo de aplicação e a intensidade da corrente, seriam necessários.

A Figura 49 mostra a influência da iontoforese na permeação do fármaco encapsulado. Uma comparação é feita com a permeação passiva do fármaco também encapsulado. A Tabela 22 apresenta os parâmetros cinéticos e os dados obtidos de permeação e retenção ocular *in vitro* do FLU encapsulado com ou sem a aplicação da corrente elétrica.

Figura 49. Perfil de permeação iontoforética do FLU através da córnea de porco, a partir de micropartículas de Eudragit em solução aquosa (iontoforese 0,5 mA/cm² e iontoforese 1,0 mA/cm²). As soluções doadoras foram acrescidas de NaCl 67,15 e 134,3 mM, respectivamente, e colocadas em contato com o eletrodo positivo (ânodo) por 6 horas de experimento. Os valores representam a média e o desvio padrão de quatro determinações (n = 4). Uma comparação é feita com a permeação passiva do fármaco encapsulado em solução aquosa (passivo).

Tabela 22. Parâmetros cinéticos e os dados obtidos de permeação e retenção ocular *in vitro* do FLU encapsulado com ou sem a aplicação da corrente elétrica.

Densidade de corrente	Q _{retida} (µg)	J (µg/cm ² .h ⁻¹)	r
0,5 mA/cm ²	70,58 ± 17,32	24,51 ± 2,59	0,998
1,0 mA/cm ²	72,63 ± 20,90	26,49 ± 2,91	0,997
- *	30,88 ± 9,83	8,07 ± 1,91	0,996

Q_{perm} quantidade de fármaco permeado no período de 6 horas de experimento (n=4); Q_{retida} quantidade de fármaco retido na córnea após 6 horas de experimento (n=4); J fluxo obtido pela equação da reta do intervalo linear da curva de permeação (“steady state”); r coeficiente de correlação linear; - * permeação passiva. Cores diferentes representam diferença estatística significativa de fluxos (p < 0,05).

A permeação iontoforética do FLU a partir de micropartículas de Eudragit® em solução aquosa foi cerca de três vezes maior que a permeação passiva do FLU neste sistema, mas, mesmo assim, foi significativamente menor que a permeação iontoforética do fármaco livre em solução. Conforme discutido anteriormente (item 5.5.4.2.) isto se deve provavelmente à menor atividade termodinâmica do sistema quando parte do fármaco se encontra encapsulado. Já em relação à quantidade retida não houve diferença estatística significativa entre o fármaco livre e encapsulado. Em relação à retenção corneana, as características da membrana parecem ser mais importantes que a atividade termodinâmica do sistema. Como observou-se que a condição do fármaco (livre ou encapsulado) não influenciou significativamente a retenção após aplicação passiva (Tabela 19), eram de fato esperadas, após aplicação das mesmas condições iontoforéticas, as mesmas quantidades retidas estando o fármaco livre ou encapsulado. A hipótese de que a partícula positiva seria capaz de carrear a corrente elétrica e promover a permeação do fármaco por eletrorrepulsão, apesar de possível, é pouco provável diante destes resultados, uma vez que a promoção da penetração foi pequena.

Os resultados de permeação e retenção encontram-se resumidos nas Figura 50 e 51.

Figura 50. Velocidades de permeação do FLU através da córnea de porco, representadas pela porção linear das curvas de permeação obtidas nos experimentos de permeação passiva e iontoforética *in vitro*. Cores diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Os valores representam a média e o desvio padrão de quatro determinações ($n = 4$).

Figura 51. Quantidade de FLU que permaneceu retido na córnea ao final dos experimentos *in vitro* de permeação. Cores diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Os valores representam a média e o desvio padrão de quatro determinações ($n = 4$).

Em relação à permeação, o maior fluxo do FLU foi obtido quando utilizou-se o fármaco livre no gel termorreversível de poloxamer/quitosana, sendo que não houve diferença estatística significativa entre o fluxo passivo a partir desta formulação e o fluxo iontoforético do fármaco livre em solução aquosa. Em relação à retenção do fármaco, a maior quantidade permaneceu retida após aplicação da iontoforese, independentemente da formulação. Não foi possível, no entanto, aplicar-se iontoforese ao gel desenvolvido. Provavelmente devido à sua alta viscosidade a 35°C e às cargas positivas da quitosana, a voltagem necessária para a passagem da corrente elétrica foi muito alta (cerca de 20 mV por célula de difusão), o que inviabiliza a sua aplicação em humanos. Apesar de promissora, mais estudos seriam necessários para se determinar o melhor regime clínico de aplicação da iontoforese (tempo de aplicação e intensidade da corrente elétrica) a fim de se otimizar a terapia e conseguir maior permeação do fármaco.

A partir dos dados obtidos é possível concluir que o gel termorreversível de poloxamer/quitosana desenvolvido é mais promissor para a aplicação passiva que as micropartículas para a administração tópica do FLU, uma vez que além de ser mais facilmente produzido, promove maior permeação do ativo.

Para se verificar se o gel termorreversível poderia manter os níveis de fármaco no humor aquoso após aplicação tópica determinou-se o comportamento desta formulação *in vivo*, como descrito a seguir (item 5.7.).

5.6. Ensaio de irritação *in vitro* – modelo organotípico HET-CAM

O potencial irritante do gel termorreversível desenvolvido para incorporação do FLU foi testado empregando-se uma modificação do método proposto por Luepke (1985), que é aceito hoje pela legislação europeia e indicado pela ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária, Brasil) para avaliação de segurança de produtos farmacêuticos e cosméticos (VINARDELL *et al.*, 2006). Apesar de se tratar de um método apenas qualitativo para medir o poder irritante de formulações e com baixa sensibilidade para classificar produtos moderadamente irritantes (DEBBASCH *et al.*, 2005), este tipo de ensaio vem sendo bastante utilizado por ser de simples execução e uma alternativa para ensaios de irritação ocular *in vivo* utilizando coelhos, bastante condenado atualmente pela comunidade científica.

O gel termorreversível de poloxamer/quitosana contendo FLU apresentou-se como um sistema **ligeiramente irritante** segundo a metodologia proposta, por não causar nenhum tipo de hemorragia ou coagulação após 5 min de contato com a CAM. A única alteração que se observou após uma das três aplicações foi uma hiperemia leve após 30 s de contato com a CAM. Acredita-se que esta leve hiperemia seja devido ao pH da formulação (pH = 6,0), o que, no entanto, não compromete o seu uso *in vivo*.

5.7. Estudos *in vivo* de permeação

Em estudos *in vivo*, a temperatura e os fatores fisiológicos são determinados pelo modelo animal. Os coelhos são os principais modelos animais de escolha para estudos de farmacocinética ocular devido aos seguintes aspectos: similaridades anatômicas com o olho humano em tamanho e volume de humor aquoso e relativo baixo custo. No entanto, os olhos de coelho também possuem diferenças dos humanos: menor espessura da córnea (0,35 mm *versus* 0,52 mm em humanos), menor reflexo de piscar, presença de membrana nictante, ou terceira pálpebra (ausente em humanos) e ausência de drenagem pela via do fluxo uvoescleral. As semelhanças e diferenças devem ser levadas em conta durante a interpretação dos resultados (RITTENHOUSE *et al.*, 2000).

Para os estudos *in vivo* foi escolhido o gel termorreversível *in situ* composto por quitosana/ poloxamer (Q1,0 P16), por ser a formulação que apresentou o maior fluxo de

permeação e maior facilidade de preparo e administração. Nos estudos *in vivo* optou-se pela incorporação de 0,4% de FLU, em vez de 0,2% como havia sendo feito. O objetivo desta modificação foi aumentar a quantidade total de fármaco permeado, visando obter nas amostras uma quantidade suficiente para quantificação pelo método analítico desenvolvido.

5.7.1. Microdiálise

Estudos para avaliação da permeação de ativos através da córnea para a câmara anterior *in vivo* são laboriosos, pois, apesar de se tratar de um órgão de fácil acesso, o volume do humor aquoso na câmara anterior, necessário para a quantificação do fármaco que atravessou a córnea, é muito pequeno (~200 µL), o que requer emprego de muitos animais, e, não raro, um animal é utilizado somente para obtenção de um ponto de uma curva cinética (MOSTELLER *et al.*, 1985). Um estudo típico farmacocinético envolveria o uso de 30 a 48 animais, seis para cada ponto da curva por tempo. Durante o estudo seria realizada uma amostragem de aproximadamente 100 µL de humor aquoso por paracentese, precedida por anestesia local ou sistêmica. Usualmente este procedimento é terminal; após cada amostragem o animal é sacrificado. Por exemplo, El-Kamel (2002) comparou a biodisponibilidade de timolol aplicado topicamente a partir de dois géis termorreversíveis e uma solução controle. Para isto, o autor quantificou o fármaco presente no humor aquoso em seis tempos diferentes. Três coelhos foram sacrificados a cada intervalo de tempo. Desta forma, este estudo utilizou no mínimo 54 animais (EL KAMEL, 2002).

A microdiálise é uma técnica que permite o monitoramento contínuo da concentração de uma substância no espaço extracelular de tecidos ou órgãos provocando apenas interferência mínima na fisiologia deste tecido. Ela é capaz de responder a importantes questões utilizando um número muito menor de animais. Como não há introdução nem retirada de fluidos, o processo não é terminal, o que possibilita a obtenção de uma curva farmacocinética completa utilizando-se apenas um animal (MACHA *et al.*, 2001). Além disso, a farmacocinética pode ser determinada de maneira mais precisa, pois há menor variabilidade interindividual (OHTORI *et al.*, 1998). Alguns estudos recentes utilizaram a microdiálise na câmara anterior, com a inserção de sondas lineares, conforme esquema utilizado neste trabalho, para a avaliação de formulações oftálmicas contendo promotores de permeação (LIU *et al.*, 2005), propriedades bioadesivas (AGGARWAL *et al.*, 2007) e/ou propriedades termorreversíveis (WEI *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2007; CAO *et al.*, 2007).

Através da microdialíse, a quantificação de substâncias endógenas e exógenas no espaço extracelular é feita por meio de uma membrana semipermeável na forma de uma sonda, que é constantemente perfundida com uma solução fisiológica a um fluxo baixo (1 - 10 $\mu\text{L}/\text{min}$), mimetizando um capilar sanguíneo (LI *et al.*, 2006). Uma vez que a sonda é implantada no tecido, as substâncias presentes no fluido extracelular (C_{meio}) são filtradas por difusão para o fluido no interior da sonda, resultando numa concentração no meio de perfusão ($C_{\text{dialisado}}$). As amostras são, então, coletadas e analisadas (LI *et al.*, 2006). O equilíbrio da molécula do fármaco entre a membrana de microdialíse, o meio extracelular e o meio de perfusão é um processo dinâmico e requer uma técnica de calibração capaz de estimar a concentração real do fármaco no meio extracelular, uma vez que a concentração de uma substância no dialisado reflete somente uma fração da concentração real presente no meio circundante à sonda (ZHOU *et al.*, 2005). A razão entre a concentração presente do dialisado e a concentração real do meio é denominada recuperação. A recuperação é influenciada por inúmeros fatores tais como fluxo, propriedades da membrana, características físico-químicas da substância, geometria e localização da sonda, temperatura e processos fisiológicos (transporte, metabolismo). Portanto, é necessário que o máximo de fatores sejam controlados e que seja determinada a recuperação para a sonda a ser utilizada nos experimentos de microdialíse.

A geometria e o tamanho da sonda influenciam a recuperação, mas devem ser determinados de acordo com o órgão alvo (WAGA *et al.*, 1995). Para a realização de amostragens no humor vítreo, por exemplo, são utilizadas sondas concêntricas (HUGHES *et al.*, 1996; ATLURI *et al.*, 2008), devido à dificuldade de acesso da câmara posterior do olho, sendo mais fácil a implantação de uma sonda com apenas uma inserção no tecido. No entanto, em alguns casos, como na pele, músculo ou câmara anterior do olho, as sondas lineares minimizam o dano ao tecido por possuírem menor diâmetro e serem mais flexíveis, o que compensa a necessidade de se fazer duas perfurações no tecido, uma de entrada, outra de saída. No caso específico da câmara anterior as sondas lineares vêm sendo muito utilizadas (OHTORI *et al.*, 1998; WEI *et al.*, 2006; ANAND *et al.*, 2006; AGGARWAL *et al.*, 2007) e, estudos indicam que as condições fisiológicas são restabelecidas após duas horas pela reposição do humor aquoso extravasado no momento da inserção (MACHA *et al.*, 2001). No presente estudo foram utilizadas sondas lineares confeccionadas no próprio laboratório, com a finalidade de redução de custos. Vários pesquisadores fazem esta opção (YANG *et al.*, 1997; NAVEGANTES *et al.*, 2003), obtendo, além da vantagem econômica, a possibilidade de

modificar vários parâmetros como tamanho da sonda, material e tamanho de poro da membrana (VERBEECK, 2000).

Apenas moléculas com tamanho menor que o poro da membrana (“*cut off*”) podem ser coletadas. No entanto, para que se obtenha uma recuperação adequada, é necessário que o tamanho da molécula de interesse seja cerca de um quarto do tamanho do poro, uma vez que este é determinado em condições de equilíbrio e, experimentalmente, como há fluxo do perfusado no interior da sonda, este tamanho é reduzido (PLOCK *et al.*, 2005). Por isso, nestes estudos, a fim de se assegurar que o poro da membrana não seria um fator limitante para a recuperação, foi utilizada uma membrana com poro de 3000 Da, ou seja, cerca de dez vezes maior que o FLU (306,27 Da). Ainda, de acordo com a lei de Fick, a difusão através de uma membrana é proporcional à sua área. Desta forma, nestes estudos as sondas foram confeccionadas com um comprimento de 10 mm de forma a ocupar toda a extensão da câmara anterior dos olhos dos animais.

Em experimentos *in vivo*, o fluxo de perfusão é o parâmetro mais fácil de ser controlado experimentalmente para se tentar otimizar a recuperação. De modo geral, fluxos baixos resultam em alta e fluxos altos em baixa recuperação, de acordo com a equação:

$$RR = (1 - e^{-rA/F}) \times 100 \quad (\text{Equação XX})$$

Em que: RR = recuperação relativa;

r = coeficiente de transporte de massa;

A = área da superfície da membrana de microdiálise e

F = fluxo do perfusado.

Entretanto, baixos fluxos de perfusão são limitados pelo baixo volume das amostras coletadas e pelo limite de quantificação do método analítico (PLOCK *et al.*, 2005).

Em nossos experimentos fixou-se um fluxo de 2 µL/min, o qual forneceu uma boa relação entre a recuperação e a quantidade de amostra disponível para o método analítico. Com este fluxo obteve-se uma boa resolução temporal, com amostras coletadas a cada 30 min.

5.7.1.1. Validação da metodologia

Os resultados referentes aos estudos de recuperação *in vitro* e *in vivo* (método de retrodiálise) das sondas utilizadas nos estudos de microdiálise, realizados segundo o método descrito no item 4.2.8.3., encontram-se nas Tabelas 23 e 24, respectivamente.

Tabela 23. Valores referentes à determinação da recuperação *in vitro* das sondas utilizadas nos estudos de microdiálise, para diferentes concentrações de FLU.

Concentração de FLU (µg/mL)	FLU quantificado na solução (µg/mL)	FLU quantificado no dialisado (µg/mL)	Recuperação (%)
1,0	1,03 ± 0,002	0,23 ± 0,020	22,5
2,5	2,50 ± 0,006	0,53 ± 0,017	21,2
5,0	4,84 ± 0,012	1,10 ± 0,041	22,7
10,0	10,41 ± 0,014	2,26 ± 0,065	21,7

Os valores representam a média de três determinações (n=3).

Tabela 24. Valores referentes à determinação da recuperação *in vivo* das sondas utilizadas nos estudos de microdiálise, para o FLU, pelo método da retrodiálise.

Concentração de FLU (µg/mL)	FLU quantificado no perfusado (µg/mL)	FLU quantificado no dialisado (µg/mL)	Recuperação (%)
5,0	5,21 ± 0,017	3,92 ± 0,019	24,76

Os valores representam a média de duas determinações (n=2).

A recuperação *in vitro* do FLU ficou em torno de **22%**, sendo praticamente constante para a faixa de concentração estudada (1,0 a 10,0 µg/mL). Foi observado nesses estudos, que o tempo necessário para ocorrer o equilíbrio entre o perfusado e o dialisado foi de 30 min. Estes estudos comprovam a funcionalidade da sonda de microdiálise antes da implantação no animal e comprovam ainda que a recuperação independe da concentração de fármaco no meio. A recuperação *in vivo* foi praticamente igual à recuperação *in vitro*, em torno de **25%**.

Resultados idênticos de recuperação *in vitro* e *in vivo* para o propranolol na câmara anterior de coelhos (~ 35%) foram reportados por Rittenhouse *et al.* (1998). Marcha & Mitra (2001) em um estudo de validação da microdiálise na câmara anterior de olhos de coelho obtiveram recuperação *in vitro* de 15 a 18% para a fluoresceína utilizando uma sonda linear de 0,32 x 10 mm. Por outro lado, Wei *et al.* (2006), em estudos de microdiálise, obtiveram *in vitro* uma recuperação de 57,67% para o timolol, enquanto que *in vivo* na câmara anterior de

coelhos a recuperação foi de apenas 16,78%. Os autores sugerem que a implantação da sonda possa ter lesionado a íris acarretando formação de fibrina.

5.7.1.2. Permeação *in vivo* do FLU

A Figura 52 é a representação gráfica da concentração de FLU na câmara anterior ($\mu\text{g/mL}$) pelo tempo (horas) permeado a partir das seguintes formulações: (i) solução de quitosana 1,0%; (ii) formulação polimérica binária contendo quitosana 1,0% e poloxamer 16% e (iii) solução aquosa (controle). Dos valores de permeação obtidos foram calculados AUC, $C_{\text{máx}}$ e $t_{\text{máx}}$, cujos valores estão demonstrados na Tabela 25.

Figura 52. Representação gráfica da concentração de FLU na câmara anterior de coelhos ($\mu\text{g/mL}$) em função do tempo (horas), a partir de: Formulação polimérica binária contendo quitosana 1,0% e poloxamer 16% (Q1,0 P16), solução aquosa (sç aquosa) e solução de quitosana 1,0% (Q 1,0). Os valores representam a média e o desvio padrão de quatro determinações ($n = 4$).

Tabela 25. Valores referentes a AUC, $t_{\text{máx}}$ e $C_{\text{máx}}$, calculados a partir do gráfico que relaciona concentração de FLU na câmara anterior pelo tempo, após permeação *in vivo* a partir das seguintes formulações: (i) solução de quitosana 1,0% (Q 1,0); (ii) formulação contendo quitosana 1,0% e poloxamer 16% (Q1,0 P16) e (iii) solução aquosa (sç aquosa).

Formulação	AUC	$t_{\text{máx}}$ (min)	$C_{\text{máx}}$ ($\mu\text{g/mL}$)
Q 1,0**	$21,67 \pm 1,8$	180	$8,14 \pm 0,24$
Q1,0 P16*	$27,45 \pm 9,75$	170 ± 62	$7,24 \pm 2,81$
Sç aquosa*	$6,07 \pm 1,09$	60	$3,23 \pm 0,32$

*Os valores representam a média de quatro determinações, ** Os valores representam a média de duas determinações.

O gráfico que representa o perfil de permeação *in vivo* do FLU através da córnea de coelhos a partir das soluções Q1,0 e aquosa (controle) e da formulação Q1,0 P16 é apresentado na Figura 53.

Figura 53. Perfil de permeação ocular *in vivo* do FLU através da córnea de coelhos a partir de uma formulação polimérica binária (Q1,0 P16) e soluções de quitosana (Q1,0) e aquosa (sç aquosa).

Os parâmetros cinéticos obtidos a partir do perfil de permeação ocular *in vivo* do FLU através da córnea de coelhos a partir das soluções Q1,0 e aquosa (controle) e da formulação Q1,0 P16 estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26. Parâmetros cinéticos de permeação ocular *in vivo* do FLU presente nas seguintes formulações: (i) solução de quitosana 1,0% (Q 1,0); (ii) formulação polimérica binária contendo quitosana 1,0% e poloxamer 16% (Q1,0 P16) e (iii) solução aquosa (sç aquosa).

Formulação	Q _{6h} (%)	Modelo cinético	Fluxo (J)	r
Q1,0 P16	5,55	Ordem zero	35,221 µg/mL.h	0,995
Q 1,0	2,64	Primeira ordem	18,683 log µg/mL.h	0,985
Sç aquosa	1,41	Primeira ordem	6,949 log µg/mL.h	0,973

Q quantidade permeada no período de 6 horas de experimento (n=4); J fluxo obtido pela equação da reta do intervalo linear da curva de permeação (“*steady state*”); r coeficiente de correlação linear; FP fator de promoção (relação entre o fluxo das formulações poliméricas e o controle).

A concentração máxima de FLU no humor aquoso a partir da solução aquosa contendo 0,4% do fármaco foi de $3,23 \pm 0,32 \mu\text{g/mL}$. Estes dados foram próximos a valores encontrados na literatura. Yee *et al.* (1997) obtiveram, após administração tópica de FLU 0,2% em coelhos, $C_{\text{máx}}$ de $1,6 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$, praticamente a metade dos valores encontrados no presente trabalho. Esta diferença parece estar relacionada a menor concentração de FLU na solução, justamente a metade da utilizada no presente trabalho, fato que diminui a atividade termodinâmica.

A permeação *in vivo* do FLU a partir da solução de quitosana e da formulação contendo poloxamer e quitosana aumentou significativamente em relação à solução aquosa. Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os valores obtidos de AUC e $C_{\text{máx}}$ para as formulações Q1,0 e Q1,0 P16. Os valores de AUC obtidos para estas formulações foram cerca de quatro vezes maior em relação ao controle, enquanto a $C_{\text{máx}}$ foi cerca de duas vezes maior. Observando-se o gráfico da concentração de FLU na câmara anterior pelo tempo (Figura 52) é possível notar que a partir das soluções aquosas (controle e Q1,0) a concentração de FLU cai rapidamente após atingir a $C_{\text{máx}}$, enquanto que a partir da formulação Q1,0 P16 essa queda é mais lenta. Sendo que, o $t_{\text{máx}}$ para a solução Q1,0 é de 3 horas enquanto que para a solução controle é de 1 hora.

Primeiramente, quanto ao aumento da permeação *in vivo* do FLU a partir da solução Q1,0, observado através dos valores de AUC (Tabela 25), pode-se verificar que os resultados são condizentes com os dados obtidos nos estudos de permeação *in vitro*, através dos quais a quitosana promoveu a permeação aproximadamente quatro vezes em relação à solução controle (Tabela 18). Já o aumento da permeação *in vivo* do FLU a partir da formulação Q1,0 P16 (quatro vezes) foi maior que aquele observado *in vitro* (aproximadamente duas vezes, Tabela 18).

Cabe ressaltar que nos estudos *in vitro* a quantidade de formulação presente no compartimento doador é constante. Já nos estudos *in vivo* isto não acontece: a formulação é aplicada e, como o animal continua com as suas funções fisiológicas praticamente inalteradas, grande parte da formulação é drenada pelas vias lacrimais. A quantidade de fármaco que penetra através da córnea e chega ao humor aquoso independe do volume aplicado, desde que este volume seja maior que 10 μL (URTTI, 1994; MACHA *et al.*, 2001). No entanto, este fenômeno de drenagem afeta o gradiente de concentração e, portanto, a difusão do fármaco através da córnea (VANDAMME, 2002). De fato, como dito anteriormente, uma das maiores dificuldades no tratamento tópico ocular é o baixo tempo de retenção da formulação (JARVINEN *et al.*, 1995).

Dessa forma, a hipótese que melhor explica o fato de: (i) o decaimento da concentração de FLU na câmara anterior após a $C_{máx}$ ter sido lento a partir da formulação Q1,0 P16 (Figura 52) e (ii) a permeação *in vivo* do FLU a partir da formulação Q1,0 P16 ter sido a mesma que a partir da solução Q1,0 mesmo apesar da última ter proporcionado maior permeação que a primeira *in vitro*, é a hipótese de que a formulação Q1,0 P16 permaneceu na superfície ocular por um tempo prolongado, enquanto que as soluções foram drenadas mais rapidamente.

O pH da solução de quitosana e da formulação Q1,0 P16 é aproximadamente 6,0. Trata-se, portanto, de uma formulação levemente ácida, com pH abaixo do pH fisiológico: 7,4. Desta forma, e de fato isto foi observado, estas formulações induzem o lacrimejamento. No entanto, apesar de ambas conterem 1,0% de quitosana (que possui propriedades mucoadesivas) a formulação Q1,0 P16 permanece por mais tempo no local de aplicação devido às suas propriedades mecânicas. A formulação Q1,0 P16 oferece maior resistência à drenagem, pois possui maior: (i) dureza e firmeza (grandezas que representam a resistência à deformação); (ii) compressibilidade (maior trabalho é necessário para haver compressão) e (iii) adesividade (o trabalho necessário para superar as forças de atração entre a formulação e as superfícies em contato, neste caso a parte interna da pálpebra, a esclera ou a própria córnea) (Figuras 34 a 36). Ainda, o ato de piscar, estimulado pela acidez da formulação, contribui para a estruturação do sistema (aumento do módulo elástico ou de armazenamento, G' , Figura 32).

Wei *et al.* (2006), a fim de desenvolverem uma formulação oftálmica termorreversível, estudaram a farmacocinética do timolol também por microdiálise da câmara anterior após aplicação tópica da formulação. Os autores observaram que, em comparação com uma solução aquosa contendo timolol, os valores obtidos de AUC foram 1,6 maiores a partir do gel termorreversível. Eles concluíram que ao se geleificar a formulação houve maior tempo de retenção proporcionando maiores valores de $C_{máx}$ e $T_{máx}$.

Contribuindo com a hipótese de maior tempo de residência da formulação Q1,0 P16, o modelo cinético de permeação do FLU a partir dela foi o mesmo modelo de permeação *in vitro* (ordem zero) (Tabelas 18 e 26), pelo qual a permeação independe da concentração de fármaco na formulação, indicando que o gradiente de concentração *in vitro* e *in vivo* permaneceu o mesmo. Já o modelo cinético que melhor definiu a permeação *in vivo* do FLU a partir das soluções foi de primeira ordem (Tabela 26), ou seja, a permeação depende da concentração de FLU, indicando que a quantidade disponível era finita. Provavelmente havia pouco FLU pelo fato de a solução ter sido drenada e, não havendo mais FLU na superfície a

quantidade de fármaco na câmara anterior diminui, uma vez que é distribuída aos tecidos oculares via renovação do humor aquoso.

Nos experimentos *in vivo* foram administrados 50 µL da formulação contendo 0,4% do fármaco, ou seja, 4 mg/mL. Foram, portanto, administrados 200 µg de FLU. Após 6 horas de experimento foram obtidos 55,54 µg/mL de FLU no humor aquoso, correspondente a aproximadamente 11,10 µg (o volume aproximado do humor aquoso é 200 µL). Dessa forma, quando se compara as quantidades ($Q_{6h}\%$) de FLU permeado nos estudos *in vitro* e *in vivo* (Tabelas 18 e 26), tem-se a partir da formulação Q1,0 P16, respectivamente, 6,16 e 5,55% da quantidade total de FLU inicial permeado. Esses resultados indicam ótima correlação *in vitro/in vivo* (~ 1).

Já a partir da solução Q1,0 permearam *in vitro* e *in vivo*, respectivamente 11,0 e 2,6% e, a partir da solução aquosa (controle), 2,4 e 1,4% da quantidade total de FLU: uma queda de quatro vezes para a primeira e aproximadamente duas vezes para a última. Provavelmente pela menor liberação do FLU a partir da solução Q1,0 em relação a solução aquosa, a solução Q1,0 necessitaria de maior tempo em contato com a córnea para obter a mesma correlação *in vitro/in vivo* que a solução aquosa.

Os resultados de permeação *in vivo* do FLU a partir da solução são condizentes com dados da literatura ao demonstrarem que a partir de uma solução, somente cerca de 1% do fármaco incorporado é absorvido, devido às barreiras anatômicas e fisiológicas da córnea (KAUR *et al.*, 2002a).

A técnica de microdiálise da câmara anterior em modelo animal mostrou-se portanto adequada para avaliação da permeação do FLU através da córnea a partir de diferentes formulações. A partir dos resultados obtidos é possível inferir que a formulação contendo Q1,0 P16 foi a que proporcionou a maior biodisponibilidade de FLU quando administrada topicamente.

5.8. Estudos *in vivo* do tempo de retenção da formulação por Cintilografia

A cintilografia é um método que vem sendo muito utilizado para determinação do tempo de permanência da formulação na região de aplicação (GURNY *et al.*, 1990; SNIBSON *et al.*, 1990; SNIBSON *et al.*, 1992; GREAVES *et al.*, 1993b; SOANE *et al.*, 2001; MCINNIS *et al.*, 2007). Através deste método a formulação é marcada com um radioisótopo artificial (o tecnécio) e o decaimento radioativo em função do tempo é

determinado, sendo possível observar, portanto, o tempo de retenção da formulação. O tecnécio é obtido a partir da irradiação de Molibdênio (^{98}Mo) por nêutrons, sendo comumente utilizado como pertecnato (sua forma química mais estável em solução aquosa)(O'NAN *et al.*, 1974). O tecnécio é largamente usado em medicina nuclear e apresenta baixo custo de produção. Ele é um emissor gama (γ) puro, pois sua energia nuclear é liberada unicamente sob a forma de partículas γ . Essa radioatividade é, então, medida em câmeras de cintilação tipo Anger sob a forma de contagens por segundo (MALBOUISSON *et al.*, 1997).

A cintilografia é considerada, há muito tempo, uma técnica inócua que não apresenta riscos ao paciente, uma vez que, durante a sua realização, a dose de radiação absorvida pelo cristalino é cerca de 925 vezes menor que a absorvida durante uma radiografia simples de crânio (ROSSOMONDO *et al.*, 1972).

Para verificar se a formulação Q1,0 P16 realmente permanece mais tempo em contato com a superfície ocular que as soluções oftálmicas, foi feito o estudo do tempo de retenção em humanos, utilizando a cintilografia. Este estudo mostrou-se necessário, dadas as diferenças fisiológicas mencionadas entre coelhos e humanos, principalmente, em relação à frequência de piscar. Nos estudos em voluntários saudáveis foi utilizada a formulação sem o ativo. A osmolalidade da formulação foi de $295 \pm 5,7$ mOsm/Kg, obtida com a adição de 0,4% p/p de NaCl e estando, dessa forma, dentro dos limites aceitáveis ao olho humano, de 266 mOsm/Kg a 340 mOsm/Kg (MAURICE, 1971; LUDWIG *et al.*, 1987; BOWMAN *et al.*, 2009).

Os voluntários que participaram do estudo de retenção da formulação Q1,0 P16 descreveram a formulação como confortável, apesar de sentirem “leve ardor” logo após a aplicação. Este “leve ardor” descrito se deve, muito provavelmente, ao pH da formulação (entre 6,0 e 6,5). No entanto, ao final do estudo os olhos eram saudáveis sem sinais de irritação ou vermelhidão. As médias obtidas estão apresentadas graficamente na Figura 54 e os valores de AUC estão expressos na Tabela 27. Imagens cintilográficas estão apresentadas na Figura 55.

Figura 54. Representação gráfica do *clearance* radioativo em função do tempo da formulação Q1,0 P16 ou soro fisiológico (controle) marcados com Tc^{99} . Os valores representam a média e o desvio padrão de quatro determinações ($n = 4$).

Tabela 27. Valores de AUC obtidos nos experimentos de retenção por cintilografia.

Formulação	AUC _{0-10min} *
Q1,0 P16	610,50 ± 127,99
Controle	242,40 ± 35,36

*Os valores representam a média de quatro determinações.

Figura 55. Imagens cintilográficas dos olhos direito e esquerdo obtidas durante o estudo de retenção por Cintilografia. Acima estão demarcadas as regiões de interesse (ROI) utilizadas na análise das imagens.

Através dos resultados obtidos (Figura 54) foi confirmado que a formulação Q1,0 P16 apresentou significativamente maior tempo de retenção em relação a uma solução aquosa controle. Devido às suas características termorreversíveis, a formulação é uma solução na temperatura ambiente, mas ao entrar em contato com os olhos se geleifica dificultando a

drenagem lacrimal (Figura 54). Outro fator que provavelmente contribui para o aumento do tempo de retenção é a interação eletrostática entre a quitosana, que possui carga positiva, e a mucina, que possui carga negativa. Dessa forma a formulação desenvolvida poderia diminuir a frequência posológica mínima para o tratamento das ceratites fúngicas em detrimento aos outros dois tratamentos avaliados e aos tratamentos observados na literatura, que, na maioria das vezes, instilam a formulação a cada hora (SONEGO-KRONE *et al.*, 2006; CHUNG *et al.*, 2007).

Através da Figura 55 é possível observar que a formulação ficou mais tempo retida, no entanto a distribuição na superfície da córnea não foi homogênea. O comportamento *in vivo* da formulação polimérica: dificuldade de espalhamento e maior tempo de retenção, vem a confirmar a relação destes fatores com, respectivamente, a compressibilidade e adesividade da amostra (Figuras 35 e 36). A solução aquosa foi rapidamente drenada, fato evidenciado pela intensidade de radiação nas vias lacrimais já na primeira imagem.

Ao final do experimento permaneceu em contato com a córnea apenas cerca de 15% da solução controle aplicada e de 50% a 60% da formulação termorreversível.

Estes resultados foram muito semelhantes aos resultados apresentados por Wei *et al.* (2002) para uma formulação oftálmica termorreversível composta por análogos do poloxamer. Após 10 min de experimento de retenção *in vivo* em coelhos, permaneceram na córnea 15% da solução de referência e cerca de 50% da formulação constituída pelos análogos do poloxamer.

A cintilografia utilizando tecnécio para determinação do tempo de retenção pré-corneal de uma formulação oftálmica demonstrou ser uma técnica viável: simples, de rápida realização e barata, através da qual é possível obter resultados conclusivos sobre o comportamento *in vivo* da formulação desenvolvida.

5.9. Resumo dos Resultados

O método analítico para quantificação do fluconazol por CLAE mostrou-se sensível, exato e preciso para as diferentes etapas experimentais.

O fluconazol, sendo um fármaco hidrossolúvel, partilhou-se favoravelmente para a fase aquosa, e muito pouco para a fase oleosa (octanol) ou para a córnea, sendo, portanto, o baixo coeficiente de partilha ($\log K$ 0,31) um dos fatores limitantes para sua permeação.

A formulação contendo 16% de poloxamer apresentou $T_{\text{sol/gel}}$ adequada (32°C) para viabilizar o tratamento de infecções oculares em países quentes como o Brasil. A adição de quitosana ou fluconazol não influenciou a $T_{\text{sol/gel}}$ das formulações.

Todas as formulações estudadas comportaram-se como soluções poliméricas elastoviscosas na temperatura ambiente e, aquelas que continham poloxamer apresentaram-se como gel na temperatura fisiológica ocular (35°C).

A presença de quitosana nas formulações poliméricas binárias contribui para a rápida reestruturação do poloxamer frente à diluição aquosa.

A quitosana confere propriedades mucoadesivas à formulação de forma proporcional à sua concentração.

A adição de quitosana (1,0 e 1,5%) à formulação monopolimérica de poloxamer aumentou significativamente a dureza, compressibilidade e adesividade das amostras.

As micropartículas de Eudragit[®] contendo o FLU obtidas por *spray drying* a partir de uma formulação contendo 1,75 g de Eudragit[®] e 0,35 g de FLU apresentaram alta eficiência de encapsulação (~90%), diâmetro médio igual a 1,35 μm e morfologia esférica. Além disso, apresentaram um potencial zeta positivo igual a +30,4 mV;

As micropartículas obtidas apresentaram liberação rápida (“*burst effect*”) de cerca de 50% do fármaco microencapsulado.

As células de difusão desenvolvidas mostraram-se adequadas para realização dos estudos de liberação e permeação *in vitro*, possuindo volume do compartimento receptor e área de difusão homogêneos, boa manutenção da temperatura e sistema de agitação adequado.

O sistema foi capaz de manter a integridade do epitélio corneano e a função barreira do tecido por seis horas de experimento.

A solução aquosa foi aquela que proporcionou a maior liberação do fármaco e, conseqüentemente, maior coeficiente de difusão ($2,77 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$). A adição de poloxamer a esta solução diminuiu quase duas vezes a velocidade de liberação do fármaco.

A permeação do fluconazol através da córnea de porco *in vitro* seguiu cinética de ordem zero a partir das formulações estudadas.

As formulações que proporcionaram maior permeação e retenção *in vitro* do FLU foram, em ordem decrescente: as soluções de quitosana > as formulações poliméricas binárias contendo poloxamer e quitosana > e o gel de poloxamer em relação à solução aquosa. Estatisticamente, a concentração de quitosana não influenciou significativamente a permeação.

A quantidade de FLU permeado a partir das micropartículas foi significativamente menor que a quantidade permeada quando o fármaco estava livre, independentemente da formulação (se solução aquosa ou gel).

A quantidade de FLU retido na córnea ao final do experimento de permeação *in vitro* não apresentou diferença estatística significativa quando o fármaco estava livre ou encapsulado em diferentes formulações doadoras.

A iontoforese aumentou em cerca de duas vezes o fluxo de permeação do FLU a partir de uma solução aquosa. A permeação iontoforética do fármaco livre em solução foi significativamente maior que a permeação iontoforética do fármaco encapsulado.

Não houve diferença estatística significativa entre os fluxos de permeação passiva do fármaco a partir do gel termorreversível (Q1,0 P16) e o fluxo de permeação iontoforética do fármaco livre em solução aquosa.

A aplicação de iontoforese ao gel termorreversível de poloxamer/quitosana demonstrou-se inviável, uma vez que a voltagem do sistema foi muito alta.

A iontoforese foi capaz de aumentar em quase duas vezes a quantidade de fármaco retido na córnea em comparação com o gel de poloxamer/quitosana.

A técnica de microdialise da câmara anterior em modelo animal mostrou-se adequada para avaliação da permeação do FLU através da córnea a partir de diferentes formulações. A metodologia apresentou valores adequados de recuperação *in vitro* e *in vivo* para este fármaco.

Os estudos de permeação *in vivo* demonstraram que a formulação contendo quitosana 1,0% e poloxamer 16% (Q1,0 P16) foi aquela que proporcionou a maior biodisponibilidade ocular de FLU quando administrada topicamente.

Os exames de cintilografia confirmaram que a formulação Q1,0 P16 ficou retida por um longo período na superfície ocular.

6. CONCLUSÃO

O gel termorreversível *in situ* (contendo 16% de poloxamer e 1,0% de quitosana), obtido e caracterizado no presente trabalho, e a iontoforese representam sistemas promissores para a liberação ocular tópica do FLU. O primeiro possui características promotoras de permeação, prolongado tempo de retenção, facilidade de obtenção e administração e é constituído por polímeros relativamente baratos e disponíveis comercialmente. O segundo é capaz de promover a retenção do fármaco na córnea, o que seria de extrema valia no tratamento da ceratite fúngica.

7. TRABALHOS ORIGINADOS DA TESE

7.1. Artigos completos

- [1] Gratieri, T., Gelfuso, G.M., Rocha, E.M., Lopez, R. F. V. *In situ* forming gel for enhanced ocular permeation and sustained release of Fluconazole. (*Submetido*)
- [2] Gratieri, T., Schaefer, U.F., Jing, L., Gao, M., Lopez, R.F.V., Schneider, M. Interaction of ultra small particles with human skin. J. Biomed. Nanotechnol. (*Submetido*)
- [3] Gratieri, T., Gelfuso, G.M., Lopez, R. F. V., Souto, E.B. Current efforts and the potential of nanomedicine for treating fungal keratitis. Expert Rev Ophthalmol. doi: 10.1586/EOP.10.19. (*in press*)
- [4] Gratieri, T., Gelfuso, G.M., Rocha, E.M., Sarmiento, V.H., Freitas, O., Lopez, R. F. V. A poloxamer/chitosan *in situ* forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. Eur J Pharm Biopharm. doi: 10.1016/j.ejpb.2010.02.011. (*in press*)
- [5] Gratieri, T., Gelfuso, G.M., Thomazine, J.A., Lopez, R. F. V. Excised porcine cornea integrity evaluation in an *in vitro* model of iontophoretic ocular research. Ophthalmic Res. 43, 208-16, 2010.
- [6] Gratieri, T., Gelfuso, G.M., Lopez, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. Química Nova. 31, 1490- 8 , 2008.

7.2. Capítulo de Livro

- [1] Gratieri, T. ; Gonzalez-Mira, E. ; Lopez, R. F. V. ; Egea, M. A. ; Garcia, M. L. ; Souto, E. B. Pharmacological treatment of ocular inflammatory diseases with novel lipid based drug delivery systems. In: Anna R. Sallinger. (Org.). Conjunctivitis: Symptoms, Treatment and Prevention. Hauppauge: Nova Scientific Publishers, 2010.

7.3 Textos em jornais de notícias/revistas

- [1] Gratieri, T., Gelfuso, G.M., Lopez, R. F. V. Corrente elétrica facilita administração de remédios. Jornal do Brasil, p. 32, 10 maio 2009.
- [2] Gratieri, T., Gelfuso, G.M., Lopez, R. F. V. Medição do futuro: iontoforese facilita entrada de fármaco no organismo. Revista Ciência Hoje, v. 259, p. 20 - 25, 15 maio 2009.

8. REFERÊNCIAS

- ABBASOGLU, O.E.; HOSAL, B. M.; SENER, B.; ERDEMOGLU, N.; GURSEL, E. Penetration of topical fluconazole into human aqueous humor. **Exp Eye Res.** v.72, n.2, p.147-151, 2001.
- ABLA, N.; NAIK, A.; GUY, R. H.; KALIA, Y. N. Contributions of electromigration and electroosmosis to peptide iontophoresis across intact and impaired skin. **J Control Release.** v.108, n.2-3, p.319-330, 2005a.
- ABLA, N.; NAIK, A.; GUY, R. H.; KALIA, Y. N. Effect of charge and molecular weight on transdermal peptide delivery by iontophoresis. **Pharm Res.** v.22, n.12, p.2069-2078, 2005b.
- ADIBKIA, K.; SIAHI SHADBAD, M. R.; NOKHODCHI, A.; JAVADZEDEH, A.; BARZEGAR-JALALI, M.; BARAR, J.; MOHAMMADI, G.; OMIDI, Y. Piroxicam nanoparticles for ocular delivery: physicochemical characterization and implementation in endotoxin-induced uveitis. **J Drug Target.** v.15, n.6, p.407-416, 2007.
- AGGARWAL, D.; PAL, D.; MITRA, A. K.; KAUR, I. P. Study of the extent of ocular absorption of acetazolamide from a developed niosomal formulation, by microdialysis sampling of aqueous humor. **Int J Pharm.** v.338, n.1-2, p.21-26, 2007.
- AGRAWAL, V.B. & TSAI, R. J. Corneal epithelial wound healing. **Indian J Ophthalmol.** v.51, n.1, p.5-15, 2003.
- AHEARN, D.G.; ZHANG, S.; STULTING, R. D.; SCHWAM, B. L.; SIMMONS, R. B.; WARD, M. A.; PIERCE, G. E.; CROW, S. A. Fusarium keratitis and contact lens wear: facts and speculations. **Med Mycol.** v.46, n.5, p.397-410, 2008.
- AKLER, M.E.; VELLEND, H.; MCNEELY, D. M.; WALMSLEY, S. L.; GOLD, W. L. Use of fluconazole in the treatment of candidal endophthalmitis. **Clin Infect Dis.** v.20, n.3, p.657-664, 1995.
- AL KASSAS, R. Design and *in vitro* evaluation of gentamicin-Eudragit microspheres intended for intra-ocular administration. **J Microencapsul.** v.21, n.1, p.71-81, 2004.
- AL ZOUBI, N.; ALKHATIB, H. S.; BUSTANJI, Y.; AIEDEH, K.; MALAMATARIS, S. Sustained-release of buspirone HCl by co spray-drying with aqueous polymeric dispersions. **Eur J Pharm Biopharm.** v.69, n.2, p.735-742, 2008.
- ALEXANDRIDIS, P.; HOLZWARTH, J. F.; HATTON, T. A. Micellization of Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Propylene Oxide)-Poly(Ethylene Oxide) Triblock Copolymers in Aqueous-Solutions - Thermodynamics of Copolymer Association. **Macromolecules.** v.27, n.9, p.2414-2425, 1994.
- ALFONSO, E.C.; MILLER, D.; CANTU-DIBILDOX, J.; O'BRIEN, T. P.; SCHEIN, O. D. Fungal keratitis associated with non-therapeutic soft contact lenses. **Am J Ophthalmol.** v.142, n.1, p.154-155, 2006.
- ALMDAL, K.; DYRE, J.; HVIDT, S.; KRAMER, O. What Is A Gel. **Makromolekulare Chemie-Macromolecular Symposia.** v.76, n., p.49-51, 1993.
- ALONSO, M.J. & SANCHEZ, A. The potential of chitosan in ocular drug delivery. **J Pharm Pharmacol.** v.55, n.11, p.1451-1463, 2003.

- AMARAL, A.C.; BOCCA, A. L.; RIBEIRO, A. M.; NUNES, J.; PEIXOTO, D. L. G.; SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; LACAVA, Z. G. M.; BENTES, R.; TITZE-DE-ALMEIDA, R.; TEDESCO, A. C.; MORAIS, P. C.; FELIPE, M. S. S. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. **J Antimicrob Chemother.** v.63, n.3, p.526-533, 2009.
- ANAND, B.S.; ATLURI, H.; MITRA, A. K. Validation of an ocular microdialysis technique in rabbits with permanently implanted vitreous probes: systemic and intravitreal pharmacokinetics of fluorescein. **Int J Pharm.** v.281, n.1-2, p.79-88, 2004.
- ANAND, B.S.; KATRAGADDA, S.; GUNDA, S.; MITRA, A. K. *In vivo* ocular pharmacokinetics of acyclovir dipeptide ester prodrugs by microdialysis in rabbits. **Mol Pharm.** v.3, n.4, p.431-440, 2006.
- ANUMOLU, S.S.; SINGH, Y.; GAO, D.; STEIN, S.; SINKO, P. J. Design and evaluation of novel fast forming pilocarpine-loaded ocular hydrogels for sustained pharmacological response. **J Control Release.** v.137, n.2, p.152-159, 2009.
- ARTURSSON, P.; LINDMARK, T.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). **Pharm Res.** v.11, n.9, p.1358-1361, 1994.
- ASAHARA, T.; SHINOMIYA, K.; NAITO, T.; SHIOTA, H. Induction of gene into the rabbit eye by iontophoresis: preliminary report. **Jpn J Ophthalmol.** v.45, n.1, p.31-39, 2001.
- ASHTON, P.; WANG, W.; LEE, V. H. Location of penetration and metabolic barriers to levobunolol in the corneal epithelium of the pigmented rabbit. **J Pharmacol Exp Ther.** v.259, n.2, p.719-724, 1991.
- Ashworth, C., Stanley, J.W., Lossow, J.W.J., 1990. Anatomia e Fisiologia Humana. 5 Ed..
- ATLURI, H.; TALLURI, R. S.; MITRA, A. K. Functional activity of a large neutral amino acid transporter (LAT) in rabbit retina: A study involving the *in vivo* retinal uptake and vitreal pharmacokinetics of l-phenyl alanine. **Int J Pharm.** v.347, n.1-2, p.23-30, 2008.
- AVUNDUK, A.M.; BEUERMAN, R. W.; WARNEL, E. D.; KAUFMAN, H. E.; GREER, D. Comparison of efficacy of topical and oral fluconazole treatment in experimental Aspergillus keratitis. **Curr Eye Res.** v.26, n.2, p.113-117, 2003.
- AYALASOMAYAJULA, S.P. & KOMPELLA, U. B. Subconjunctivally administered celecoxib-PLGA microparticles sustain retinal drug levels and alleviate diabetes-induced oxidative stress in a rat model. **Eur J Pharmacol.** v.511, n.2-3, p.191-198, 2005.
- BAEYENS, V. & GURNY, R. Chemical and physical parameters of tears relevant for the design of ocular drug delivery formulations. **Pharm Acta Helv.** v.72, n.4, p.191-202, 1997.
- BALASUBRAMANIAM, J. & PANDIT, J. K. Ion-activated *in situ* gelling systems for sustained ocular delivery of ciprofloxacin hydrochloride. **Drug Deliv.** v.10, n.3, p.185-191, 2003.
- BARAR, J.; JAVADZADEH, A. R.; OMIDI, Y. Ocular novel drug delivery: impacts of membranes and barriers. **Expert Opin Drug Deliv.** v.5, n.5, p.567-581, 2008.
- BAYDOUN, L.; FURRER, P.; GURNY, R.; MULLER-GOYMANN, C. C. New surface-active polymers for ophthalmic formulations: evaluation of ocular tolerance. **Eur J Pharm Biopharm.** v.58, n.1, p.169-175, 2004.

- BAYDOUN, L. & MULLER-GOYMANN, C. C. Influence of n-octenylsuccinate starch on *in vitro* permeation of sodium diclofenac across excised porcine cornea in comparison to Voltaren ophtha. **Eur J Pharm Biopharm.** v.56, n.1, p.73-79, 2003.
- BECKER, B. & NEUFELD, A. H. Pressure dependence of uveoscleral outflow. **J Glaucoma.** v.11, n.5, p.464-, 2002.
- BECKER, U.; EHRHARDT, C.; DAUM, N.; BALDES, C.; SCHAEFER, U. F.; RUPRECHT, K. W.; KIM, K. J.; LEHR, C. M. Expression of ABC-transporters in human corneal tissue and the transformed cell line, HCE-T. **J Ocul Pharm Ther.** v.23, n.2, p.172-181, 2007.
- BEHRENS-BAUMANN, W.; KLINGE, B.; RUCHEL, R. Topical fluconazole for experimental candida keratitis in rabbits. **Br J Ophthalmol.** v.74, n.1, p.40-42, 1990.
- BEJJANI, R.A.; JEANNY, J. C.; BOCHOT, A.; BEHAR-COHEN, F. The use of liposomes as intravitreal drug delivery system. **J Fr Ophtalmol.** v.26, n.9, p.981-985, 2003.
- BENJAMIN, W.J. & HILL, R. M. Human tears: osmotic characteristics. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.24, n.12, p.1624-1626, 1983.
- BERDUGO, M.; VALAMANESH, F.; ANDRIEU, C.; KLEIN, C.; BENEZRA, D.; COURTOIS, Y.; BEHAR-COHEN, F. Delivery of antisense oligonucleotide to the cornea by iontophoresis. **Antisense Nucleic Acid Drug Dev.** v.13, n.2, p.107-114, 2003.
- BHARATHI, M.J.; RAMAKRISHNAN, R.; VASU, S.; MEENAKSHI, R.; PALANIAPPAN, R. Epidemiological characteristics and laboratory diagnosis of fungal keratitis. A three-year study. **Indian J Ophthalmol.** v.51, n.4, p.315-321, 2003.
- BIN CHOY, Y.; PARK, J. H.; PRAUSNITZ, M. R. Mucoadhesive microparticles engineered for ophthalmic drug delivery. **J Phys Chem Solids.** v.69, n.5-6, p.1533-1536, 2008.
- BOLOURTCHIAN, N.; KARIMI, K.; ABOOFAZELI, R. Preparation and characterization of ibuprofen microspheres. **J Microencapsul.** v.22, n.5, p.529-538, 2005.
- BONFERONI, M.C.; GIUNCHEDI, P.; SCALIA, S.; ROSSI, S.; SANDRI, G.; CARAMELLA, C. Chitosan gels for the vaginal delivery of lactic acid: Relevance of formulation parameters to mucoadhesion and release mechanisms. **AAPS Pharmscitech.** v.7, n.4, 2006.
- BOSMAN, I.J.; ENSING, K.; DE ZEEUW, R. A. Unusual reduction of the *in vitro* skin permeation of [3H]dextimide by atropine. **Pharm Res.** v.15, n.1, p.145-148, 1998.
- BOULTON, M. & ALBON, J. Stem cells in the eye. **Int J Biochem Cell Biol.** v.36, n.4, p.643-657, 2004.
- BOWMAN, L.M.; SI, E.; PANG, J.; ARCHIBALD, R.; FRIEDLAENDER, M. Development of a Topical Polymeric Mucoadhesive Ocular Delivery System for Azithromycin. **J Ocul Pharm Ther.** v.25, n.2, p.133-139, 2009.
- BROWN, K.E. & CONGDON, N. G. Corneal structure and biomechanics: impact on the diagnosis and management of glaucoma. **Curr Opin Ophthalmol.** v.17, n.4, p.338-343, 2006.
- BRUSCHI, M.L.; JONES, D. S.; PANZERI, H.; GREMIAO, M. P. D.; DE FREITAS, O.; LARA, E. H. G. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: *In vitro* release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **J Pharm Sci.** v.96, n.8, p.2074-2089, 2007.

- BUCOLO, C.; MALTESE, A.; MAUGERI, F.; BUSA, B.; PUGLISI, G.; PIGNATELLO, R. Eudragit RL100 nanoparticle system for the ophthalmic delivery of cloricromene. **J Pharm Pharmacol.** v.56, n.7, p.841-846, 2004.
- BUCOLO, C.; MALTESE, A.; PUGLISI, G.; PIGNATELLO, R. Enhanced ocular anti-inflammatory activity of ibuprofen carried by an Eudragit RS100 nanoparticle suspension. **Ophthalmic Res.** v.34, n.5, p.319-323, 2002.
- BURGALASSI, S.; CHETONI, P.; SAETTONE, M. F. Hydrogels for ocular delivery of pilocarpine: Preliminary evaluation in rabbits of the influence of viscosity and of drug solubility. **Eur J Pharm Biopharm.** v.42, n.6, p.385-392, 1996.
- BURNETTE, R.R. & ONGPIPATTANAKUL, B. Characterization of the permselective properties of excised human skin during iontophoresis. **J Pharm Sci.** v.76, n.10, p.765-773, 1987.
- CALPENA, A.C.; BLANES, C.; MORENO, J.; OBACH, R.; DOMENECH, J. A Comparative In-Vitro Study of Transdermal Absorption of Antiemetics. **J Pharm Sci.** v.83, n.1, p.29-33, 1994.
- CALVO, P.; REMUNANLOPEZ, C.; VILAJATO, J. L.; ALONSO, M. J. Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Colloid Polym Sci.** v.275, n.1, p.46-53, 1997.
- CANNING, C.R.; GREANEY, M. J.; DEWYNNE, J. N.; FITT, A. D. Fluid flow in the anterior chamber of a human eye. **IMA J Math Appl Med Biol.** v.19, n.1, p.31-60, 2002.
- CAO, Y.; ZHANG, C.; SHEN, W.; CHENG, Z.; YU, L. L.; PING, Q. Poly(N-isopropylacrylamide)-chitosan as thermosensitive *in situ* gel-forming system for ocular drug delivery. **J Control Release.** v.120, n.3, p.186-194, 2007.
- CARVALHO, A.C.A.; RUTHES, H. I.; MAIA, M.; YANA, D.; SATO, M. T.; MOREIRA, H.; BORDIGNON, G. F.; QUEIROZ-TELLES, F. Ceratite fúngica no estado do Paraná- Brasil: aspectos epidemiológicos, etiológicos e diagnósticos. **Rev Iberoam Micol.** v.18, n., p.76-78, 2001.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl.** v.689, n.1, p.175-180, 1997.
- CEVHER, E.; ORHAN, Z.; MULAZIMOGLU, L.; SENSOY, D.; ALPER, M.; YILDIZ, A.; OZSOY, Y. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. **Int J Pharm.** v.317, n.2, p.127-135, 2006.
- CHAN, H.K. & CHEW, N. Y. Novel alternative methods for the delivery of drugs for the treatment of asthma. **Adv Drug Deliv Rev.** v.55, n.7, p.793-805, 2003.
- CHANG, D.C.; GRANT, G. B.; O'DONNELL, K.; WANNEMUEHLER, K. A.; NOBLE-WANG, J.; RAO, C. Y.; JACOBSON, L. M.; CROWELL, C. S.; SNEED, R. S.; LEWIS, F. M.; SCHAFFZIN, J. K.; KAINER, M. A.; GENESE, C. A.; ALFONSO, E. C.; JONES, D. B.; SRINIVASAN, A.; FRIDKIN, S. K.; PARK, B. J. Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. **JAMA.** v.296, n.8, p.953-963, 2006.
- CHANG, J.Y.; OH, Y. K.; CHOI, H. G.; KIM, Y. B.; KIM, C. K. Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. **Int J Pharm.** v.241, n.1, p.155-163, 2002.

- CHAYED, S. & WINNIK, F. M. *In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of polysaccharide-based nanoparticulate oral drug delivery systems. **Eur J Pharm Biopharm.** v.65, n.3, p.363-370, 2007.
- CHIANG, C.H.; TUNG, S. M.; LU, D. W.; YEH, M. K. *In vitro* and *in vivo* evaluation of an ocular delivery system of 5-fluorouracil microspheres. **J Ocul Pharmacol Ther.** v.17, n.6, p.545-553, 2001.
- CHOI, C.; JUNG, H.; NAM, J. P.; PARK, Y.; JANG, M. K.; NAH, J. W. Preparation and Characterization of Deoxycholic Acid-Conjugated Low Molecular Weight Water-Soluble Chitosan Nanoparticles for Hydrophobic Antifungal Agent Carrier. **Polymer-Korea.** v.33, n.4, p.389-395, 2009.
- CHOI, T.B. & LEE, D. A. Transscleral and transcorneal iontophoresis of vancomycin in rabbit eyes. **J Ocul Pharmacol.** v.4, n.2, p.153-164, 1988.
- CHUNG, P.C.; LIN, H. C.; HWANG, Y. S.; TSAI, Y. J.; NGAN, K. W.; HUANG, S. C. M.; HSIAO, C. H. Paecilomyces lilacinus scleritis with secondary keratitis. **Cornea.** v.26, n.2, p.232-234, 2007.
- CHURCH, A.L.; BARZA, M.; BAUM, J. An improved apparatus for transscleral iontophoresis of gentamicin. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.33, n.13, p.3543-3545, 1992.
- COHEN, S.; LOBEL, E.; TREVGODA, A.; PELED, Y. A novel *in situ*-forming ophthalmic drug delivery system from alginates undergoing gelation in the eye. **J Control Release.** v.44, n.2-3, p.201-208, 1997.
- COLLAUD, S.; PENG, Q. A.; GURNY, R.; LANGE, N. Thermosetting gel for the delivery of 5-aminolevulinic acid esters to the cervix. **J Pharm Sci.** v.97, n.7, p.2680-2690, 2008.
- CORDOBA-DIAZ, M.; NOVA, M.; ELORZA, B.; CORDOBA-DIAZ, D.; CHANTRES, J. R.; CORDOBA-BORREGO, M. Validation protocol of an automated in-line flow-through diffusion equipment for *in vitro* permeation studies. **J Control Release.** v.69, n.3, p.357-367, 2000.
- CORTESI, R.; AJANJI, S. C. L.; SIVIERI, E.; MANSERVIGI, M.; FUNDUEANU, G.; MENEGATTI, E.; ESPOSITO, E. Eudragit (R) microparticles as a possible tool for ophthalmic administration of acyclovir. **J Microencapsul.** v.24, n.5, p.445-456, 2007.
- CREECH, J.L.; DO, L. T.; FATT, I.; RADKE, C. J. *In vivo* tear-film thickness determination and implications for tear-film stability. **Curr Eye Res.** v.17, n.11, p.1058-1066, 1998.
- CRUZ, L.; ASSUMPCAO, E.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. High Encapsulation Efficiency of Sodium Alendronate in Eudragit S100/Hpmc Blend Microparticles. **Quim Nova.** v.32, n.5, p.1170-1174, 2009.
- CUNNINGHAM, M.A.; EDELMAN, J. L.; KAUSHAL, S. Intravitreal steroids for macular edema: The past, the present, and the future. **Surv Ophthalmol.** v.53, n.2, p.139-149, 2008.
- DANDAGI, P.; KERUR, S.; MASTIHOLIMATH, V.; GADAD, A.; KULKARNI, A. Polymeric Ocular Nanosuspension for Controlled Release of Acyclovir: *In vitro* Release and Ocular Distribution. **Iranian J Pharm Res.** v.8, n.2, p.79-86, 2009.
- DANIELS, J.T.; DART, J. K.; TUFT, S. J.; KHAW, P. T. Corneal stem cells in review. **Wound Repair Regen.** v.9, n.6, p.483-494, 2001.
- DATE, A.A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. **Adv Drug Del Rev.** v.59, n.6, p.505-521, 2007.

- DE SALAMANCA, A.E.; DIEBOLD, Y.; CALONGE, M.; GARCIA-VAZQUEZ, C.; CALLEJO, S.; VILA, A.; ALONSO, M. J. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: Toxicity, uptake mechanism and *in vivo* tolerance. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.47, n.4, p.1416-1425, 2006.
- DEACON, M.P.; MCGURK, S.; ROBERTS, C. J.; WILLIAMS, P. M.; TENDLER, S. J. B.; DAVIES, M. C.; DAVIS, S. S.; HARDING, S. E. Atomic force microscopy of gastric mucin and chitosan mucoadhesive systems. **Biochem J.** v.348, n., p.557-563, 2000.
- DEBBASCH, C.; EBENHAHN, C.; DAMI, N.; PERICOI, M.; VAN DEN, B. C.; COTTIN, M.; NOHYNEK, G. J. Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: correlation of *in vitro* results with clinical data and product composition. **Food Chem Toxicol.** v.43, n.1, p.155-165, 2005.
- DEL AMO, E.M. & URTTI, A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment. **Drug Discov Today.** v.13, n.3-4, p.135-143, 2008.
- DI COLO, G.; ZAMBITO, Y.; BURGALASSI, S.; NARDINI, I.; SAETTON, M. F. Effect of chitosan and of N-carboxymethylchitosan on intraocular penetration of topically applied ofloxacin. **Int J Pharm.** v.273, n.1-2, p.37-44, 2004.
- DI COLO, G.; ZAMBITO, Y.; ZAINO, C. Polymeric enhancers of mucosal epithelia permeability: Synthesis, transepithelial penetration-enhancing properties, mechanism of action, safety issues. **J Pharm Sci.** v.97, n.5, p.1652-1680, 2008.
- DODANE, V.; KHAN, M. A.; MERWIN, J. R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. **Int J Pharm.** v.182, n.1, p.21-32, 1999.
- DODANE, V. & VILIVALAM, V. D. Pharmaceutical applications of chitosan. **Pharm Sci Technol Today.** v.1, n.6, p.246-253, 1998.
- DUDINSKI, O.; FINNIN, B. C.; REED, B. L. Acceptability of Thickened Eye Drops to Human-Subjects. **Curr Ther Res Clin Exp.** v.33, n.2, p.322-337, 1983.
- DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharm Res.** v.23, n.12, p.2709-2728, 2006.
- DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; ZUBER, M.; COUARRAZE, G.; CHAUMEIL, J. C. Rheological Study of A Thermoreversible Morphine Gel. **Drug Dev Ind Pharm.** v.17, n.9, p.1255-1265, 1991.
- DUTET, J. & DELGADO-CHARRO, M. B. *In vivo* transungual iontophoresis: Effect of DC current application on ionic transport and on transonychial water loss. **J Control Release.** v.140, n.2, p.117-125, 2009.
- EDSMAN, K.; CARLFORS, J.; HARJU, K. Rheological evaluation and ocular contact time of some carbomer gels for ophthalmic use. **Int J Pharm.** v.137, n.2, p.233-241, 1996.
- EDSMAN, K.; CARLFORS, J.; PETERSSON, R. Rheological evaluation of poloxamer as an *in situ* gel for ophthalmic use. **Eur J Pharm Sci.** v.6, n.2, p.105-112, 1998.
- EL KAMEL, A.; SOKAR, M.; NAGGAR, V.; AL GAMAL, S. Chitosan and sodium alginate-based bioadhesive vaginal tablets. **AAPS PharmSci.** v.4, n.4, p.E44-, 2002.
- EL KAMEL, A.H. *In vitro* and *in vivo* evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate. **Int J Pharm.** v.241, n.1, p.47-55, 2002.

- ELJARRAT-BINSTOCK, E. & DOMB, A. J. Iontophoresis: A non-invasive ocular drug delivery. **J Control Release**. v.110, n.3, p.479-489, 2006.
- ELJARRAT-BINSTOCK, E.; RAISKUP, F.; FRUCHT-PERY, J.; DOMB, A. J. Transcorneal and transscleral iontophoresis of dexamethasone phosphate using drug loaded hydrogel. **J Control Release**. v.106, n.3, p.386-390, 2005.
- ELJARRAT-BINSTOCK, E.; RAISKUP, F.; STEPENSKY, D.; DOMB, A. J.; FRUCHT-PERY, J. Delivery of gentamicin to the rabbit eye by drug-loaded hydrogel iontophoresis. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v.45, n.8, p.2543-2548, 2004.
- ERLANGER, G. Iontophoresis, A Scientific and Practical Tool in Ophthalmology. **Ophthalmologica**. v.128, n.4, p.232-246, 1954.
- ESPUELAS, M.S.; LEGRAND, P.; IRACHE, J. M.; GAMAZO, C.; ORECCHIONI, A. M.; DEVISSAGUET, J. P.; YGARTUA, P. Poly(epsilon-caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity. **Int J Pharm**. v.158, n.1, p.19-27, 1997.
- ESPUELAS, M.S.; LEGRAND, P.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BARRATT, G.; IRACHE, J. M. *In vitro* antileishmanial activity of amphotericin B loaded in poly(epsilon-caprolactone) nanospheres. **J Drug Target**. v.10, n.8, p.593-599, 2002.
- ETHIER, C.R.; JOHNSON, M.; RUBERTI, J. Ocular biomechanics and biotransport. **Annu Rev Biomed Eng**. v.6, n., p.249-273, 2004.
- FARRIS, R.L.; STUCHELL, R. N.; MANDEL, I. D. Basal and reflex human tear analysis. I. Physical measurements: osmolarity, basal volumes, and reflex flow rate. **Ophthalmology**. v.88, n.8, p.852-857, 1981.
- FELT, O.; FURRER, P.; MAYER, J. M.; PLAZONNET, B.; BURI, P.; GURNY, R. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. **Int J Pharm**. v.180, n.2, p.185-193, 1999.
- FERRARI, F.; BERTONI, M.; BONFERONI, M. C.; ROSSI, S.; SAUNDERS, M.; AULTON, M. E.; CONTE, U.; CARAMELLA, C. Influence of Probe Shape on Gel Strength Test. **Int J Pharm**. v.121, n.1, p.11-17, 1995.
- FERRARI, F.; BERTONI, M.; CARAMELLA, C.; LAMANNA, A. Description and Validation of An Apparatus for Gel Strength Measurements. **Int J Pharm**. v.109, n.2, p.115-124, 1994.
- FISCHER, G.A. Iontophoretic drug delivery using the IOMED Phoresor system. **Expert Opin Drug Deliv**. v.2, n.2, p.391-403, 2005.
- FLORCRUZ, N.V. & PECZON, I. Medical interventions for fungal keratitis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**1, 2008.
- FOGERT, F.; KAFEDJIISKI, K.; HOYER, H.; LORETZ, B.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Enhanced transport of P-glycoprotein substrate saquinavir in presence of thiolated chitosan. **J Drug Target**. v.15, n.2, p.132-139, 2007.
- FRANETA, J.T.; AGBABA, D.; ERIC, S.; PAVKOV, S.; ALEKSIC, M.; VLADIMIROV, S. HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. **Farmaco**. v.57, n.9, p.709-713, 2002.
- FREEGARD, T.J. The physical basis of transparency of the normal cornea. **Eye**. v.11 (Pt 4), n., p.465-471, 1997.

- FROMTLING, R.A. Overview of medically important antifungal azole derivatives. **Clin Microbiol Rev.** v.1, n.2, p.187-217, 1988.
- FRUCHT-PERY, J.; GOREN, D.; SOLOMON, A.; SIGANOS, C. S.; MECHOULAM, H.; SOLOMON, A.; EVER-HADANI, P.; SHAPIRO, M. The distribution of gentamicin in the rabbit cornea following iontophoresis to the central cornea. **J Ocul Pharmacol Ther.** v.15, n.3, p.251-256, 1999.
- FRUCHT-PERY, J.; MECHOULAM, H.; SIGANOS, C. S.; EVER-HADANI, P.; SHAPIRO, M.; DOMB, A. Iontophoresis-gentamicin delivery into the rabbit cornea, using a hydrogel delivery probe. **Exp Eye Res.** v.78, n.3, p.745-749, 2004.
- FRUCHT-PERY, J.; RAISKUP, F.; MECHOULAM, H.; SHAPIRO, M.; ELJARRAT-BINSTOCK, E.; DOMB, A. Iontophoretic treatment of experimental pseudomonas keratitis in rabbit eyes using gentamicin-loaded hydrogels. **Cornea.** v.25, n.10, p.1182-1186, 2006.
- GALARRETA, D.J.; TUFT, S. J.; RAMSAY, A.; DART, J. K. Fungal keratitis in London: microbiological and clinical evaluation. **Cornea.** v.26, n.9, p.1082-1086, 2007.
- GAUDANA, R.; JWALA, J.; BODDU, S. H.; MITRA, A. K. Recent perspectives in ocular drug delivery. **Pharm Res.** v.26, n.5, p.1197-1216, 2009.
- GAUJOUX, T.; CHATEL, M. A.; CHAUMEIL, C.; LAROCHE, L.; BORDERIE, V. M. Outbreak of contact lens-related *Fusarium* keratitis in France. **Cornea.** v.27, n.9, p.1018-1021, 2008.
- GAVINI, E.; CHETONI, P.; COSSU, M.; ALVAREZ, M. G.; SAETTONE, M. F.; GIUNCHEDI, P. PLGA microspheres for the ocular delivery of a peptide drug, vancomycin using emulsification/spray-drying as the preparation method: *in vitro/in vivo* studies. **Eur J Pharm Biopharm.** v.57, n.2, p.207-212, 2004.
- GAVINI, E.; RASSU, G.; MUZZARELLI, C.; COSSU, M.; GIUNCHEDI, P. Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide. **Eur J Pharm Biopharm.** v.68, n.2, p.245-252, 2008.
- GELFUSO, G.M.; FIGUEIREDO, F. V.; GRATIERI, T.; LOPEZ, R. F. The effects of pH and ionic strength on topical delivery of a negatively charged porphyrin (TPPS(4)). **J Pharm Sci.** v.97, n.10, p.4249-4257, 2008.
- GENC, L.; DEMIREL, M.; YAZAN, Y. Preparation of prolonged release clarithromycin microparticles for oral use and their *in vitro* evaluation. **Arch Pharm Res.** v.29, n.10, p.921-927, 2006.
- GEROSKI, D.H. & EDELHAUSER, H. F. Transscleral drug delivery for posterior segment disease. **Adv Drug Deliv Rev.** v.52, n.1, p.37-48, 2001.
- GHATE, D. & EDELHAUSER, H. F. Ocular drug delivery. **Expert Opin Drug Deliv.** v.3, n.2, p.275-287, 2006.
- GHATE, D. & EDELHAUSER, H. F. Barriers to glaucoma drug delivery. **J Glaucoma.** v.17, n.2, p.147-156, 2008.
- GIBSON, P.R.; FIXA, B.; PEKARKOVA, B.; BATOVSKY, M.; RADFORD-SMITH, G.; TIBITANZL, J.; GABALEC, L.; FLORIN, T. H.; GREINWALD, R. Comparison of the efficacy and safety of Eudragit-L-coated mesalazine tablets with ethylcellulose-coated mesalazine tablets in patients with mild to moderately active ulcerative colitis. **Aliment Pharmacol Ther.** v.23, n.7, p.1017-1026, 2006.

- GILBERT, J.C.; WASHINGTON, C.; DAVIES, M. C.; HADGRAFT, J. The Behavior of Pluronic-F127 in Aqueous-Solution Studied Using Fluorescent-Probes. **Int J Pharm.** v.40, n.1-2, p.93-99, 1987.
- GIPSON, I.K.; YANKAUCKAS, M.; SPURR-MICHAUD, S. J.; TISDALE, A. S.; RINEHART, W. Characteristics of a glycoprotein in the ocular surface glycocalyx. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.33, n.1, p.218-227, 1992.
- GIUNCHEDI, P. & CONTE, U. Spray-Drying As A Preparation Method of Microparticulate Drug-Delivery Systems - An Overview. **Stp Pharma Sciences.** v.5, n.4, p.276-290, 1995.
- GODOY, P.; CANO, J.; GENE, J.; GUARRO, J.; HOFLING-LIMA, A. L.; LOPES, C. A. Genotyping of 44 isolates of *Fusarium solani*, the main agent of fungal keratitis in Brazil. **J Clin Microbiol.** v.42, n.10, p.4494-4497, 2004.
- GOPINATHAN, U.; GARG, P.; FERNANDES, M.; SHARMA, S.; ATHMANATHAN, S.; RAO, G. N. The epidemiological features and laboratory results of fungal keratitis - A 10-year review at a referral eye care center in south India. **Cornea.** v.21, n.6, p.555-559, 2002.
- GOPINATHAN, U.; SHARMA, S.; GARG, P.; RAO, G. N. Review of epidemiological features, microbiological diagnosis and treatment outcome of microbial keratitis: Experience of over a decade. **Indian J Ophthalmol.** v.57, n.4, p.273-279, 2009.
- GORSCAK, J.J.; AYRES, B. D.; BHAGAT, N.; HAMMERSMITH, K. M.; RAPUANO, C. J.; COHEN, E. J.; BURDQY, M.; MIRANI, N.; JUNGKIND, D.; CHU, D. S. An outbreak of *Fusarium* keratitis associated with contact lens use in the northeastern United States. **Cornea.** v.26, n.10, p.1187-1194, 2007.
- GRANADOS, J.M.; PUERTO, N.; CARRILERO, M. J. [Efficiency of voriconazole in fungal keratitis caused by *candida albicans*]. **Arch Soc Esp Oftalmol.** v.79, n.11, p.565-568, 2004.
- GRASS, G.M. & ROBINSON, J. R. Mechanisms of corneal drug penetration. II: Ultrastructural analysis of potential pathways for drug movement. **J Pharm Sci.** v.77, n.1, p.15-23, 1988.
- GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Basic principles and applications of iontophoresis for cutaneous penetration of drugs. **Quim Nova.** v.31, n.6, p.1490-1498, 2008.
- GRATIERI, T., GELFUSO, G.M., LOPEZ, R. F. V. Medição do futuro: iontoforese facilita entrada de fármaco no organismo. **Rev Ciência Hoje,** v. 259, p. 20 - 25, 2009.
- GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; THOMAZINI, J. A.; LOPEZ, R. F. Excised Porcine Cornea Integrity Evaluation in an *in vitro* Model of Iontophoretic Ocular Research. **Ophthalmic Res.** v.43, n.4, p.208-216, 2010.
- GREAVES, J.L. & WILSON, C. G. Treatment of Diseases of the Eye with Mucoadhesive Delivery Systems. **Adv Drug Del Rev.** v.11, n.3, p.349-383, 1993a.
- GREAVES, J.L.; WILSON, C. G.; BIRMINGHAM, A. T. Assessment of the precorneal residence of an ophthalmic ointment in healthy subjects. **Br J Clin Pharmacol.** v.35, n.2, p.188-192, 1993b.
- GREEN, P.G.; HINZ, R. S.; KIM, A.; SZOKA, F. C., JR.; GUY, R. H. Iontophoretic delivery of a series of tripeptides across the skin *in vitro*. **Pharm Res.** v.8, n.9, p.1121-1127, 1991.
- GROSSMAN, R. & LEE, D. A. Transscleral and Transcorneal Iontophoresis of Ketoconazole in the Rabbit Eye. **Ophthalmology.** v.96, n.5, p.724-729, 1989.

- GROSSMAN, R.E.; CHU, D. F.; LEE, D. A. Regional ocular gentamicin levels after transcorneal and transscleral iontophoresis. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v.31, n.5, p.909-916, 1990.
- GUPTA, H.; JAIN, S.; MATHUR, R.; MISHRA, P.; MISHRA, A. K.; VELPANDIAN, T. Sustained ocular drug delivery from a temperature and pH triggered novel *in situ* gel system. **Drug Deliv**. v.14, n.8, p.507-515, 2007.
- GURNY, R.; RYSER, J. E.; TABATABAY, C.; MARTENET, M.; EDMAN, P.; CAMBER, O. Precorneal residence time in humans of sodium hyaluronate as measured by gamma scintigraphy. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**. v.228, n.6, p.510-512, 1990.
- GUY, R.H. & HADGRAFT, J. On the Determination of Drug Release Rates from Topical Dosage Forms. **Int J Pharm**. v.60, n.2, p.R1-R3, 1990.
- GUY, R.H.; KALIA, Y. N.; DELGADO-CHARRO, M. B.; MERINO, V.; LOPEZ, A.; MARRO, D. Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. **J Control Release**. v.64, n.1-3, p.129-132, 2000.
- HABIB, F.S.; FOUAD, E. A.; ABDEL-RAHMAN, M. S.; FATHALLA, D. Liposomes As An Ocular Delivery System for Fluconazole: In-Vivo Study. **Bull Pharm Sci**. v.31, n., p.249-263, 2008a.
- HABIB, F.S.; FOUAD, E. A.; FATHALLA, D. Liposomes As An Ocular Delivery System of Fluconazole: In-Vitro Studies. **Bull Pharm Sci**. v.31, n., p.293-311, 2008b.
- HACHICHA, W.; KODJIKIAN, L.; FESSI, H. Preparation of vancomycin microparticles: Importance of preparation parameters. **Int J Pharm**. v.324, n.2, p.176-184, 2006.
- HAGAN, M.; WRIGHT, E.; NEWMAN, M.; DOLIN, P.; JOHNSON, G. Causes of suppurative keratitis in Ghana. **Br J Ophthalmol**. v.79, n.11, p.1024-1028, 1995.
- HAGERSTROM, H. & EDSMAN, K. Interpretation of mucoadhesive properties of polymer gel preparations using a tensile strength method. **J Pharm Pharmacol**. v.53, n.12, p.1589-1599, 2001.
- HALL, L.R.; LASS, J. H.; DIACONU, E.; STRINE, E. R.; PEARLMAN, E. An essential role for antibody in neutrophil and eosinophil recruitment to the cornea: B cell-deficient (microMT) mice fail to develop Th2-dependent, helminth-mediated keratitis. **J Immunol**. v.163, n.9, p.4970-4975, 1999.
- HAO, J.S.; LI, S. K.; LIU, C. Y.; KAO, W. W. Y. Electrically assisted delivery of macromolecules into the corneal epithelium. **Exp Eye Res**. v.89, n.6, p.934-941, 2009a.
- HAO, J.S.; SMITH, K. A.; LI, S. K. Iontophoretically Enhanced Ciclopirox Delivery into and Across Human Nail Plate. **J Pharm Sci**. v.98, n.10, p.3608-3616, 2009b.
- HARTIKKA, J.; GEALL, A.; BOZOUKOVA, V.; KURNIADI, D.; RUSALOV, D.; ENAS, J.; YI, J. H.; NANJI, A.; ROLLAND, A. Physical characterization and *in vivo* evaluation of poloxamer-based DNA vaccine formulations. **J Gene Med**. v.10, n.7, p.770-782, 2008.
- HASSAN, E.E. & GALLO, J. M. A simple rheological method for the *in vitro* assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength. **Pharm Res**. v.7, n.5, p.491-495, 1990.
- HASTINGS, S.M.; LI, S. K.; MILLER, D. J.; BERNSTEIN, P. S.; MUFSON, D. Visulex™: Advancing Iontophoresis for Effective Noninvasive Back-of-the-Eye Therapeutics. **Drug Del Technol**. v.4, n.3, 2004.
- HAZNEDAR, S. & DORTUNC, B. Preparation and *in vitro* evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide. **Int J Pharm**. v.269, n.1, p.131-140, 2004.

- HEGAZY, N.; DEMIREL, M.; YAZAN, Y. Preparation and *in vitro* evaluation of pyridostigmine bromide microparticles. **Int J Pharm.** v.242, n.1-2, p.171-174, 2002.
- HENRY, R.L. & SCHMOLKA, I. R. Burn Wound Coverings and the Use of Poloxamer Preparations. **Crit Rev Bioncompat.** v.5, n.3, p.207-220, 1989.
- HERAI, H. Obtenção e caracterização de formulações contendo doxorubicina para a quimioterapia tópica do câncer de pele: iontoforese versus promotor de absorção. **Dissertação de Mestrado.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, 2004.
- HIGUCHI, T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. **J Soc Cosmet Chem**11, p.85-97, 1960.
- HOBDEN, J.A.; O'CALLAGHAN, R. J.; HILL, J. M.; REIDY, J. J.; ROOTMAN, D. S.; THOMPSON, H. W. Tobramycin iontophoresis into corneas infected with drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Curr Eye Res.** v.8, n.11, p.1163-1169, 1989.
- HOBDEN, J.A.; REIDY, J. J.; O'CALLAGHAN, R. J.; INSLEER, M. S.; HILL, J. M. Ciprofloxacin iontophoresis for aminoglycoside-resistant pseudomonal keratitis. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.31, n.10, p.1940-1944, 1990.
- HOLGADO, S.; LUNA, J. D.; JUAREZ, C. P. Postoperative candida keratitis treated successfully with fluconazole. **Ophthalmic Surg.** v.24, n.2, p.132-, 1993.
- HOLLANDER, D.A. & ALDAVE, A. J. Drug-induced corneal complications. **Curr Opin Ophthalmol.** v.15, n.6, p.541-548, 2004.
- HOLLY, F.J. & ESQUIVEL, E. D. Colloid osmotic pressure of artificial tears. **J Ocul Pharmacol.** v.1, n.4, p.327-336, 1985.
- HSIUE, G.H.; GUU, J. A.; CHENG, C. C. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) film as a drug delivery system for pilocarpine. **Biomaterials.** v.22, n.13, p.1763-1769, 2001.
- HSU, J. Drug delivery methods for posterior segment disease. **Curr Opin Ophthalmol.** v.18, n.3, p.235-239, 2007.
- HUGHES, L. & MAURICE, D. M. A fresh look at iontophoresis. **Arch Ophthalmol.** v.102, n.12, p.1825-1829, 1984.
- HUGHES, P.M.; KRISHNAMOORTHY, R.; MITRA, A. K. Vitreous disposition of two acycloguanosine antivirals in the albino and pigmented rabbit models: a novel ocular microdialysis technique. **J Ocul Pharmacol Ther.** v.12, n.2, p.209-224, 1996.
- IBRAHIM, M.M.; VANINI, R.; IBRAHIM, F. M.; FIORITI, L. S.; FURLAN, E. M. R.; PROVINZANO, L. M. A.; DE CASTRO, R. S.; SOUSA, S. J. D. E.; ROCHA, E. M. Epidemiologic aspects and clinical outcome of fungal keratitis in southeastern Brazil. **Eur J Ophthalmol.** v.19, n.3, p.355-361, 2009.
- ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.** v. 2005.
- ITALIA, J.L.; YAHYA, M. M.; SINGH, D.; KUMAR, M. N. V. R. Biodegradable Nanoparticles Improve Oral Bioavailability of Amphotericin B and Show Reduced Nephrotoxicity Compared to Intravenous FungizoneA (R). **Pharm Res.** v.26, n.6, p.1324-1331, 2009.

- JADOUL, A.; BOUWSTRA, J.; PREAT, V., V. Effects of iontophoresis and electroporation on the stratum corneum. Review of the biophysical studies. **Adv Drug Deliv Rev.** v.35, n.1, p.89-105, 1999.
- JARVINEN, K.; JARVINEN, T.; URTTI, A. Ocular Absorption Following Topical Delivery. **Adv Drug Deliv Rev.** v.16, n.1, p.3-19, 1995.
- JAVOT, L.; LECOMPTE, T.; RABSKOVA, M.; MAINCENT, P. Encapsulation of low molecular weight heparins: Influence on the anti-Xa/anti-IIa ratio. **J Control Release.** v.139, n.1, p.8-14, 2009.
- JONES, D.S. Dynamic mechanical analysis of polymeric systems of pharmaceutical and biomedical significance. **Int J Pharm.** v.179, n.2, p.167-178, 1999.
- JONES, D.S.; BROWN, A. F.; WOOLFSON, A. D. Rheological characterization of bioadhesive, antimicrobial, semisolids designed for the treatment of periodontal diseases: transient and dynamic viscoelastic and continuous shear analysis. **J Pharm Sci.** v.90, n.12, p.1978-1990, 2001.
- JONES, D.S.; BRUSCHI, M. L.; DE FREITAS, O.; GREMIAO, M. P. D.; LARA, E. H. G.; ANDREWS, G. P. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **Int J Pharm.** v.372, n.1-2, p.49-58, 2009.
- JONES, D.S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. **Int J Pharm.** v.151, n.2, p.223-233, 1997.
- JUHASZ, J.; LENAERTS, V.; RAYMOND, P.; ONG, H. Diffusion of rat atrial natriuretic factor in thermoreversible poloxamer gels. **Biomaterials.** v.10, n.4, p.265-268, 1989.
- KALIA, Y.N.; NAIK, A.; GARRISON, J.; GUY, R. H. Iontophoretic drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev.** v.56, n.5, p.619-658, 2004.
- KATO, A. & IWATA, S. *In vitro* study on corneal permeability to bunazosin. **J Pharmacobiodyn.** v.11, n.2, p.115-120, 1988.
- KAUR, I.P.; GARG, A.; SINGLA, A. K.; AGGARWAL, D. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. **Int J Pharm.** v.269, n.1, p.1-14, 2004.
- KAUR, I.P. & KANWAR, M. Ocular preparations: the formulation approach. **Drug Dev Ind Pharm.** v.28, n.5, p.473-493, 2002a.
- KAUR, I.P.; RANA, C.; SINGH, H. Development of effective ocular preparations of antifungal agents. **J Ocul Pharmacol Ther.** v.24, n.5, p.481-493, 2008.
- KAUR, I.P. & SMITHA, R. Penetration enhancers and ocular bioadhesives: two new avenues for ophthalmic drug delivery. **Drug Dev Ind Pharm.** v.28, n.4, p.353-369, 2002b.
- KECIK, T.; SZLASKI, J.; PORTACHA, L.; LEWANDOWSKI, P.; MARCHLEWSKA, B.; PACAK, I. [Studies of releasing rate of pilocarpine hydrochloride from hydrogel eye ointments]. **Klin Oczna.** v.95, n.7, p.263-264, 1993.
- KHAIRALLAH, S.H.; BYRNE, K. A.; TABBARA, K. F. Fungal keratitis in Saudi Arabia. **Doc Ophthalmol.** v.79, n.3, p.269-276, 1992.
- KHOR, W.B.; AUNG, T.; SAW, S. M.; WONG, T. Y.; TAMBYAH, P. A.; TAN, A. L.; BEUERMAN, R.; LIM, L.; CHAN, W. K.; HENG, W. J.; LIM, J.; LOH, R. S. K.; LEE, S. B.; TAN,

- D. T. H. An outbreak of *Fusarium* keratitis associated with contact lens wear in Singapore. **JAMA**. v.295, n.24, p.2867-2873, 2006.
- KIM, E. Y.; GAO, Z. G.; PARK, J. S.; LI, H.; HAN, K. rhEGF/HP-beta-CD complex in poloxamer gel for ophthalmic delivery. **Int J Pharm**. v.233, n.1-2, p.159-167, 2002.
- KINOSHITA, S.; ADACHI, W.; SOTOZONO, C.; NISHIDA, K.; YOKOI, N.; QUANTOCK, A. J.; OKUBO, K. Characteristics of the human ocular surface epithelium. **Prog Retin Eye Res**. v.20, n.5, p.639-673, 2001.
- KLOTZ, S.A.; AU, Y. K.; MISRA, R. P. A partial-thickness epithelial defect increases the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to the cornea. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v.30, n.6, p.1069-1074, 1989.
- KLOTZ, S.A.; PENN, C. C.; NEGVESKY, G. J.; BUTRUS, S. I. Fungal and parasitic infections of the eye. **Clin Microbiol Rev**. v.13, n.4, p.662-685, 2000.
- KOMPELLA, U.B.; BANDI, N.; AYALASOMAYAJULA, S. P. Subconjunctival nano- and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v.44, n.3, p.1192-1201, 2003.
- KOTIYAN, P.N. & VAVIA, P. R. Eudragits: role as crystallization inhibitors in drug-in-adhesive transdermal systems of estradiol. **Eur J Pharm Biopharm**. v.52, n.2, p.173-180, 2001.
- KREJCOVA, K.; GRYCZOVA, E.; RABISKOVA, M. Polymeric Microparticles for Oral Administration of Diclofenac Sodium. **Chemicke Listy**. v.103, n.1, p.81-87, 2009.
- KRISHNAN, S.; MANAVATHU, E. K.; CHANDRASEKAR, P. H. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. **Mycoses**. v.52, n.3, p.206-222, 2009.
- KUMAR, S.; HAGLUND, B. O.; HIMMELSTEIN, K. J. *In situ*-forming gels for ophthalmic drug delivery. **J Ocul Pharmacol**. v.10, n.1, p.47-56, 1994.
- KURPAKUS-WHEATER, M.; KERNACKI, K. A.; HAZLETT, L. D. Maintaining corneal integrity how the "window" stays clear. **Prog Histochem Cytochem**. v.36, n.3, p.185-259, 2001.
- KUSANO, M.; UEMATSU, M.; KUMAGAMI, T.; SASAKI, H.; KITAOKA, T. Evaluation of acute corneal barrier change induced by topically applied preservatives using corneal transepithelial electric resistance *in vivo*. **Cornea**. v.29, n.1, p.80-85, 2010.
- LAN, E.L.; UGWU, S. O.; BLANCHARD, J.; FANG, X. J.; HRUBY, V. J.; SHARMA, S. Preformulation Studies with Melanotan-II - A Potential Skin-Cancer Chemopreventive Peptide. **J Pharm Sci**. v.83, n.8, p.1081-1084, 1994.
- LE BOURLAIS, C.; ACAR, L.; ZIA, H.; SADO, P. A.; NEEDHAM, T.; LEVERGE, R. Ophthalmic drug delivery systems - Recent advances. **Prog Retin Eye Res**. v.17, n.1, p.33-58, 1998.
- LE QUELLEC, A.; DUPIN, S.; GENISSEL, P.; SAIVIN, S.; MARCHAND, B.; HOUIN, G. Microdialysis probes calibration: gradient and tissue dependent changes in no net flux and reverse dialysis methods. **J Pharmacol Toxicol Methods**. v.33, n.1, p.11-16, 1995.
- LECK, A.K.; THOMAS, P. A.; HAGAN, M.; KALIAMURTHY, J.; ACKUAKU, E.; JOHN, M.; NEWMAN, M. J.; CODJOE, F. S.; OPINTAN, J. A.; KALAVATHY, C. M.; ESSUMAN, V.; JESUDASAN, C. A.; JOHNSON, G. J. Aetiology of suppurative corneal ulcers in Ghana and south India, and epidemiology of fungal keratitis. **Br J Ophthalmol**. v.86, n.11, p.1211-1215, 2002.

- LEE, J.W.; PARK, J. H.; ROBINSON, J. R. Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. **J Pharm Sci.** v.89, n.7, p.850-866, 2000.
- LEE, V.H. & ROBINSON, J. R. Topical ocular drug delivery: recent developments and future challenges. **J Ocul Pharmacol.** v.2, n.1, p.67-108, 1986.
- LEHR, C.M.; BOUWSTRA, J. A.; SCHACHT, E. H.; JUNGINGER, H. E. Invitro Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan and Some Other Natural Polymers. **Int J Pharm.** v.78, n.1, p.43-48, 1992.
- LI, G.L.; DANHOF, M.; BOUWSTRA, J. A. Lontophoretic delivery of apomorphine *in vitro*: physicochemic considerations. **Pharm Res.** v.18, n.11, p.1509-1513, 2001.
- LI, Y.; PERIS, J.; ZHONG, L.; DERENDORF, H. Microdialysis as a tool in local pharmacodynamics. **AAPS J.** v.8, n.2, p.E222-E235, 2006.
- LIESEGGANG, T.J. & FORSTER, R. K. Spectrum of microbial keratitis in South Florida. **Am J Ophthalmol.** v.90, n.1, p.38-47, 1980.
- LIN, H.R.; SUNG, K. C.; VONG, W. J. *In situ* gelling of alginate/pluronic solutions for ophthalmic delivery of pilocarpine. **Biomacromolecules.** v.5, n.6, p.2358-2365, 2004.
- LIU, Z.; PAN, W.; NIE, S.; ZHANG, L.; YANG, X.; LI, J. Preparation and evaluation of sustained ophthalmic gel of enoxacin. **Drug Dev Ind Pharm.** v.31, n.10, p.969-975, 2005.
- LIU, Z.; YANG, X. G.; LI, X.; PAN, W.; LI, J. Study on the ocular pharmacokinetics of ion-activated *in situ* gelling ophthalmic delivery system for gatifloxacin by microdialysis. **Drug Dev Ind Pharm.** v.33, n.12, p.1327-1331, 2007.
- LOPEZ, R.F.; BENTLEY, M. V.; BEGONA DELGADO-CHARRO, M.; GUY, R. H. Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis. **J Control Release.** v.88, n.1, p.65-70, 2003a.
- LOPEZ, R.F.; BENTLEY, M. V.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. **Pharm Res.** v.18, n.3, p.311-315, 2001.
- LOPEZ, R.F.; BENTLEY, M. V.; DELGADO-CHARRO, M. B.; SALOMON, D.; VAN DEN, B. H.; LANGE, N.; GUY, R. H. Enhanced delivery of 5-aminolevulinic acid esters by iontophoresis *in vitro*. **Photochem Photobiol.** v.77, n.3, p.304-308, 2003b.
- LOPEZ, R.F.; COLLETT, J. H.; BENTLEY, M. V. Influence of cyclodextrin complexation on the *in vitro* permeation and skin metabolism of dexamethasone. **Int J Pharm.** v.200, n.1, p.127-132, 2000.
- LOPEZ, R.F.; LANGE, N.; GUY, R.; BENTLEY, M. V. Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. **Adv Drug Deliv Rev.** v.56, n.1, p.77-94, 2004.
- LUCERO, M.J.; VIGO, J.; LEON, M. J. A Study of Shear and Compression Deformations on Hydrophilic Gels of Tretinoin. **Int J Pharm.** v.106, n.2, p.125-133, 1994.
- LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev.** v.57, n.11, p.1595-1639, 2005.
- LUDWIG, A. & VAN OOTEGHEM, M. The influence of the osmolality on the precorneal retention of ophthalmic solutions. **J Pharm Belg.** v.42, n.4, p.259-266, 1987.
- LUEPKE, N.P. Hens Egg Chorioallantoic Membrane Test for Irritation Potential. **Food Chem Toxicol.** v.23, n.2, p.287-291, 1985.

- MACHA, S. & MITRA, A. K. Ocular pharmacokinetics in rabbits using a novel dual probe microdialysis technique. **Exp Eye Res.** v.72, n.3, p.289-299, 2001.
- MACRI, F.J. & CEVARIO, S. J. Ciliary ganglion stimulation. II. Neurogenic, intraocular pathway for excitatory effects on aqueous humor production and outflow. **Invest Ophthalmol.** v.14, n.6, p.471-475, 1975.
- MAJUMDAR, S.; HIPPALGAONKAR, K.; REPKA, M. A. Effect of chitosan, benzalkonium chloride and ethylenediaminetetraacetic acid on permeation of acyclovir across isolated rabbit cornea. **Int J Pharm.** v.348, n.1-2, p.175-178, 2008.
- MAKHLOF, A.; WERLE, M.; TAKEUCHI, H. Mucoadhesive drug carriers and polymers for effective drug delivery. **J Drug Deliv Sci Technol.** v.18, n.6, p.375-386, 2008.
- MALBOUISSON, J.M.; BITTAR, M. D.; OBEID, H. N.; GUIMARAES, F. C.; VELASCO E CRUZ AA. Quantitative study of the effect of dacryocystorhinostomy on lacrimal drainage. **Acta Ophthalmol Scand.** v.75, n.3, p.290-294, 1997.
- MANDELL, K.J.; BERGLIN, L.; SEVERSON, E. A.; EDELHAUSER, H. F.; PARKOS, C. A. Expression of JAM-A in the human corneal endothelium and retinal pigment epithelium: localization and evidence for role in barrier function. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.48, n.9, p.3928-3936, 2007.
- MARRO, D.; KALIA, Y. N.; DELGADO-CHARRO, M. B.; GUY, R. H. Contributions of electromigration and electroosmosis to iontophoretic drug delivery. **Pharm Res.** v.18, n.12, p.1701-1708, 2001.
- MATHERS, W.D.; LANE, J. A.; SUTPHIN, J. E.; ZIMMERMAN, M. B. Model for ocular tear film function. **Cornea.** v.15, n.2, p.110-119, 1996.
- MATHY, F.X.; NTIVUNWA, D.; VERBEECK, R. K.; PREAT, V. Fluconazole distribution in rat dermis following intravenous and topical application: A microdialysis study. **J Pharm Sci.** v.94, n.4, p.770-780, 2005.
- MATSUDA, H. & ARIMA, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. **Adv Drug Deliv Rev.** v.36, n.1, p.81-99, 1999.
- MAURICE, D. Iontophoresis and transcorneal penetration of tobramycin. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.30, n.6, p.1181-1182, 1989.
- MAURICE, D. Review: practical issues in intravitreal drug delivery. **J Ocul Pharmacol Ther.** v.17, n.4, p.393-401, 2001.
- MAURICE, D.M. Influence on corneal permeability of bathing with solutions of differing reaction and tonicity. **Br J Ophthalmol.** v.39, n.8, p.463-473, 1955.
- MAURICE, D.M. The structure and transparency of the cornea. **J Physiol.** v.136, n.2, p.263-286, 1957.
- MAURICE, D.M. The use of fluorescein in ophthalmological research. **Invest Ophthalmol.** v.6, n.5, p.464-477, 1967.
- MAURICE, D.M. The tonicity of an eye drop and its dilution by tears. **Exp Eye Res.** v.11, n.1, p.30-33, 1971.

- MAYO, L.; QUAGLIA, F.; BORZACCHIELLO, A.; AMBROSIO, L.; LA ROTONDA, M. I. A novel poloxamers/hyaluronic acid *in situ* forming hydrogel for drug delivery: Rheological, mucoadhesive and *in vitro* release properties. **Eur J Pharm Biopharm.** v.70, n.1, p.199-206, 2008.
- MCCLELLAN, K.A. Mucosal defense of the outer eye. **Surv Ophthalmol.** v.42, n.3, p.233-246, 1997.
- MCINNES, F.; CLEAR, N.; JAMES, G.; STEVENS, H. N.; VIVANCO, U.; HUMPHREY, M. Evaluation of the Clearance of a Sublingual Buprenorphine Spray in the Beagle Dog Using Gamma Scintigraphy. **Pharm Res**, 2007.
- MENDICUTE, J.; ORBEGOZO, J.; RUIZ, M.; SAIZ, A.; EDER, F.; ARAMBERRI, J. Keratomycosis after cataract surgery. **J Cataract Refract Surg.** v.26, n.11, p.1660-1666, 2000.
- MERINO, V.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Transdermal therapy and diagnosis by iontophoresis. **Trends Biotechnol.** v.15, n.8, p.288-290, 1997.
- MILLER, S.C. & DONOVAN, M. D. Effect of Poloxamer 407 Gel on the Miotic Activity of Pilocarpine Nitrate in Rabbits. **Int J Pharm.** v.12, n.2-3, p.147-152, 1982.
- MILLER, S.C. & DRABIK, B. R. Rheological Properties of Poloxamer Vehicles. **Int J Pharm.** v.18, n.3, p.269-276, 1984.
- MILOSOVICH, S.; HUSSAIN, A.; DITTERT, L.; AUNGST, B.; HUSSAIN, M. Testosterone-4-Dimethylaminobutyrate.Hcl - A Prodrug with Improved Skin Penetration Rate. **J Pharm Sci.** v.82, n.2, p.227-228, 1993.
- MISHIMA, S. Some Physiological Aspects of Precorneal Tear Film. **Arch Ophthalmol.** v.73, n.2, p.233-&, 1965.
- MIYAZAKI, S.; SUZUKI, S.; KAWASAKI, N.; ENDO, K.; TAKAHASHI, A.; ATTWOOD, D. *In situ* gelling xyloglucan formulations for sustained release ocular delivery of pilocarpine hydrochloride. **Int J Pharm.** v.229, n.1-2, p.29-36, 2001.
- MOLOKHIA, S.A.; JEONG, E. K.; HIGUCHI, W. I.; LI, S. K. Transscleral iontophoretic and intravitreal delivery of a macromolecule: Study of ocular distribution *in vivo* and postmortem with MRI. **Exp Eye Res.** v.88, n.3, p.418-425, 2009.
- MONTI, D.; SACCOMANI, L.; CHETONI, P.; BURGALASSI, S.; SAETTONE, M. F. Effect of iontophoresis on transcorneal permeation '*in vitro*' of two beta-blocking agents, and on corneal hydration. **Int J Pharm.** v.250, n.2, p.423-429, 2003.
- MORTAZAVI, S.A. & SMART, J. D. Factors influencing gel-strengthening at the mucoadhesive-mucus interface. **J Pharm Pharmacol.** v.46, n.2, p.86-90, 1994.
- MORTENSEN, K. & BROWN, W. Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Propylene Oxide)-Poly(Ethylene Oxide) Triblock Copolymers in Aqueous-Solution - the Influence of Relative Block Size. **Macromolecules.** v.26, n.16, p.4128-4135, 1993.
- MOSCICKA-STUDZINSKA, A.; KIJENSKA, E.; CIACH, T. Electroosmotic flow as a result of buccal iontophoresis - Buccal mucosa properties. **Eur J Pharm Biopharm.** v.72, n.3, p.595-599, 2009.
- MOSHFEGHI, D.M.; KAISER, P. K.; SCOTT, I. U.; SEARS, J. E.; BENZ, M.; SINESTERRA, J. P.; KAISER, R. S.; BAKRI, S. J.; MATURI, R. K.; BELMONT, J.; BEER, P. M.; MURRAY, T. G.;

- QUIROZ-MERCADO, H.; MIELER, W. F. Acute endophthalmitis following intravitreal triamcinolone acetonide injection. **Am J Ophthalmol.** v.136, n.5, p.791-796, 2003.
- MOSTELLER, M.W.; GEBHARDT, B. M.; HAMILTON, A. M.; KAUFMAN, H. E. Penetration of topical cyclosporine into the rabbit cornea, aqueous humor, and serum. **Arch Ophthalmol.** v.103, n.1, p.101-102, 1985.
- MULLER, L.J.; MARFURT, C. F.; KRUSE, F.; TERVO, T. M. Corneal nerves: structure, contents and function. **Exp Eye Res.** v.76, n.5, p.521-542, 2003.
- MURTHY, K.S.; TALIM, S. T.; SINGH, I. A comparative evaluation of topical application and iontophoresis of sodium fluoride for desensitization of hypersensitive dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** v.36, n.3, p.448-458, 1973.
- MUSIOL, R.; JAMPILEK, J.; BUCHTA, V.; SILVA, L.; NIEDBALA, H.; PODESZWA, B.; PALKA, A.; MAJERZ-MANIECKA, K.; OLEKSYN, B.; POLANSKI, J. Antifungal properties of new series of quinoline derivatives. **Bioorg Med Chem.** v.14, n.10, p.3592-3598, 2006.
- NAGYOVA, B. & TIFFANY, J. M. Components responsible for the surface tension of human tears. **Curr Eye Res.** v.19, n.1, p.4-11, 1999.
- NAIR, A.B.; KIM, H. D.; CHAKRABORTY, B.; SINGH, J.; ZAMAN, M.; GUPTA, A.; FRIDEN, P. M.; MURTHY, S. N. Ungual and Trans-Ungual Iontophoretic Delivery of Terbinafine for the Treatment of Onychomycosis. **J Pharm Sci.** v.98, n.11, p.4130-4140, 2009.
- NANJAWADE, B.K.; MANVI, F. V.; MANJAPPA, A. S. *In situ*-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery. **J Control Release.** v.122, n.2, p.119-134, 2007.
- NAVEGANTES, L.C.; SJOSTRAND, M.; GUDBJORNSDOTTIR, S.; STRINDBERG, L.; ELAM, M.; LONNROTH, P. Regulation and counterregulation of lipolysis *in vivo*: different roles of sympathetic activation and insulin. **J Clin Endocrinol Metab.** v.88, n.11, p.5515-5520, 2003.
- NAYAK, N. Fungal infections of the eye--laboratory diagnosis and treatment. **Nepal Med Coll J.** v.10, n.1, p.48-63, 2008.
- NICOLI, S.; FERRARI, G.; QUARTA, M.; MACALUSO, C.; SANTI, P. *In vitro* transscleral iontophoresis of high molecular weight neutral compounds. **Eur J Pharm Sci.** v.36, n.4-5, p.486-492, 2009.
- NISHIDA, K.; KAWASAKI, S.; KINOSHITA, S. Clusterin may be essential for maintaining ocular surface epithelium as a non-keratinizing epithelium. **Adv Exp Med Biol.** v.438, n., p.629-635, 1998.
- O'DAY, D.M.; RAY, W. A.; HEAD, W. S.; ROBINSON, R. D. Influence of the corneal epithelium on the efficacy of topical antifungal agents. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.25, n.7, p.855-859, 1984.
- O'NAN, W.W.; WIRTSCHAFTER, J. D.; PRESTON, D. F. Sodium pertechnetate Tc 99m in lacrimal secretion. **Arch Ophthalmol.** v.91, n.3, p.187-189, 1974.
- OECHSNER, M. & KEIPERT, S. Polyacrylic acid/polyvinylpyrrolidone bipolymeric systems. I. Rheological and mucoadhesive properties of formulations potentially useful for the treatment of dry-eye-syndrome. **Eur J Pharm Biopharm.** v.47, n.2, p.113-118, 1999.
- OHTORI, R.; SATO, H.; FUKUDA, S.; UEDA, T.; KOIDE, R.; KANDA, Y.; KIUCHI, Y.; OGUCHI, K. Pharmacokinetics of topical beta-adrenergic antagonists in rabbit aqueous humor evaluated with the microdialysis method. **Exp Eye Res.** v.66, n.4, p.487-494, 1998.

- PANCHAGNULA, R.; PILLAI, O.; NAIR, V. B.; RAMARAO, P. Transdermal iontophoresis revisited. **Curr Opin Chem Biol.** v.4, n.4, p.468-473, 2000.
- PANDA, A.; SATPATHY, G.; NAYAK, N.; KUMAR, S.; KUMAR, A. Demographic pattern, predisposing factors and management of ulcerative keratitis: evaluation of one thousand unilateral cases at a tertiary care centre. **Clin Exp Ophthalmol.** v.35, n.1, p.44-50, 2007.
- PANGBURN, S.H.; TRESCONY, P. V.; HELLER, J. Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. **Biomaterials.** v.3, n.2, p.105-108, 1982.
- PARIKH, R.H.; PARIKH, J. R.; DUBEY, R. R.; SONI, H. N.; KAPADIA, K. N. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres containing 5-fluorouracil: optimization of process parameters. **AAPS Pharmscitech.** v.4, n.2, p.E13-, 2003.
- PARK, Y.W. Rheological characteristics of goat and sheep milk. **Small Rumin Res.** v.68, n.1-2, p.73-87, 2007.
- PATTON, T.F. & ROBINSON, J. R. Ocular evaluation of polyvinyl alcohol vehicle in rabbits. **J Pharm Sci.** v.64, n.8, p.1312-1316, 1975.
- PAWAR, P.K. & MAJUMDAR, D. K. Effect of formulation factors on *in vitro* permeation of moxifloxacin from aqueous drops through excised goat, sheep, and buffalo corneas. **AAPS Pharmscitech.** v.7, n.1, 2006.
- PENG, H.S.; LIU, X. J.; LV, G. X.; SUN, B.; KONG, Q. F.; ZHAI, D. X.; WANG, Q.; ZHAO, W.; WANG, G. Y.; WANG, D. D.; LI, H. L.; JIN, L. H.; KOSTULAS, N. Voriconazole into PLGA nanoparticles: Improving agglomeration and antifungal efficacy. **Int J Pharm.** v.352, n.1-2, p.29-35, 2008.
- PEREZ-BALBUENA, A.; VANZZINI-ROSANO, V.; VALADEZ-VIRGEN, J. D.; CAMPOS-MOLLER, X. Fusarium Keratitis in Mexico. **Cornea.** v.28, n.6, p.626-630, 2009.
- PIGNATELLO, R.; BUCOLO, C.; FERRARA, P.; MALTESE, A.; PULEO, A.; PUGLISI, G. Eudragit RS100 nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. **Eur J Pharm Sci.** v.16, n.1-2, p.53-61, 2002a.
- PIGNATELLO, R.; BUCOLO, C.; PUGLISI, G. Ocular tolerability of Eudragit RS100 and RL100 nanosuspensions as carriers for ophthalmic controlled drug delivery. **J Pharm Sci.** v.91, n.12, p.2636-2641, 2002b.
- PIGNATELLO, R.; BUCOLO, C.; SPEDALIERI, G.; MALTESE, A.; PUGLISI, G. Flurbiprofen-loaded acrylate polymer nanosuspensions for ophthalmic application. **Biomaterials.** v.23, n.15, p.3247-3255, 2002c.
- PIKAL, M.J. & SHAH, S. Transport mechanisms in iontophoresis. II. Electroosmotic flow and transference number measurements for hairless mouse skin. **Pharm Res.** v.7, n.3, p.213-221, 1990.
- PLOCK, N. & KLOFT, C. Microdialysis--theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. **Eur J Pharm Sci.** v.25, n.1, p.1-24, 2005.
- PRYDAL, J.I.; ARTAL, P.; WOON, H.; CAMPBELL, F. W. Study of human precorneal tear film thickness and structure using laser interferometry. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.33, n.6, p.2006-2011, 1992.

- QI, H.; CHEN, W.; HUANG, C.; LI, L.; CHEN, C.; LI, W.; WU, C. Development of a poloxamer analogs/carbopol-based *in situ* gelling and mucoadhesive ophthalmic delivery system for puerarin. **Int J Pharm.** v.337, n.1-2, p.178-187, 2007.
- RAFIEE-TEHRANI, M.; SAFAII-NIKUI, N.; PETERIET, H.; BECKERT, T. Acrylic resins as rate-controlling membranes in novel formulation of a nine-day 17beta-estradiol transdermal delivery system: *in vitro* and release modifier effect evaluation. **Drug Dev Ind Pharm.** v.27, n.5, p.431-437, 2001.
- RAO, S.K.; LAM, P. T. H.; LI, E. Y. M.; YUEN, H. K. L.; LAM, D. S. C. A case series of contact lens-associated Fusarium keratitis in Hong Kong. **Cornea.** v.26, n.10, p.1205-1209, 2007.
- RASSU, G.; GAVINI, E.; SPADA, G.; GIUNCHEDI, P.; MARCEDDU, S. Ketoprofen spray-dried microspheres based on Eudragit RS and RL: study of the manufacturing parameters. **Drug Dev Ind Pharm.** v.34, n.11, p.1178-1187, 2008.
- REICHL, S.; DOHRING, S.; BEDNARZ, J.; MULLER-GOYMANN, C. C. Human cornea construct HCC-an alternative for *in vitro* permeation studies? A comparison with human donor corneas. **Eur J Pharm Biopharm.** v.60, n.2, p.305-308, 2005.
- REN, T.B.; XU, N.; CAO, C. H.; YUAN, W. Z.; YU, X.; CHEN, J. H.; REN, J. Preparation and Therapeutic Efficacy of Polysorbate-80-Coated Amphotericin B/PLA-b-PEG Nanoparticles. **J Biomater Sci Polym Ed.** v.20, n.10, p.1369-1380, 2009.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J Cell Biol.** v.17, n., p.208-212, 1963.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Quim Nova.** v.27, n.5, p.771-780, 2004.
- RITTENHOUSE, K.D.; PEIFFER, R. L., JR.; POLLACK, G. M. Evaluation of microdialysis sampling of aqueous humor for *in vivo* models of ocular absorption and disposition. **J Pharm Biomed Anal.** v.16, n.6, p.951-959, 1998.
- RITTENHOUSE, K.D. & POLLACK, G. M. Microdialysis and drug delivery to the eye. **Adv Drug Deliv Rev.** v.45, n.2-3, p.229-241, 2000.
- RITTERBAND, D.C.; SEEDOR, J. A.; SHAH, M. K.; KOPLIN, R. S.; MCCORMICK, S. A. Fungal keratitis at the New York Eye and Ear Infirmary. **Cornea.** v.25, n.3, p.264-267, 2006.
- RIVERA, P.A.; MARTINEZ-OHARRIZ, M. C.; RUBIO, M.; IRACHE, J. M.; ESPUELAS, S. Fluconazole encapsulation in PLGA microspheres by spray-drying. **J Microencapsul.** v.21, n.2, p.203-211, 2004.
- RODRIGUES, L.B.; LEITE, H. F.; YOSHIDA, M. I.; SALIBA, J. B.; CUNHA, A. S.; FARACO, A. A. G. *In vitro* release and characterization of chitosan films as dexamethasone carrier. **Int J Pharm.** v.368, n.1-2, p.1-6, 2009.
- ROJANASAKUL, Y. & ROBINSON, J. R. Electrophysiological and Ultrastructural Characterization of the Cornea During Invitro Perfusion. **Int J Pharm.** v.63, n.1, p.1-16, 1990.
- ROJANASAKUL, Y.Y. & ROBINSON, J. R. Transport Mechanisms of the Cornea - Characterization of Barrier Permselectivity. **Int J Pharm.** v.55, n.2-3, p.237-246, 1989.

- ROOTMAN, D.S.; HOB DEN, J. A.; JANTZEN, J. A.; GONZALEZ, J. R.; O'CALLAGHAN, R. J.; HILL, J. M. Iontophoresis of tobramycin for the treatment of experimental *Pseudomonas keratitis* in the rabbit. **Arch Ophthalmol.** v.106, n.2, p.262-265, 1988.
- ROSS JS & SHAH, J. C. Reduction in skin permeation of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) by altering the skin/vehicle partition coefficient. **J Control Release.** v.67, n.2-3, p.211-221, 2000.
- ROSSI, S.; FERRARI, F.; BONFERONI, M. C.; CARAMELLA, C. Characterization of chitosan hydrochloride-mucin interaction by means of viscosimetric and turbidimetric measurements. **Eur J Pharm Sci.** v.10, n.4, p.251-257, 2000.
- ROSSI, S.; FERRARI, F.; BONFERONI, M. C.; CARAMELLA, C. Characterization of chitosan hydrochloride-mucin rheological interaction: influence of polymer concentration and polymer : mucin weight ratio. **Eur J Pharm Sci.** v.12, n.4, p.479-485, 2001.
- ROSSMURPHY, S.B. & MCEVOY, H. Fundamentals of Hydrogels and Gelation. **Br Polym J.** v.18, n.1, p.2-7, 1986.
- ROSSOMONDO, R.M.; CARLTON, W. H.; TRUEBLOOD, J. H.; THOMAS, R. P. A new method of evaluating lacrimal drainage. **Arch Ophthalmol.** v.88, n.5, p.523-525, 1972.
- SAFWAT, S.M. & AL KASSAS, R. S. Evaluation of gentamicin-Eudragit microspheres as ophthalmic delivery systems in inflamed rabbit's eyes. **Stp Pharma Sciences.** v.12, n.6, p.357-361, 2002.
- SALERA, C.M.; TANURE, M. A. G.; LIMA, W. T. M.; TRINDADE, F. C.; MOREIRA, J. A. Perfil das ceratites fúngicas no Hospital São Geraldo Belo Horizonte - MG. **Arq Bras Oftalmol.** v.65, n., p.9-13, 2002.
- SALMINEN, L. Systemic Absorption of Topically Applied Ocular Drugs in Humans. **J Ocul Pharmacol.** v.6, n.3, p.243-249, 1990.
- SANGEETHA, S.; VENKATESH, D. N.; ADHIYAMAN, R.; SANTHI, K.; SURESH, B. Formulation of sodium alginate nanospheres containing amphotericin B for the treatment of systemic candidiasis. **Trop J Pharm Res.** v.6, n.1, p.653-659, 2007.
- SARRAF, D. & LEE, D. A. The role of iontophoresis in ocular drug delivery. **J Ocul Pharmacol.** v.10, n.1, p.69-81, 1994.
- SASAKI, H.; YAMAMURA, K.; TEI, C.; NISHIDA, K.; NAKAMURA, J. Ocular permeability of FITC-dextran with absorption promoter for ocular delivery of peptide drug. **J Drug Target.** v.3, n.2, p.129-135, 1995.
- SCHAEFFER, M.L.; BIXLER, D.; YU, P. L. The effectiveness of iontophoresis in reducing cervical hypersensitivity. **J Periodontol.** v.42, n.11, p.695-700, 1971.
- SCHALENBOURG, A.; LEYS, A.; DE COURT; COUTTEEL, C.; HERBORT, C. P. Corticosteroid-induced central serous chorioretinopathy in patients with ocular inflammatory disorders. **Klin Monbl Augenheilkd.** v.219, n.4, p.264-267, 2002.
- SCHEUPLEIN, R.J.; BLANK, I. H.; BRAUNER, G. J.; MACFARLANE, D. J. Percutaneous absorption of steroids. **J Invest Dermatol.** v.52, n.1, p.63-70, 1969.
- SCHIPPER, N.G.; OLSSON, S.; HOOGSTRAATE, J. A.; DEBOER, A. G.; VARUM, K. M.; ARTURSSON, P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. **Pharm Res.** v.14, n.7, p.923-929, 1997.

- SCHOENWALD, R.D. Ocular drug delivery. Pharmacokinetic considerations. **Clin Pharmacokinet.** v.18, n.4, p.255-269, 1990.
- SCHOENWALD, R.D. & WARD, R. L. Relationship Between Steroid Permeability Across Excised Rabbit Cornea and Octanol-Water Partition-Coefficients. **J Pharm Sci.** v.67, n.6, p.786-788, 1978.
- SCHREIBER, W.; OLBRISCH, A.; VORWERK, C. K.; KONIG, W.; BEHRENS-BAUMANN, W. Combined topical fluconazole and corticosteroid treatment for experimental *Candida albicans* keratomycosis. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.44, n.6, p.2634-2643, 2003.
- SHAH, C.P.; MCKEY, J.; SPIRN, M. J.; MAGUIRE, J. Ocular candidiasis: a review. **Br J Ophthalmol.** v.92, n.4, p.466-468, 2008.
- SHARMA, A. Energetics of corneal epithelial cell-ocular mucus-tear film interactions: some surface-chemical pathways of corneal defense. **Biophys Chem.** v.47, n.1, p.87-99, 1993.
- SHUKLA, P.K.; KUMAR, M.; KESHAHA, G. B. Mycotic keratitis: an overview of diagnosis and therapy. **Mycoses.** v.51, n.3, p.183-199, 2008.
- SIEG, J.W. & ROBINSON, J. R. Vehicle effects on ocular drug bioavailability i: evaluation of fluorometholone. **J Pharm Sci.** v.64, n.6, p.931-936, 1975.
- SIMAMORA, P.; NADKARNI, S. R.; LEE, Y. C.; YALKOWSKY, S. H. Controlled delivery of pilocarpine. 2. In-vivo evaluation of Gelfoam (R) device. **Int J Pharm.** v.170, n.2, p.209-214, 1998.
- SIMONETTI, D. D. Obtenção e caracterização de formulações contendo cisplatina para a quimioterapia tópica do câncer de pele: iontoforese versus promotor de absorção. **Dissertação de Mestrado.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, 2004.
- SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **Int J Pharm.** v.278, n.1, p.1-23, 2004.
- SIRIKUL, T.; PRABRIPUTALOONG, T.; SMATHIVAT, A.; CHUCK, R. S.; VONGTHONGSRI, A. Predisposing factors and etiologic diagnosis of ulcerative keratitis. **Cornea.** v.27, n.3, p.283-287, 2008.
- SNIBSON, G.R.; GREAVES, J. L.; SOPER, N. D.; PRYDAL, J. I.; WILSON, C. G.; BRON, A. J. Precorneal residence times of sodium hyaluronate solutions studied by quantitative gamma scintigraphy. **Eye.** v.4 (Pt 4), n., p.594-602, 1990.
- SNIBSON, G.R.; GREAVES, J. L.; SOPER, N. D.; TIFFANY, J. M.; WILSON, C. G.; BRON, A. J. Ocular surface residence times of artificial tear solutions. **Cornea.** v.11, n.4, p.288-293, 1992.
- SOANE, R.J.; HINCHCLIFFE, M.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Clearance characteristics of chitosan based formulations in the sheep nasal cavity. **Int J Pharm.** v.217, n.1-2, p.183-191, 2001.
- SOCHA, M.; SAPIN, A.; DAMGE, C.; MAINCENT, P. Influence of polymers ratio on insulin-loaded nanoparticles based on poly-epsilon-caprolactone and Eudragit (R) RS for oral administration. **Drug Delivery.** v.16, n.8, p.430-436, 2009.
- SODHI, P.K. & MEHTA, D. K. Fluconazole in management of ocular infections due to *Curvularia*. **Ann Ophthalmol.** v.35, n.1, p.68-72, 2003.

- SONEGO-KRONE, S.; SANCHEZ-DI MARTINO, D.; AYALA-LUGO, R.; TORRES-ALVARIZA, G.; TA, C. N.; BARBOSA, L.; DE KASPAR, H. M. Clinical results of topical fluconazole for the treatment of filamentous fungal keratitis. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.** v.244, n.7, p.782-787, 2006.
- SRINIVASAN, M. Fungal keratitis. **Curr Opin Ophthalmol.** v.15, n.4, p.321-327, 2004.
- STAHL, L.; ARNER, P.; UNGERSTEDT, U. Drug distribution studies with microdialysis. III: Extracellular concentration of caffeine in adipose tissue in man. **Life Sci.** v.49, n.24, p.1853-1858, 1991.
- STIEMKE, M.M.; EDELHAUSER, H. F.; GEROSKI, D. H. The Developing Corneal Endothelium - Correlation of Morphology, Hydration and Na/K Atpase Pump Site Density. **Curr Eye Res.** v.10, n.2, p.145-156, 1991.
- SU, C.Y.; LIN, C. P.; WANG, H. Z.; SU, M. Y.; TSAI, R. K.; WU, K. Y.; SHEU, M. M. Intraocular use of fluconazole in the management of ocular fungal infection. **Kaohsiung J Med Sci.** v.15, n.4, p.218-225, 1999.
- TAKACSNOVAK, K.; OELSCHLAGER, H.; BUDVARIBARANY, Z.; SZASZ, G. Partitioning Behavior of Local-Anesthetic Fomocaine Derivatives. **Pharmazie.** v.47, n.8, p.587-592, 1992.
- TALASAZ, A.H.H.; GHAHREMANKHANI, A. A.; MOGHADAM, S. H.; MALEKSHAHI, M. R.; ATYABI, F.; DINARVAND, R. *In situ* gel forming systems of poloxamer 407 and hydroxypropyl cellulose or hydroxypropyl methyl cellulose mixtures for controlled delivery of vancomycin. **J Appl Polym Sci Symp.** v.109, n.4, p.2369-2374, 2008.
- TANURE, M.A.; COHEN, E. J.; SUDESH, S.; RAPUANO, C. J.; LAIBSON, P. R. Spectrum of fungal keratitis at Wills Eye Hospital, Philadelphia, Pennsylvania. **Cornea.** v.19, n.3, p.307-312, 2000.
- TAVEIRA, S.F.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R. F. V. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. **J Control Release.** v.134, n.1, p.35-40, 2009.
- TERRY, J.E. & HILL, R. M. Human tear osmotic pressure: diurnal variations and the closed eye. **Arch Ophthalmol.** v.96, n.1, p.120-122, 1978.
- TEWA-TAGNE, P.; DEGOBERT, G.; BRIANCON, S.; BORDES, C.; GAUVRIT, J. Y.; LANTERI, P.; FESSI, H. Spray-drying nanocapsules in presence of colloidal silica as drying auxiliary agent: Formulation and process variables optimization using experimental designs. **Pharm Res.** v.24, n.4, p.650-661, 2007.
- THEW, M.R.J. & TODD, B. Fungal keratitis in far north Queensland, Australia. **Clin Exp Ophthalmol.** v.36, n.8, p.721-724, 2008.
- THIEL, M.A.; MORLET, N.; SCHULZ, D.; EDELHAUSER, H. F.; DART, J. K.; COSTER, D. J.; WILLIAMS, K. A. A simple corneal perfusion chamber for drug penetration and toxicity studies. **Br J Ophthalmol.** v.85, n.4, p.450-453, 2001.
- THOMAS, P.A. Mycotic keratitis--an underestimated mycosis. **J Med Vet Mycol.** v.32, n.4, p.235-256, 1994.
- THOMAS, P.A. Current perspectives on ophthalmic mycoses. **Clin Microbiol Rev.** v.16, n.4, p.730-797, 2003.
- TIFFANY, J.M. The Viscosity of Human Tears. **Int Ophthalmol.** v.15, n.6, p.371-376, 1991.

- TIYABOONCHAI, W. & LIMPEANCHOB, N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles. **Int J Pharm.** v.329, n.1-2, p.142-149, 2007.
- TOMIDA, H.; YOTSUYANAGI, T.; IKEDA, K. Solubilization of Steroid-Hormones by Polyoxyethylene Lauryl Ether. **Chem Pharm Bull.** v.26, n.9, p.2832-2837, 1978.
- TOMLINSON, A.; KHANAL, S.; RAMAESH, K.; DIAPER, C.; MCFADYEN, A. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.47, n.10, p.4309-4315, 2006.
- TOROPAINEN, E.; RANTA, V. P.; VELLONEN, K. S.; PALMGREN, J.; TALVITIE, A.; LAAVOLA, M.; SUHONEN, P.; HAMALAINEN, K. M.; AURIOLA, S.; URTTI, A. Paracellular and passive transcellular permeability in immortalized human corneal epithelial cell culture model. **Eur J Pharm Sci.** v.20, n.1, p.99-106, 2003.
- TU, E.Y. Alternaria keratitis: clinical presentation and resolution with topical fluconazole or intrastromal voriconazole and topical caspofungin. **Cornea.** v.28, n.1, p.116-119, 2009.
- TUFT, S.J. & TULLO, A. B. Fungal keratitis in the United Kingdom 2003-2005. **Eye.** v.23, n.6, p.1308-1313, 2009.
- TUNICK, M.H. Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. **J Dairy Sci.** v.83, n.8, p.1892-1898, 2000.
- UITTO, O.D. & WHITE, H. S. Electroosmotic pore transport in human skin. **Pharm Res.** v.20, n.4, p.646-652, 2003.
- UPADHYAY, M.P.; KARMACHARYA, P. C.; KOIRALA, S.; TULADHAR, N. R.; BRYAN, L. E.; SMOLIN, G.; WHITCHER, J. P. Epidemiologic characteristics, predisposing factors, and etiologic diagnosis of corneal ulceration in Nepal. **Am J Ophthalmol.** v.111, n.1, p.92-99, 1991.
- URTTI, A. Delivery of antiglaucoma drugs: ocular vs systemic absorption. **J Ocul Pharmacol.** v.10, n.1, p.349-357, 1994.
- URTTI, A. & SALMINEN, L. Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs. **Surv Ophthalmol.** v.37, n.6, p.435-456, 1993.
- VADNERE, M.; AMIDON, G.; LINDENBAUM, S.; HASLAM, J. L. Thermodynamic Studies on the Gel Sol Transition of Some Pluronic Polyols. **Int J Pharm.** v.22, n.2-3, p.207-218, 1984.
- VAKA, S.R.K.; SAMMETA, S. M.; DAY, L. B.; MURTHY, S. N. Transcorneal iontophoresis for delivery of ciprofloxacin hydrochloride. **Curr Eye Res.** v.33, n.8, p.661-667, 2008.
- VAN HAERINGEN, N.J. Clinical biochemistry of tears. **Surv Ophthalmol.** v.26, n.2, p.84-96, 1981.
- VANDAMME, T.F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Prog Retin Eye Res.** v.21, n.1, p.15-34, 2002.
- VARDE, N.K. & PACK, D. W. Microspheres for controlled release drug delivery. **Expert Opin Biol Ther.** v.4, n.1, p.35-51, 2004.
- VERBEECK, R.K. Blood microdialysis in pharmacokinetic and drug metabolism studies. **Adv Drug Deliv Rev.** v.45, n.2-3, p.217-228, 2000.
- VERMA, P.R. & IYER, S. S. Transdermal delivery of propranolol using mixed grades of Eudragit: design and *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Drug Dev Ind Pharm.** v.26, n.4, p.471-476, 2000.

- VINARDELL, M.P. & MITJANS, M. The chorioallantoic membrane test as a model to predict the potential human eye irritation induced by commonly used laboratory solvents. **Toxicol In vitro**. v.20, n.6, p.1066-1070, 2006.
- VOIGT, M.; DE KOZAK, Y.; HALHAL, M.; COURTOIS, Y.; BEHAR-COHEN, F. Down-regulation of NOSII gene expression by iontophoresis of anti-sense oligonucleotide in endotoxin-induced uveitis. **Biochem Biophys Res Commun**. v.295, n.2, p.336-341, 2002.
- WAGA, J. & EHINGER, B. Passage of drugs through different intraocular microdialysis membranes. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**. v.233, n.1, p.31-37, 1995.
- WANG, L.Y.; SUN, S. T.; JING, Y.; HAN, L.; ZHANG, H. M.; YUE, J. Spectrum of fungal keratitis in central China. **Clin Exp Ophthalmol**. v.37, n.8, p.763-771, 2009a.
- WANG, Y.X.; TAN, Y. B.; HUANG, X. L.; CHE, Y. J.; DU, X. Synthesis of Biodegradable Amphiphilic Thermo-Responsive Multiblock Polycarbonate and Its Self-Aggregation Behavior in Aqueous Solution. **J Appl Polym Sci Symp**. v.112, n.3, p.1425-1435, 2009b.
- WATSKY, M.A. Loss of fenamate-activated K⁺ current from epithelial cells during corneal wound healing. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v.40, n.7, p.1356-1363, 1999.
- WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **J Biophys Biochem Cytol**. v.4, n.4, p.475-478, 1958.
- WEI, G.; DING, P. T.; ZHENG, J. M.; LU, W. Y. Pharmacokinetics of timolol in aqueous humor sampled by microdialysis after topical administration of thermosetting gels. **Biomed Chromatogr**. v.20, n.1, p.67-71, 2006.
- WEI, G.; XU, H.; DING, P. T.; LI, S. M.; ZHENG, J. M. Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies. **J Control Release**. v.83, n.1, p.65-74, 2002.
- WHITE, K.M.; BENJAMIN, W. J.; HILL, R. M. Human Basic Tear Fluid Osmolality .1. Importance of Sample Collection Strategy. **Acta Ophthalmologica**. v.71, n.4, p.524-529, 1993a.
- WHITE, K.M.; BENJAMIN, W. J.; HILL, R. M. Human Basic Tear Fluid Osmolality .2. Importance of Processing Strategy. **Acta Ophthalmologica**. v.71, n.4, p.530-538, 1993b.
- WOOLFSON, A.D.; MCCAFFERTY, D. F.; GORMAN, S. P.; MCCARRON, P. A.; PRICE, J. H. Design of An Apparatus Incorporating A Linear Variable Differential Transformer for the Measurement of Type-Iii Bioadhesion to Cervical Tissue. **Int J Pharm**. v.84, n.1, p.69-76, 1992.
- WU, N.C.; CHIANG, C. H.; LEE, A. R. Studies of Carbonic-Anhydrase Inhibitors - Physicochemical Properties and Bioactivities of New Thiadiazole Derivatives. **J Ocul Pharmacol**. v.9, n.2, p.97-108, 1993.
- XIE, L.X.; ZHONG, W. X.; SHI, W. Y.; SUN, S. Y. Spectrum of fungal keratitis in north China. **Ophthalmology**. v.113, n.11, p.1943-1948, 2006.
- YAMAGUCHI, M.; UEDA, K.; ISOWAKI, A.; OHTORI, A.; TAKEUCHI, H.; OHGURO, N.; TOJO, K. Mucoadhesive Properties of Chitosan-Coated Ophthalmic Lipid Emulsion Containing Indomethacin in Tear Fluid. **Bio Pharm Bull**. v.32, n.7, p.1266-1271, 2009.
- YANG, H.; WANG, Q.; ELMQUIST, W. F. The design and validation of a novel intravenous microdialysis probe: Application to fluconazole pharmacokinetics in the freely-moving rat model. **Pharm Res**. v.14, n.10, p.1455-1460, 1997.

- YASUKAWA, T.; OGURA, Y.; TABATA, Y.; KIMURA, H.; WIEDEMANN, P.; HONDA, Y. Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. **Prog Retin Eye Res.** v.23, n.3, p.253-281, 2004.
- YEE, R.W.; CHENG, C. J.; MEENAKSHI, S.; LUDDEN, T. M.; WALLACE, J. E.; RINALDI, M. G. Ocular penetration and pharmacokinetics of topical fluconazole. **Cornea.** v.16, n.1, p.64-71, 1997.
- YILMAZ, S. & MADEN, A. Severe fungal keratitis treated with subconjunctival fluconazole. **Am J Ophthalmol.** v.140, n.3, p.454-458, 2005.
- YIN, H.B.; GONG, C. Y.; SHI, S. A.; LIU, X. Y.; WEI, Y. Q.; QIAN, Z. Y. Toxicity Evaluation of Biodegradable and Thermosensitive PEG-PCL-PEG Hydrogel as a Potential *In situ* Sustained Ophthalmic Drug Delivery System. **J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.** v.92B, n.1, p.129-137, 2010.
- YOO, S.H.; DURSUN, D.; DUBOVY, S.; MILLER, D.; ALFONSO, E.; FORSTER, R. K.; BEHAR-COHEN, F.; PAREL, J. M. Iontophoresis for the treatment of paecilomyces keratitis. **Cornea.** v.21, n.1, p.131-132, 2002.
- ZAMBITO, Y.; UCCELLO-BARRETTA, G.; ZAINO, C.; BALZANO, F.; DI COLO, G. Novel transmucosal absorption enhancers obtained by aminoalkylation of chitosan. **Eur J Pharm Sci.** v.29, n.5, p.460-469, 2006.
- ZENG, Y.J.; YANG, J.; HUANG, K.; LEE, Z. H.; LEE, X. Y. A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. **J Biomech.** v.34, n.4, p.533-537, 2001.
- ZHOU, Q. & GALLO, J. M. *In vivo* microdialysis for PK and PD studies of anticancer drugs. **AAPS J.** v.7, n.3, p.E659-E667, 2005.
- ZIMMER, A. & KREUTER, J. Microspheres and Nanoparticles Used in Ocular Delivery Systems. **Adv Drug Del Rev.** v.16, n.1, p.61-73, 1995.

ANEXO 1. Aprovação da Comissão de Ética para o uso de animais nos experimentos *in vivo* de permeação ocular.

ANEXO 2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa para os experimentos de cintilografia realizados com voluntários humanos.