

Ana Isabel Prata de Figueiredo

ESTUDO COMPARATIVO DOS PERFIS DE LIBERTAÇÃO DE IMPLANTES OFTALMOLÓGICOS DE DEXAMETASONA

Dissertação de Mestrado em Tecnologias do Medicamento, orientada pela Professora Doutora Maria Eugénia Pina e pela Doutora Patrícia Coimbra e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou excluí.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.

Ricardo Reis, in “Odes”

AGRADECIMENTOS

A realização do presente trabalho não teria sido possível sem o apoio, orientação, acompanhamento e incentivo de diversas pessoas, a quem quero expressar o meu sincero agradecimento.

À Professora Doutora Maria Helena Gil pela oportunidade que me foi dada em realizar e desenvolver toda a minha atividade experimental no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

À Professora Doutora Maria Eugénia Tavares de Pina, na qualidade de orientadora, pela disponibilidade e apoio com que acompanhou este trabalho.

À Doutora Patrícia Coimbra que foi o “rosto” que me acolheu no Departamento de Engenharia Química, e que na qualidade de orientadora, orientou este trabalho de forma muito especial. Expresso a minha gratidão pela disponibilidade, incentivo e revisão cuidada e crítica da presente dissertação. Sem a sua preciosa ajuda, este trabalho não teria sido possível.

Ao André por me ajudar em tudo e por estar sempre ao meu lado.

À minha Família pelo incentivo, pela confiança, pelos valores transmitidos e pelo exemplo de vida.

RESUMO

As doenças oculares do segmento posterior do olho são a causa mais comum dos distúrbios visuais nos países industrializados (1). Este cenário estimula o desenvolvimento de novas modalidades de tratamento para estas doenças (2).

O presente trabalho teve como objetivo criar um implante oftalmológico biodegradável de dexametasona para o tratamento de doenças do segmento posterior do olho. Trata-se de uma alternativa terapêutica na corticosterapia, que ainda não existe no mercado, e que poderá substituir as administrações de corticosteróides pelas vias intraocular e tópica. Para esta classe de fármacos, estas vias são as únicas disponíveis a todos os doentes que padecem deste tipo de patologias. Neste sentido, o doente que recorrer ao implante oftalmológico biodegradável irá ser submetido a uma cirurgia de ambulatório, para colocar o implante na cavidade vítrea que libertará o fármaco (dexametasona) durante no máximo 2 anos. Decorrido este tempo, o implante degradar-se-á pois é composto por polímeros biodegradáveis.

Durante este trabalho foi realizado um estudo comparativo dos perfis de libertação *in vitro* de implantes oftalmológicos de dexametasona, preparados por três metodologias diferentes: *melting*, *solvent casting* e *electrospinning*. Nos três métodos investigou-se o efeito de quatro variáveis nos perfis de libertação do fármaco:

- Tipo de polímero biodegradável utilizado poli(ϵ -caprolactona) e poli(ácido láctico);
- Razão mássica fármaco/polímero (3%, 10% e 25%);
- Peso molecular da poli(ϵ -caprolactona) (37 kDa e 14 kDa);
- Forma do fármaco (dexametasona e fosfato de dexametasona dissódico).

Foram concebidos vinte e dois tipos diferentes de implantes oftalmológicos de dexametasona, os quais foram submetidos a ensaios de libertação durante 2 meses.

No final, e depois de se compararem os resultados dos ensaios de libertação, concluiu-se que o/os implantes que exibem o potencial para libertar a dexametasona de forma controlada, por um maior período de tempo foi/foram os obtidos com:

- O método de *solvent casting*;
- O polímero PLA 120 kDa;
- O fármaco sob a forma de dexametasona;
- A razão mássica fármaco/polímero de 10%.

ABSTRACT

Eye diseases of the posterior segment of the eye are the most common cause of visual disorders in industrialized countries (1). This scenario encourages the development of new treatment modalities for these diseases (2).

The aim of the present thesis was to create a biodegradable ophthalmologic implant of dexamethasone for the treatment of diseases of the posterior segment of the eye. It is an alternative treatment with corticosteroids, which does not exist yet in the market, and could replace the administrations of corticosteroids for topical and intraocular routes. For this class of drugs, these are the only routes available to all patients suffering from such diseases. Accordingly, patients that use the biodegradable implant will be subjected to an ambulatory surgery to place the implant in the vitreous cavity to release the drug (dexamethasone) for up to 2 years. After this time the implant will degrade because it is composed of biodegradable polymers.

In this paper was made a comparative study of the *in vitro* release profiles of dexamethasone ophthalmic implants prepared by three different methods: melting, solvent casting and electrospinning. In all three methods were investigated the effect of four variables in the drug release profiles:

- Type of the biodegradable polymer used – poly (ϵ -caprolactone) and poly (lactic acid);
- The weight ratio drug / polymer (3%, 10% and 25%);
- Molecular weight of the poly (ϵ -caprolactone) (37 kDa and 14 kDa);
- Form of the drug (dexamethasone disodium phosphate and dexamethasone).

It was designed twenty two different types of dexamethasone ophthalmic implants, which were tested for release during 2 months.

Finally, and after comparing the results of the release tests, it was concluded that / those implants that exhibit the potential to release dexamethasone in a controlled manner for a longer period of time was / were obtained with:

- The method of solvent casting;
- The polymer PLA 120 kDa;
- The drug in the form of dexamethasone;
- And the weight ratio drug / polymer of 10%.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE GERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
2.1. Corticosteróides.....	3
2.2. Uso de Corticosteróides em Oftalmologia	6
2.3. Efeitos Secundários dos Corticosteróides no Olho	7
2.4. O Olho.....	9
2.4.1. Anatomia do olho e a importância das barreiras oculares.....	9
2.4.2. Modos de administração de fármacos no olho.....	11
2.5. Sistemas Poliméricos.....	14
2.5.1. Principais polímeros biodegradáveis utilizados nos implantes intraoculares.....	16
2.5.1.1. Poliácido láctico (PLA) e poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)	17
2.5.1.2. Poli(ε-caprolactona) (PCL).....	17
2.5.1.3. Polianidridos	18
2.5.2. Implantes intraoculares preparados com polímeros biodegradáveis	19
2.6. Fatores que devem ser considerados na Formulação de Implantes Biodegradáveis para Liberação de Fármacos.....	20
3. OBJETIVOS DO ESTUDO	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Materiais.....	23
4.2. Equipamentos.....	23
4.3. Métodos	24
4.3.1. Método de <i>melting</i>	24
4.3.1.1. Descrição e considerações.....	24

4.3.1.2.	Protocolo experimental.....	24
4.3.2.	Método de <i>solvent casting</i>	25
4.3.2.1.	Descrição e considerações.....	25
4.3.2.2.	Protocolo experimental.....	25
4.3.3.	Método de <i>electrospinning</i>	26
4.3.3.1.	Descrição e considerações.....	26
4.3.3.2.	Protocolo experimental.....	28
4.3.4.	Ensaio de libertação <i>in vitro</i>	30
4.3.4.1.	Descrição e considerações.....	30
4.3.4.2.	Protocolo experimental.....	30
4.3.5.	Extração do fármaco remanescente nos implantes.....	31
4.3.5.1.	Descrição e considerações.....	31
4.3.5.2.	Protocolo experimental para o fosfato de dexametasona dissódico.....	31
4.3.5.3.	Protocolo experimental para a dexametasona.....	31
4.3.6.	Caraterização térmica dos materiais e implantes.....	32
4.3.6.1.	Descrição e considerações.....	32
4.3.6.2.	Protocolo experimental.....	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1.	Ensaio de Libertação <i>in vitro</i>	33
5.1.1.	Determinação da Percentagem de Fármaco Libertado após 2 meses.....	33
5.1.2.	Determinação da Massa Teórica de Fármaco no dispositivo (<i>Theoretical Drug Loading</i> – TDL).....	33
5.1.3.	Determinação da Massa Real de Fármaco no dispositivo (<i>Experimental Drug Loading</i> – EDL).....	34
5.2.	Determinação da Eficiência de Encapsulamento do Fármaco (EE).....	34
5.3.	Extração do fármaco remanescente.....	34
5.4.	Resultados dos Ensaio de Libertação <i>in vitro</i> da Dexamatasona.....	36
5.5.	Resultados dos Ensaio de Libertação <i>in vitro</i> do Fosfato de Dexamatasona Dissódico.....	40
5.6.	Caraterização térmica dos materiais e implantes.....	43
6.	CONCLUSÕES.....	48
7.	PERSPETIVAS FUTURAS.....	50
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia do olho.....	9
Figura 2 - Anatomia do olho.....	9
Figura 3 - Anatomia do olho.....	10
Figura 4 - Anatomia e vias de administração de fármacos no olho	11
Figura 5 - Políácido láctico (PLA).....	17
Figura 6 - Poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA).....	17
Figura 7 - Poli(ϵ -caprolactona).....	18
Figura 8 - Os dispositivos intravítreos são implantados na <i>pars plana</i> , e gradualmente libertam doses eficazes de fármaco na cavidade vítrea com a degradação do polímero.....	19
Figura 9 - Filme obtido pelo método de <i>solvent casting</i> após o corte de algumas peças.....	25
Figura 10 - Equipamento para o método de <i>electrospinnig</i>	26
Figura 11 - Resultado do método de <i>electrospinning</i> com o PCL 14 kDa.....	27
Figura 12 - Filme polimérico biodegradável obtido por <i>electrospinning</i>	27
Figura 13 - Filme polimérico biodegradável obtido por <i>electrospinnig</i> antes do corte.....	27
Figura 14 - Termograma do PLA 120 kDa	43
Figura 15 - Termograma do PCL 37 kDa.....	43
Figura 16 - Termograma da dexametasona	44
Figura 17 - Termograma do fosfato de dexametasona dissódico	44
Figura 18 - Termograma do implante de dexametasona com PCL 37 kDa e 25% F/P obtido por <i>solvent casting</i>	45
Figura 19 - Termograma do implante de dexametasona com PCL 37 kDa e 25% F/P obtido por <i>melting</i>	46
Figura 20 - Termograma do implante de fosfato de dexametasona dissódico com PCL 37 kDa e 25% F/P obtido por <i>solvent casting</i>	46
Figura 21 - Termograma do implante de fosfato de dexametasona dissódico com PCL 37 kDa e 25% F/P obtido por <i>melting</i>	47

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Valores de TDL e EDL nos dispositivos de dexametasona.....	36
Gráfico 2 - Ensaio de libertação <i>in vitro</i> da dexametasona.....	37
Gráfico 3 - Valores de TDL e EDL nos dispositivos de fosfato de dexametasona dissódico.	40
Gráfico 4 - Ensaio de libertação <i>in vitro</i> do fosfato de dexametasona dissódico	41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos adversos do tratamento com esteroides	5
Tabela 2 - Potência anti-inflamatória relativa de corticosteróides	8
Tabela 3 - Sumário das vias de administração, benefícios e desafios na cavidade ocular	12
Tabela 4 - Tipos de dispositivos poliméricos	14
Tabela 5 - Mistura dos reagentes.....	28
Tabela 6 - Parâmetros do equipamento de <i>electrospinning</i>	28
Tabela 7 - Representação esquemática dos polímeros, fármacos, razões mássicas fármaco/polímero (F/P) e respectivas quantidades usadas em cada metodologia.....	29
Tabela 8 - Correspondência da designação dos implantes de dexametasona ao método, polímero e F/P utilizados.	36
Tabela 9 - Correspondência da designação dos implantes de fosfato de dexametasona dissódico ao método, polímero e F/P utilizados.	40

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH – Corticotropina
- AS – Ácido sebácico
- DSC – *Differential Scanning Calorimetry*
- EDL – *Experimental Drug Loading*
- EE – Eficiência de encapsulação
- EVA – Acetato de etilvinil
- F/P – Razão mássica fármaco/polímero
- HPA – Hipotalâmico-hipófisário-adrenal
- IV – Intravenosa
- PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato salino)
- PCL – Poli(ϵ -caprolactona)
- PCPP – 1,3-bis (carboxifenoxipropano)
- Pf – Ponto de fusão
- PGA – Políácido glicólico
- PIO – Pressão intraocular
- PLA – Políácido láctico
- PLGA – Poli(ácido láctico-co-glicólico)
- SLFs – Sistemas de Libertação de Fármacos
- TDL – *Theoretical Drug Loading*

I. INTRODUÇÃO

As doenças oculares do segmento posterior do olho são a causa mais comum dos distúrbios visuais nos países industrializados. Estas doenças incluem, por exemplo, as cataratas, retinite pigmentosa (1), a retinopatia diabética e a degeneração macular associada ao envelhecimento (3).

Em todo o mundo as deficiências visuais afetam mais de 160 milhões de pessoas, das quais 37 milhões estão cegas (4). Este cenário estimula o desenvolvimento de novas modalidades de tratamento para estas doenças (2).

O mercado dos fármacos para aplicação oftalmológica é dominado pelos fármacos que foram concebidos para tratar doenças que afetam o segmento anterior do olho. Estes fármacos incluem os antibióticos, os anti-inflamatórios ou fármacos para o tratamento do glaucoma, geralmente sob a forma de colírios. Estas aplicações tópicas são ineficazes em muitos casos, principalmente devido ao sistema de drenagem do olho, causando uma pobre biodisponibilidade ocular (1).

O sucesso no tratamento visa, essencialmente, o transporte de doses efetivas de fármacos diretamente para os locais a serem tratados. Devido às dificuldades encontradas no transporte dos fármacos para o segmento posterior do olho, pesquisas têm sido realizadas no sentido de desenvolver sistemas de administração intraoculares que permitam libertar concentrações de fármacos suficientes por períodos prolongados (2).

A intervenção farmacêutica no tratamento de doenças que afetam os tecidos do segmento posterior do olho requer injeções intravítreas repetidas, dado que a concentração terapêutica não é alcançada através das vias de administração convencionais.

As injeções intravítreas repetidas, no entanto têm inúmeras desvantagens: (i) o desconforto (5) e adesão à terapêutica por parte do doente, (ii) o risco acumulado de complicações graves tais como endoftalmites, ruturas e descolamentos da retina e hemorragias, (iii) cataratas, (iv) picos plasmáticos dos níveis de fármaco, (v) risco toxicológico para os tecidos oculares quando os níveis terapêuticos e tóxicos são próximos.

Os implantes intraoculares biodegradáveis superam a maior parte destas desvantagens, uma vez que eles mantêm estáveis as concentrações do fármaco dentro da janela terapêutica ao longo do tempo.

Sistemas biodegradáveis de dexametasona têm sido desenvolvidos para a prevenção da inflamação após cirurgia às cataratas. Posurdex (Allergan), um implante polimérico

biodegradável preparado com PLGA liberta dexametasona ao longo de aproximadamente cinco semanas, e nos ensaios clínicos tem sido estudada a sua utilidade no edema macular persistente associado ao diabetes, nas oclusões venosas na retina, nas uveítes, e para o pós-operatório das cataratas (6).

A pesquisa de sistemas de libertação de fármacos implantáveis começou no final de 1930 com R. Deansby e A.S. Parks. Em 1937, na *Royal Society of Medicine* em Londres, Parks e Dansby apresentaram um artigo que descrevia os efeitos de várias preparações de hormonas sobre o crescimento do gado. Aparentemente, eles desenvolveram comprimidos de estrogénio puro e administraram, por via subcutânea, aos animais. Os resultados mostraram uma libertação contínua da hormona ao longo de três meses em vários animais. A ideia de implante hormonal em animais tornou-se prática corrente na década de 1950, e tem vindo a mostrar-se efetiva no crescimento e eficiência alimentar dos bovinos. Esta descoberta suscitou interesse na área dos implantes, levando a novos estudos e descobertas que têm continuado até aos dias de hoje (7).

Diferentes sistemas de transporte de fármacos têm sido desenvolvidos com as finalidades acima descritas. Estes sistemas podem ser compostos por polímeros biodegradáveis ou não-biodegradáveis ou ainda serem formulações lipídicas (2).

As principais vantagens dos implantes biodegradáveis incluem o facto de os polímeros inertes, usados para o fabrico do sistema de libertação, serem eventualmente absorvidos ou excretados pelo organismo. Neste sentido, a remoção cirúrgica do implante após a conclusão da terapia não é necessária, aumentando assim a aceitação e adesão do doente (7).

A presente dissertação está dividida em sete capítulos.

O capítulo 1 contextualiza e apresenta o trabalho experimental.

No capítulo 2 encontram-se os fundamentos teóricos que serviram de suporte teórico ao trabalho experimental.

No capítulo 3 são apresentados os objetivos do estudo.

O capítulo 4 é dedicado à apresentação dos equipamentos e materiais utilizados nas diversas metodologias. São ainda descritos pormenorizadamente os protocolos e as considerações dos mesmos.

O capítulo 5 contém a discussão e apresentação dos resultados apoiados por diversos gráficos e diagramas.

O capítulo 6 é dedicado às conclusões do trabalho e o capítulo 7 à indicação das perspetivas de trabalho que poderão vir a realizar-se no futuro.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Corticosteróides

Os corticosteróides são hormonas de natureza esteroíde produzidas na porção cortical das glândulas adrenais, e constituem três famílias: os glicocorticóides, os mineralocorticóides e os androgénios adrenais. O principal glicocorticóide é o cortisol (ou hidrocortisona), cuja taxa de secreção no homem é de 10 a 20 mg em 24 horas. A sua concentração média no plasma é de 14 mg/dl, no entanto os seus níveis variam durante o dia, atingindo valores mais elevados nas primeiras horas da manhã (15 a 25 mg/dl) e diminuindo gradualmente para 2 a 5 mg/dl no final do dia.

O excesso dos glicocorticóides (exógeno ou endógeno) suprime a resposta imunológica normal, sendo esta propriedade imunossupressora a que melhor caracteriza as suas indicações terapêuticas para o tratamento de processos inflamatórios, doenças autoimunes e para a viabilização de transplantes.

Os corticosteróides foram introduzidos na prática médica em 1949 para o tratamento da artrite reumatóide. As suas indicações, desde então, ampliaram-se pelas diversas especialidades médicas, incluindo a dermatologia, a endocrinologia, a oncologia e a oftalmologia. São agentes que simulam os esteróides hormonais endógenos produzidos no córtex adrenal: o cortisol (glicocorticóide) e a aldosterona (mineralocorticóide).

Os glicocorticóides são regulados primariamente pela corticotropina (ACTH), enquanto que os mineralocorticóides são regulados pelo sistema renina-angiotensina e possuem propriedades de retenção de sal.

O efeito anti-inflamatório e imunossupressor dos glicocorticóides ocorre devido às seguintes propriedades:

1. Interferem na circulação das células imunes, diminuem o número de linfócitos periféricos, principalmente linfócitos T e inibem a acumulação de neutrófilos no local da inflamação;
2. Promovem a apoptose das células linfóides;
3. Inibem a síntese de citocinas;
4. Modulam direta e indiretamente a função das células B;

5. Inibem a resposta proliferativa dos monócitos ao fator de estimulação de colónias e a sua diferenciação em macrófagos, inibindo também as suas funções citotóxicas e de fagocitose;
6. Inibem o movimento de células e fluídos a partir do compartimento intravascular;
7. Inibem a ação da histamina, a síntese das prostaglandinas e a ação dos ativadores de plasminogénio.

Infelizmente, doentes medicados com corticosteróides podem apresentar efeitos colaterais indesejáveis, especialmente quando doses altas e tratamentos prolongados são requeridos (Tabela I).

De forma a minimizar os efeitos adversos, deve-se ter especial cuidado com:

1. Doentes com hipertensão arterial ou insuficiência cardíaca congestiva devem ser monitorizados, sendo aconselhável a diminuição da ingestão de sal e o suplemento oral com potássio;
2. Doentes com risco de osteoporose devem tomar suplementos de cálcio, especialmente as mulheres na pós-menopausa;
3. Doentes com doenças graves do aparelho digestivo, uma vez que a perfuração e hemorragia gastrointestinal são efeitos colaterais graves e mais suscetíveis em doentes com histórico de doenças do foro gastrointestinal.

O seu uso é contra-indicado em doentes com infeção fúngica sistémica, e deve-se evitar o uso de vacinas com vírus vivos durante o tratamento.

Um tempo curto de tratamento ou o uso de doses relativamente baixas de medicação raramente resultam em qualquer um dos efeitos colaterais listados na Tabela I. Contudo, quando a dose utilizada de corticosteróide aumenta ou se prolonga a sua utilização, os riscos de efeitos indesejáveis aumentam consideravelmente. Em tratamentos prolongados, a administração da medicação em dias alternados é válida, sendo também importante a aplicação da dose no período da manhã, mimetizando o ritmo circadiano do corticosteróide endógeno.

No final de um tratamento superior a dois meses, deve-se propor uma descontinuação gradual da medicação, para dessa maneira, promover uma recuperação normal do eixo hipotalâmico-hipófisário-adrenal (HPA) (8 e 9).

Tabela I - Efeitos adversos do tratamento com esteróides (8).

Sistemas	Efeitos Adversos
Distúrbios eletrolíticos	<ul style="list-style-type: none"> • Retenção de sódio e edema; • Excreção aumentada de potássio; • Excreção aumentada de cálcio.
Gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none"> • Náuseas e vômitos; • Úlcera péptica; • Esofagite, pancreatite.
Endócrino	<ul style="list-style-type: none"> • Hipercortisolismo (Síndrome de <i>Cushing</i>); • Insuficiência adrenal secundária; • Amenorreia e Intolerância à glicose.
Cardiovascular	<ul style="list-style-type: none"> • Hipertensão arterial; • Tromboembolismo; • Flebites.
Ocular	<ul style="list-style-type: none"> • Cataratas subcapsulares posteriores; • Glaucoma; • Infecções oculares oportunistas (viral ou fúngica).
Músculo e Esquelético	<ul style="list-style-type: none"> • Fraqueza muscular proximal; • Fraturas ósseas; • Necrose asséptica da cabeça do fêmur.
Neurológico e Psiquiátrico	<ul style="list-style-type: none"> • Cefaleia e tontura; • Insônia e mudanças do humor; • Psicose.
Dermatológico	<ul style="list-style-type: none"> • Acne; • Hirsurtismo; • Equimoses.
Outros	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da suscetibilidade a infecções; • Ocultação de sintomas de infecções.

2.2. Uso de Corticosteróides em Oftalmologia

O uso de corticosteróides para o tratamento de afeções oculares remonta aos anos cinquenta. Na última década, os esteróides intravítreos têm sido cada vez mais utilizados no tratamento de doenças não-inflamatórias do segmento posterior do olho, as quais incluem edema macular, degeneração macular relacionada com a idade e retinopatia diabética proliferativa.

Os corticosteróides têm demonstrado estabilizar a barreira do sangue da retina, mas os mecanismos exatos ainda permanecem desconhecidos.

Na última década, as injeções intravítreas de corticosteróides surgiram como sendo um tratamento cada vez mais utilizado em certos doentes com edema macular, apesar da inexistência de estudos randomizados e controlados que comprovem a sua segurança e eficácia.

Os corticosteróides para uso intravítreo foram inicialmente considerados após estudos em animais, que mostraram que o fosfato de dexametasona quando injetado na cavidade vítrea não é tóxico para a retina. Pouco depois destes estudos em animais, os primeiros relatórios publicados sobre injeções de corticosteróides para uso intravítreo no homem indicavam que estas eram utilizadas para o tratamento de edema macular diabético, edema macular secundário e oclusão da veia central da retina.

Antes da introdução dos corticosteróides na cavidade vítrea, eram necessárias usar doses elevadas de corticosteróides sistêmicos no tratamento do edema macular, principalmente para o edema macular cistóide inflamatório. Infelizmente os esteróides orais podem causar vários efeitos secundários sistêmicos, incluindo osteoporose, síndrome de *Cushing*, supressão adrenal e exacerbação dos diabetes.

A administração intravítrea de corticosteróides permitiu que muitas doenças do segmento posterior fossem tratadas localmente, sem os efeitos adversos causados pela administração sistémica.

A administração intravítrea também permite aos esteróides contornar a barreira de sangue da retina, atingindo-se concentrações maiores de esteróides durante um período de tempo prolongado.

A administração de esteróides na cavidade vítrea é efetuada através de injeção direta na *pars plana*, através da introdução de implantes de libertação prolongada ou por injeção de compostos conjugados. No entanto, o método de entrega mais comum é a injeção direta de corticosteróides sintéticos na *pars plana* (10).

2.3. Efeitos Secundários dos Corticosteróides no Olho

Existem vários efeitos secundários potencialmente graves que podem resultar do uso de corticosteróides nos olhos. O primeiro destes efeitos é o potencial desenvolvimento de catarata subcapsular posterior. O crescimento irreversível destas cataratas está diretamente relacionado com a dose e duração do tratamento. Na maioria dos casos a sua ocorrência está relacionada com um tratamento prolongado de seis meses ou mais, com os fármacos mais potentes (Tabela 2). A catarata subcapsular posterior, devido à sua localização central, pode ser visualmente debilitante e exigir a remoção cirúrgica.

Em segundo lugar, a corticoterapia tópica pode causar um aumento da PIO (pressão intraocular). Em cerca de 8% dos doentes, a PIO elevada aparece geralmente três a seis semanas após o início do tratamento. O aumento da PIO ocorre mais frequentemente com o uso de fármacos mais potentes, tais como a dexametasona, e mais frequentemente em doentes com pré-existência de glaucoma.

O aumento da PIO pode também surgir como resultado da administração sistémica desta classe de fármacos, e é resultado da diminuição do escoamento do humor aquoso no olho. Normalmente este aumento é reversível, retornando aos limites normais dentro de uma a três semanas após a descontinuação. No entanto, se a PIO permanecer elevada pode ter ocorrido lesão do nervo ótico e correspondente perda de campo visual, sendo que esta condição é denominada por "glaucoma esteróide". Os doentes em tratamento com corticosteróides devem ter a sua PIO monitorada de forma a prevenir este tipo de lesões.

Cada esteróide, como a prednisolona ou a dexametasona, pode estar disponível em mais do que uma forma; por exemplo, a dexametasona está disponível sob a forma de álcool ou fosfato. Estas formas são denominadas derivados. O derivado de um corticosteróide tem um papel importante no seu efeito global.

As formulações de misturas de derivados de dexametasona formam suspensões, enquanto que as preparações só com fosfato permanecem soluções verdadeiras. Estas últimas têm menos eficácia terapêutica.

A escolha de qual o derivado a utilizar numa formulação deve ter em conta o custo/benefício, a segurança e a eficácia dos corticosteróides disponíveis em relação à condição do doente e à necessidade de tratamento (11).

Tabela 2 - Potência anti-inflamatória relativa de corticosteróides (11).

Fármaco	Potência Relativa
Betametasona	25
Dexametasona	25
Metilprednisona	5
Triamcinolona	5
Prednisona	4
Prednisolona	4
Hidrocortisona	1

2.4. O Olho

2.4.1. Anatomia do olho e a importância das barreiras oculares

A administração de fármacos oftálmicos é uma das áreas mais interessantes da investigação na área das ciências farmacêuticas.

A anatomia e a fisiologia únicas do olho dificultam o alcance da concentração terapêutica no local alvo. O desafio é contornar as barreiras de proteção do olho, sem causar dano significativo no tecido e sem aumentar o risco de efeitos secundários sistêmicos (12).

O olho é anatomicamente dividido por dois segmentos, anterior e posterior. O primeiro inclui a córnea, a câmara anterior, a íris, a câmara posterior, o corpo ciliar e o cristalino. O segundo é composto pelo vítreo, retina, epitélio pigmentado da retina e o coróide (Figuras 1, 2 e 3) (13).

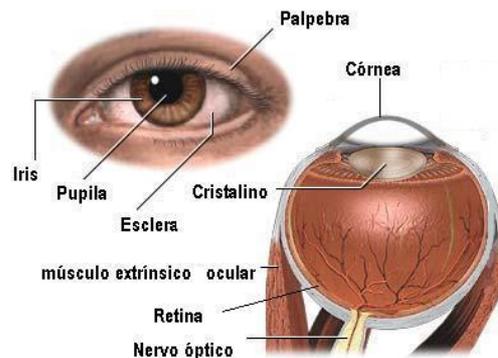


Figura 1 - Anatomia do olho.

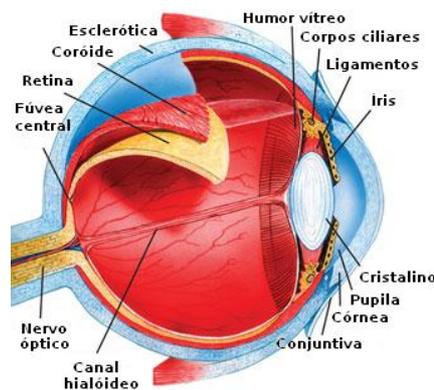


Figura 2 - Anatomia do olho.

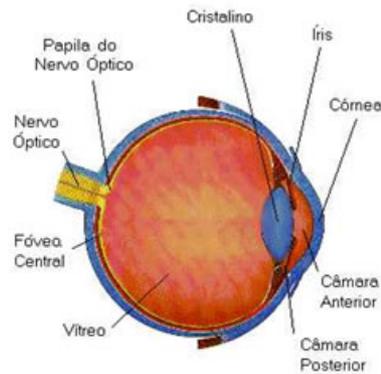


Figura 3 - Anatomia do olho.

As barreiras suscetíveis de afetar a farmacocinética dos fármacos administrados nos tecidos oculares são, os tecidos estromais da córnea e da esclera, o epitélio corneano e o endotélio, as barreiras hemato-retinais interna e externa que são formadas pelo epitélio pigmentado da retina e pelo endotélio vascular da retina respectivamente, e a membrana interna limitante na interface vitreoretinal (13).

Em comparação com a administração de fármacos noutras partes do corpo, a administração de fármacos na cavidade ocular é dificultada pela existência de diversas barreiras oculares. Muitas destas barreiras são exclusivas da anatomia e fisiologia do olho. Estas barreiras anômicas e fisiológicas são também específicas, dependendo da via de administração, e servem para proteger o olho de substâncias tóxicas (14).

Os colírios e as pomadas são formas terapêuticas simples para o tratamento das doenças oculares, no entanto a absorção do fármaco é limitada devido às barreiras anômicas do olho e devido ao contínuo *turnover* das lágrimas.

Para se atingir a concentração terapêutica de fármaco nos tecidos do segmento anterior do olho, os colírios têm de ser administrados frequentemente. Neste sentido, é muito mais difícil administrar os colírios para o segmento posterior devido à maior distância de difusão. Para superar estas dificuldades da administração tópica, um sistema de libertação controlada ou a melhoria da permeação dos fármacos é essencial.

A administração sistêmica é outra das principais vias de administração de fármacos no olho. Os fármacos administrados sistemicamente atingem o tecido corioretinal através da circulação sanguínea. No entanto, as barreiras hemato-retinais externa e interna impõem limites ao influxo de fármacos no tecido da retina e na cavidade vítrea. Portanto, uma grande quantidade de fármaco e a sua frequente administração são requeridas para manter as concentrações terapêuticas, o que muitas vezes pode resultar na descontinuação do fármaco em consequência de graves efeitos adversos (13).

2.4.2. Modos de administração de fármacos no olho

A administração tópica de fármacos tem pouco efeito terapêutico nas estruturas do segmento posterior do olho. E a administração sistêmica tem baixa biodisponibilidade no olho devido às barreiras hemato-retinais.

Tratamentos prolongados e injeções intravenosas com doses elevadas de fármacos são muitas vezes necessários para manter as concentrações dentro da janela terapêutica. No entanto, a terapia crônica pode resultar em graves efeitos secundários sistêmicos (15).

Enquanto que, a injeção intraocular é usada para alcançar elevada biodisponibilidade, múltiplas injeções intraoculares podem estar associadas ao risco de cataratas, hemorragia no vítreo, descolamento da retina, endoftalmite e glaucoma (16).

Para tratar as doenças oculares nas quais as injeções intraoculares repetidas se mostraram efetivas, o desenvolvimento de sistemas de libertação controlada serão um avanço significativo (15).

A Tabela 3 resume várias vias de administração, os seus benefícios e desafios na administração de fármacos na cavidade ocular.

Na Figura 4 apresenta-se as diferentes vias de administração de fármacos no olho (em itálico) (14).

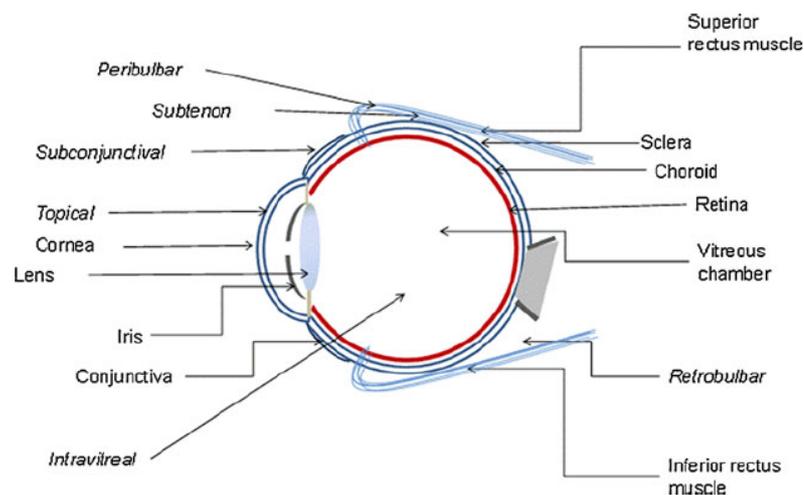


Figura 4 - Anatomia e vias de administração de fármacos no olho (14).

Tabela 3 - Sumário das vias de administração, benefícios e desafios na cavidade ocular (14).

Via de administração	Benefícios	Desafios	Aplicação no tratamento de doenças
Tópica	<ul style="list-style-type: none"> Grande adesão do paciente; Auto-administrável; Não invasivo. 	<ul style="list-style-type: none"> Maior diluição das lágrimas; Maior taxa de rotatividade das lágrimas; A córnea atua como barreira; Bombas de efluxo; Biodisponibilidade <5%. 	<ul style="list-style-type: none"> Uveíte; Ceratite; Esclerite; Conjuntivite; Blefarite; Episclerite.
Oral	<ul style="list-style-type: none"> Não invasivo. 	<ul style="list-style-type: none"> Barreira sangue-aquosa; Barreira sangue-retina; Dose elevada causa toxicidade; Biodisponibilidade <2%. 	<ul style="list-style-type: none"> Esclerite; Episclerite; Retinite por citomegalovírus; Uveíte posterior.
Intravítrea	<ul style="list-style-type: none"> Administração direta na cavidade vítrea e na retina; Manutenção da concentração do fármaco; Invade a barreira de sangue da retina. 	<ul style="list-style-type: none"> Descolamento da retina; Hemorragia; Cataratas; Incumprimento do doente; Endoftalmite. 	<ul style="list-style-type: none"> Degeneração macular relacionada com a idade; Uveíte posterior; Oclusão da veia ramificada da retina; Oclusão da veia central da retina; Edema macular diabético; Edema macular cistoide; Edema macular uveítico; Retinite por citomegalovírus.
Intracâmara	<ul style="list-style-type: none"> Garante níveis mais elevados do fármaco na câmara anterior; Elimina o uso de gotas tóxicas; Reduz os efeitos colaterais sistêmicos e na córnea observados com corticoterapia tópica. 	<ul style="list-style-type: none"> Segmento anterior tóxico; Síndrome tóxica de destruição das células endoteliais. 	<ul style="list-style-type: none"> Anestesia; Prevenção de endoftalmite; Dilatação da pupila; Inflamação.
Subconjuntival	<ul style="list-style-type: none"> Administração nos segmentos anterior e posterior do olho; Local para formulações <i>depot</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> Circulação conjuntival; Circulação coróide. 	<ul style="list-style-type: none"> Glaucoma; Retinite por citomegalovírus; Degeneração macular relacionada com a idade; Uveíte posterior.

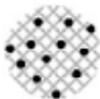
Subtenoniana	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrações elevadas dos fármacos na cavidade vítrea; Relativamente não-invasivo; • Menos complicações do que a administração intravítrea. 	<ul style="list-style-type: none"> • Epitélio pigmentado da retina; • Quemose; • Hemorragia subconjuntival. 	<ul style="list-style-type: none"> • Edema macular diabético; • Degeneração macular relacionada com a idade; • Oclusão da veia da retina; • Uveíte.
Retrobulbar	<ul style="list-style-type: none"> • Administração de doses altas de anestésicos locais; • Mais eficaz do que a via peribulbar; • Influência mínima na pressão intraocular. 	<ul style="list-style-type: none"> • Hemorragia retrobulbar; • Perfuração do globo ocular; • Paragem respiratória. 	<ul style="list-style-type: none"> • Anestesia.
Justaescleral posterior	<ul style="list-style-type: none"> • Seguro para administração de fármacos de libertação lenta; • Evita o risco de endoftalmite e de danos intraoculares. 	<ul style="list-style-type: none"> • Requer cirurgia; • Epitélio pigmentado da retina atua como barreira. 	<ul style="list-style-type: none"> • Degeneração macular relacionada com a idade.

2.5. Sistemas Poliméricos

Os polímeros são uma classe de materiais versáteis, que têm mudado o nosso cotidiano com aplicações importantes nas áreas da engenharia, médica e agrícola. A fusão da ciência dos polímeros com as ciências farmacêuticas conduziu a um avanço em termos de inovação, *design* e desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos (SLFs) (17).

Os sistemas poliméricos de liberação controlada de fármacos incluem: (1) uma mistura homogênea de fármaco e polímero (dispositivo do "tipo monolítico") (2) polímeros de hidrogel que se ligam aos fármacos através de ligações químicas ou iônicas (dispositivo do "tipo *binding*"), e (3) membrana exterior polimérica que envolve o fármaco (dispositivo do "tipo reservatório") (Tabela 4) (13).

Tabela 4 - Tipos de dispositivos poliméricos (13).

Tipo de dispositivo	Polímeros biodegradáveis	Polímeros não biodegradáveis
Monolithic-type 	Injetável: microsferas (emulsão) Implantável: vara, folha, <i>pellet</i> , disco, tampão (PLA, PLGA, polianidridos, poli (orto estéres), etc.)	Injetável: microsferas (emulsão) Implantáveis: <i>pellet</i> , folha (metilcelulose, poliacrilamida, poli-HEMA, etc.)
Binding-type 	Injetável: microsferas Implantável: folha, disco (gelatina, colagénio, albumina, quitosano, amido, dextrano, etc.)	-
Reservoir-type 	Injetável: microcápsula (PLA, PLGA) Injetável: lipossoma, micela	Implantável: disco, bomba osmótica (EVA, silicone laminado, etc.)

Os sistemas poliméricos para transporte de fármacos, são preparados a partir de diferentes polímeros, os quais podem ser biodegradáveis ou não-biodegradáveis.

Os sistemas compostos por polímeros não-biodegradáveis, principalmente os derivados de celulose, silicones, polímeros acrílicos, polivinilpirrolidona e copolímeros dos óxidos de etileno e propileno, embora apresentem uma taxa de liberação relativamente constante,

precisam geralmente de ser removidos posteriormente, o que requer procedimento cirúrgico.

Já os polímeros biodegradáveis podem apresentar vantagens sobre os anteriores, pois são totalmente absorvidos pelo organismo, não sendo necessário a sua remoção.

A preparação de sistemas biodegradáveis requer o controlo de um grande número de variáveis, já que a cinética de degradação do polímero *in vivo* deve permanecer constante, para que seja obtida uma libertação controlada do fármaco. Para que os sistemas poliméricos sejam eliminados do organismo, existem três mecanismos principais:

- **difusão simples:** este mecanismo está relacionado com os polímeros solúveis em água e que se tornaram insolúveis devido a uma reação química de "crosslinking". Desta forma, pode-se dizer que eles são insolúveis em água, mas apresentam uma matriz fortemente hidrofílica. Estes polímeros não são, portanto, adequados para a veiculação de substâncias hidrossolúveis e como possuem uma massa molar baixa difundem-se através da rede polimérica, independente da velocidade de degradação matricial. Entre os principais polímeros desta categoria, destacam-se a gelatina, o colagénio e o álcool polivinílico.
- **erosão sem clivagem:** mecanismo que ocorre com os polímeros que se tornam hidrossolúveis após reações de hidrólise ou ionização, sem alterações significativas na sua massa molar. Por apresentarem dificuldade de eliminação, tais polímeros não podem ser utilizados nos implantes. O Eudragit® (copolímero do éter metil vinílico e do anidrido maleico - PVM/MA) é um exemplo de polímero que sofre este tipo de erosão.
- **erosão/clivagem:** neste mecanismo, os polímeros são transformados em moléculas pequenas e solúveis, pela clivagem das suas cadeias. Durante este processo de degradação eles permitem a libertação da substância ativa. Este mecanismo é o que está relacionado com a definição de biodegradável. Os principais polímeros que sofrem este mecanismo de erosão são os poliésteres – poli(ϵ -caprolactona), polímeros e copolímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico, as poliamidas, os poliaminoácidos, os polialquilcianacrilatos e os poliortoésteres (2).

Os polímeros biodegradáveis são gradualmente convertidos numa forma solúvel por reações enzimáticas ou não enzimáticas que ocorrem no organismo, enquanto os polímeros não biodegradáveis não são metabolizados ou degradados no organismo. Ambos os materiais podem assumir várias formas: uma solução injetável com a capacidade de formar um gel ou

suspensão de micelas, emulsões lipídicas (microesferas), lipossomas micro/nanoesferas, micro/nanocápsulas ou um dispositivo implantável na forma de folha, *pellets*, disco, vara, entre outros.

Os polímeros biodegradáveis são classificados como hidrofóbicos ou hidrofílicos. Muitos dos polímeros que são sintetizados são hidrofóbicos, enquanto os biopolímeros são muitas vezes hidrofílicos. Os polímeros hidrofóbicos mais populares incluem o poliácido láctico (PLA), o poliácido glicólico (PGA) e seus copolímeros e o PLGA. Os polímeros hidrofílicos mais populares incluem as proteínas, os polissacáridos e os ácidos nucleicos.

Nos polímeros biodegradáveis existem dois métodos pelos quais ocorre a libertação controlada das substâncias. Um deles é do "tipo monolítico" feito por solidificação de uma mistura homogênea de polímeros hidrofóbicos e fármaco. Estes dispositivos podem libertar fármacos com cinética de ordem zero, acompanhados por erosão da superfície dos polímeros. Isto é adequado para a libertação de fármacos com pouca suscetibilidade à degradação resultante do aquecimento e secagem. O hidrogel "tipo *binding*" é muitas vezes fabricado a partir de polímeros hidrofílicos reticulados. Este tipo de hidrogel liberta os fármacos, que se encontram no seu interior ligados por ligações covalentes ou por complexação, por hidrólise enzimática das ligações inter- e intramoleculares dos polímeros. Isso torna possível a libertação de moléculas hidrofílicas tais como proteínas bioativas (13).

A escolha dos polímeros deve assim, basear-se nas características do fármaco e na duração prevista para a sua libertação (12).

2.5.1. Principais polímeros biodegradáveis utilizados nos implantes intraoculares

Os polímeros biodegradáveis são um grupo novo de produtos, cujo consumo mundial aumentou 15 vezes nos últimos dez anos. O maior produtor de polímeros biodegradáveis é uma empresa americana, a LLC Nature Works que produz vários tipos de PLA (19).

Os polímeros biodegradáveis mais utilizados atualmente são os poliésteres, tais como a poli(ϵ -caprolactona) (PCL), o poliácido láctico (PLA) e os diferentes tipos de copolímeros do poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (2).

Os produtos resultantes da degradação dos polímeros biodegradáveis são metabolizados a dióxido de carbono e água, via ciclo de Krebs, ou são excretados na urina (13).

2.5.1.1. Políácido láctico (PLA) e poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)

Atualmente o PLA é o polímero biodegradável mais popular. Apesar de ter muitas vantagens tais como a facilidade de produção, biodegradação e amplas possibilidades de aplicação; tem desvantagens das quais as mais importantes são a rigidez, a fragilidade, absorção de água e a possibilidade de degradação durante a produção. Uma forma de eliminar ou reduzir estas desvantagens é o desenvolvimento de novas misturas poliméricas (19).

O PLA e os PLGA têm sido muito utilizados e estudados em sistemas de libertação prolongada de fármacos para os tecidos oculares. A biodegradação destes polímeros ocorre por erosão/clivagem da cadeia polimérica, libertando os ácidos láctico e glicólico (2).

Os polímeros e copolímeros de PLA e do PLGA são sintetizados por reações de condensação a uma temperatura elevada (20).

A semi-vida do PLA é mais longa do que a dos copolímeros do PLGA (50:50). A libertação do fármaco a partir destes dispositivos geralmente segue um padrão de três fases: libertação inicial do fármaco, fase de difusão (regulada pela velocidade de degradação do polímero, pela área de superfície do dispositivo, pela percentagem da quantidade de fármaco existente e pela sua solubilidade em água) e uma libertação final. O último fenómeno é geralmente incontrollável, pouco previsível e por isso, em grande parte indesejável (18).

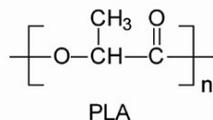


Figura 5 - Políácido láctico (PLA) (21).

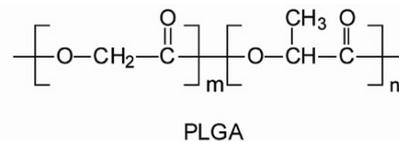


Figura 6 - Poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (21).

2.5.1.2. Poli(ε-caprolactona) (PCL)

A PCL é sintetizada a temperatura elevada por um processo de polimerização com abertura do anel da ε-caprolactona. É um polímero bastante hidrofóbico (17), biocompatível e semi-cristalino com uma temperatura de transição vítrea de - 60°C e com um ponto de fusão que varia entre 59 e 64°C, dependendo da sua natureza cristalina (6).

A biodegradação da PCL ocorre por meio de erosão/clivagem da cadeia polimérica. Por apresentar uma velocidade de degradação lenta, ela pode promover a libertação do fármaco por um período de até três anos.

Este polímero é bastante utilizado na preparação de nanocápsulas e, atualmente também tem sido utilizado para o desenvolvimento de outros sistemas de libertação prolongada (2).

É ainda muito utilizado na indústria farmacêutica e na área biomédica, respetivamente em biomateriais (sutura, material de osteossíntese, de pele artificial, suporte de regeneração celular) ou em sistemas de libertação prolongada de fármacos dirigidos a tecidos específicos no organismo. No entanto, apesar do potencial do PCL, a sua utilização em oftalmologia, especialmente para a via intraocular, tem sido pouco explorada (6).

A libertação do fármaco em reservatório poroso de PCL pode ser alcançada por mais de 250 dias com uma cinética de ordem zero. Copolimerizações de poli(ϵ -caprolactona) foram desenvolvidas e estudadas para a uveíte (18).

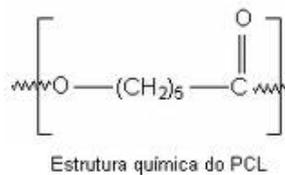


Figura 7 - Poli(ϵ -caprolactona) (21).

2.5.1.3. Polianidridos

Os polianidridos podem ser sintetizados por fusão e policondensação, desidrocloração e desidratação de acoplamento.

O polianidrido mais estudado é o 1,3-bis (carboxifenoxipropano) (PCPP) com ácido sebácico (AS), um polímero mais hidrofílico.

O PCPP puro tem uma vida extremamente longa (mais de 3 anos) que, após copolimerização com 80% de AS fica reduzida a alguns dias. A taxa de hidrólise pode ser controlada por modulação da proporção entre estes dois polímeros. Aumentando a quantidade de ácido sebácico o polímero fica menos hidrofóbico e assim, conduz a uma aceleração da hidrólise das cadeias do polímero. Estes polímeros são degradados por erosão na superfície e têm uma boa biocompatibilidade (18).

2.5.2. Implantes intraoculares preparados com polímeros biodegradáveis

Os implantes preparados a partir de sistemas poliméricos podem ser aplicados em diferentes regiões do olho. Em geral quanto mais profunda a região, mais delicado o procedimento e mais eficaz a concentração do fármaco na cavidade vítrea e na retina (2).

Os dispositivos intraoculares podem ser modulados em várias formas incluindo varas, tampão, *pellets*, discos e folhas. Podendo ser implantados no segmento anterior, na cavidade vítrea através da *pars plana*, ou no espaço intraescleral (18).

Os implantes intravítreos evitam o problema da redução de transparência do meio ocular, observado com a utilização de outros tipos de sistemas aplicados na forma de dispersão.

Os implantes intraoculares preparados com polímeros biodegradáveis não precisam de ser posteriormente removidos, pois são completamente metabolizados e eliminados pelo organismo. Estes sistemas permitem manter as concentrações de fármaco no local-alvo, dentro da janela terapêutica e por longo período de tempo (Figura 8) (2).

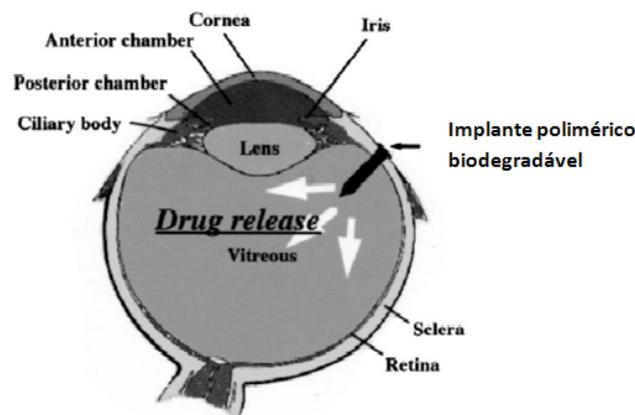


Figura 8 - Os dispositivos intravítreos são implantados na *pars plana*, e gradualmente libertam doses eficazes de fármaco na cavidade vítrea com a degradação do polímero (15).

2.6. Fatores que devem ser considerados na Formulação de Implantes Biodegradáveis para Liberação de Fármacos

O desenvolvimento de sistemas biodegradáveis é uma tarefa mais complicada do que a formulação de sistemas não degradáveis. Ao fabricar novos sistemas biodegradáveis muitas variáveis devem ser levadas em consideração:

- A cinética de degradação do polímero *in vivo* deve fazer-se a uma velocidade constante, para assim manter constante a liberação do fármaco.
- Muitos fatores podem afetar a taxa de degradação do polímero no organismo, alterações do pH ou da temperatura do corpo pode causar um aumento ou diminuição da taxa de degradação do sistema.
- A área de superfície do sistema de liberação também desempenha um papel importante na sua degradação. Quando o sistema sofre erosão, a área de superfície do implante diminui. Assim, a possibilidade de ocorrências de mudanças na forma do sistema *in vivo*, deve ser tida em conta durante a formulação/concepção do sistema. A fim de atingir uma liberação mais uniforme e constante, é necessário fazer implantes com formas geométricas, cuja superfície não mude em função do tempo durante a erosão. Uma forma do tipo “placa achatada”, que não apresenta qualquer vantagem de erosão é a forma mais adequada para se obter um de perfil cinético de liberação de ordem zero.
- Outro problema que ocorre com os sistemas biodegradáveis é a difusão lenta do fármaco a partir da matriz de polímero. A difusão do fármaco normalmente ocorre a uma velocidade mais lenta do que a bioerosão do sistema, (7) e é dependente da natureza química da substância polimérica utilizada na formulação do sistema (22). Isto torna-se um grande desafio a contornar no desenvolvimento de sistemas biodegradáveis, cuja utilização destina-se a sistemas de liberação controlada e a situações em que o fármaco tem uma janela terapêutica estreita.
- A biocompatibilidade com o organismo humano é essencial, uma vez que o sistema é para ser implantado. Esta característica não deve estar somente presente em implantes biodegradáveis, e é extensível a qualquer sistema implantável. Para uma substância ser biocompatível, deve cumprir certos requisitos. Neste sentido, todos os agentes devem ser quimicamente inertes, não carcinogênicos, hipoalergênicos e mecanicamente estáveis no local do implante. Além disso, o material não deve ser

modificado fisicamente ou quimicamente pelo tecido local, e o implante não deve provocar qualquer resposta inflamatória no local de implantação.

O desenvolvimento global dos implantes é um processo complexo e demorado que consiste em diversos ensaios diferentes para a estabilidade e biocompatibilidade. Se a biocompatibilidade adequada não for alcançada, muitos efeitos indesejáveis podem ocorrer, tais como contratura capsular, libertação inesperada do fármaco, adesão de plaquetas, lesão tecidual ou infecção da área circundante ao implante (7).

3. OBJETIVOS DO ESTUDO

Com este trabalho pretendeu-se obter implantes intraoculares poliméricos biodegradáveis para libertação prolongada de dexametasona, obtidos a partir dos métodos de *melting*, *solvent casting* e *electrospinning*. Estes dispositivos têm como finalidade o tratamento de doenças do segmento posterior do olho, tais como as cataratas, a retinopatia diabética, a degeneração macular associada ao envelhecimento e a retinite pigmentosa.

Pretendeu-se ainda proceder ao estudo comparativo dos perfis de libertação dos dispositivos obtidos através dos diferentes métodos. Os resultados do estudo comparativo serviram para definir qual o tipo de implante que vai libertar o fármaco durante mais tempo, permitindo determinar:

- A melhor metodologia;
- O polímero mais indicado;
- A forma ideal do fármaco versus o método utilizado;
- A razão mássica fármaco/polímero ideal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Ao longo de todo o trabalho experimental desenvolvido foram utilizadas as seguintes substâncias e reagentes:

- Acetona da Fisher Scientific UK, reagente de grau analítico;
- Clorofórmio da Fisher Scientific UK, reagente de grau analítico;
- Dexametasona da Alfa Aesar e Sigma, peso molecular de 392,47 g/mol e grau de pureza de 98%;
- Diclorometano da Fisher Scientific UK, reagente de grau analítico;
- Dimetilformamida da Fisher Scientific UK, reagente de grau analítico;
- Fosfato de dexametasona disódico da Alfa Aesar e Sigma, peso molecular de 516,40 g/mol e grau de pureza de 98%;
- Reagentes usados na preparação do tampão fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline – PBS*) da Sigma, reagentes de grau analítico;
- PCL 14 kDa da Aldrich;
- PCL 17 kDa da Perstorp;
- PLA 120 kDa tipo 2002D Ingeo da NatureWorks LLC, US.

4.2. Equipamentos

Ao longo de todo o trabalho experimental desenvolvido foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança modelo AS 220/C/2 da Radwag;
- Centrífuga modelo Rotofix 32A da Hettich;
- Equipamento de DSC da Universal VA.2E TA Instruments;
- Espectrofotômetro modelo V-650 da Jasco;
- Estufa modelo 600 da Memmert.

4.3. Métodos

4.3.1. Método de *melting*

4.3.1.1. Descrição e considerações

O *melting* é um processo que é inadequado a fármacos termolábeis, uma vez que neste método usam-se temperaturas elevadas (23), aproximadas ao ponto de fusão (Pf) do polímero e sem atingir o Pf do fármaco.

Pela razão apontada anteriormente, e ao contrário do PCL que tem um Pf de 60°C, esta metodologia não foi usada com o PLA porque o seu Pf é de 200°C e o Pf da dexametasona é de cerca de 262°C, sendo muito próximos.

4.3.1.2. Protocolo experimental

1. Pesou-se o PCL 37 kDa e o PCL 14 kDa;
2. Pesou-se a dexametasona e o fosfato de dexametasona disódico;
3. Colocou-se o fármaco e o polímero numa cuvete de metal e levou-se à placa de aquecimento para fundir (sem ultrapassar os 100°C);
4. Aquando da fusão, misturou-se homogeneamente o fármaco com o polímero;
5. Retirou-se da placa de aquecimento após obter-se uma mistura homogénea e reservou-se;
6. Procedeu-se ao corte das peças, de forma a obter dispositivos cilíndricos com 4 mm de diâmetro e cerca de 1mm de altura (Tabela 7).

4.3.2. Método de *solvent casting*

4.3.2.1. Descrição e considerações

O *solvent casting* envolve o uso de solventes orgânicos para dissolver o fármaco no polímero, o que pode ser problemático para a adição de biomoléculas.

Ao contrário do método de *melting*, este método pode ser usado com fármacos termolábeis, dado que não há recurso ao calor (23).

4.3.2.2. Protocolo experimental

1. Pesou-se o PCL 37 kDa, o PCL 14 kDa e a PLA 120 kDa;
2. Pesou-se a dexametasona e o fosfato de dexametasona disódico;
3. Preparou-se uma mistura de clorofórmio:acetona (50:50);
4. Misturaram-se os polímeros PCL 37 e 14 kDa, a frio e com agitação magnética, com a mistura de solventes previamente preparada. E dissolveu-se o PLA 120 kDa em clorofórmio, a frio e com agitação magnética;
5. Depois de os polímeros se dissolverem homoganeamente na mistura de solventes ou no solvente, juntaram-se os fármacos. No caso da dexametasona, esta dissolveu-se completamente na solução polimérica. O fosfato de dexametasona dissódico, como não é solúvel em solventes orgânicos, ficou apenas suspenso na solução polimérica;
6. De seguida, verteram-se as misturas para formas de metal e colocaram-se na *hotte*, durante 24 horas para evaporar os solventes;
7. Cortaram-se as peças, de forma a obter dispositivos cilíndricos com 4 mm de diâmetro e cerca de 1 mm de altura (Figura 9) (Tabela 7).

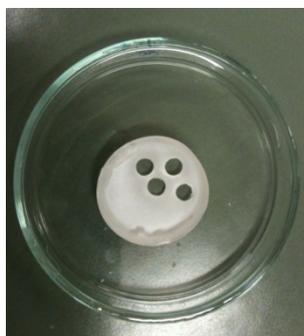


Figura 9 - Filme obtido pelo método de *solvent casting* após o corte de algumas peças.

4.3.3. Método de *electrospinning*

4.3.3.1. Descrição e considerações

O *electrospinning* é um método de produção de fibras com diâmetros que variam desde algumas centenas de nanómetros até alguns micrómetros. Este método ocorre através da aceleração de um jato de solução de polímero e fármaco carregada por um campo elétrico.

Esta tecnologia é cada vez mais utilizada devido à simplicidade do processo e aos vários materiais que podem ser usados. As fibras podem ser produzidas a partir de qualquer polímero natural ou sintético.

As fibras resultantes do método de *electrospinning* podem ter diversas aplicações, incluindo têxteis, biomedicina (material de penso, administração de medicamentos, engenharia de tecidos, cosméticos), sensores para dispositivos eletrónicos, cristais líquidos, células fotovoltaicas, entre outras (23).

Normalmente, o *set-up* experimental consiste numa fonte de alimentação de alta tensão conectada a um eléctrodo com a geometria tipo agulha (por meio do qual a solução polimérica é ejetada) para o eléctrodo coletor. A solução de polímero é bombeada com o fluxo desejado através de uma bomba de seringa (Figuras 10, 12 e 13).

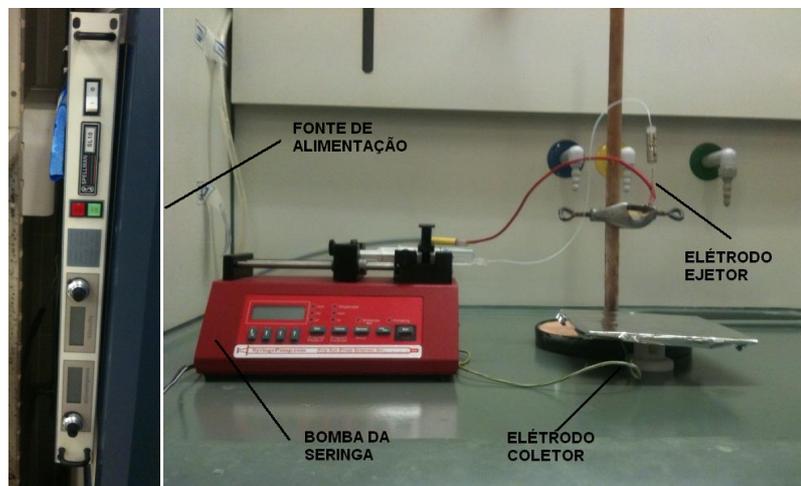


Figura 10 - Equipamento para o método de *electrospinnig*.

Não foi possível fazer dispositivos com PCL 14 kDa por este método, uma vez que não houve deposição de fibras (aspeto quebradiço) (Figura 11). Mesmo com os restantes métodos, todas as peças com o PCL 14 kDa ficaram muito quebradiças, devido ao seu baixo peso molecular.

Igualmente, também não se prepararam implantes de fosfato de dexametasona dissódico por este meio, uma vez que esta forma é praticamente insolúvel em solventes orgânicos. A

sua utilização na forma de suspensão na solução de polímero não foi testada, pois esta acarretaria alguns problemas, nomeadamente, uma grande probabilidade de entupir a agulha do equipamento do *electrospinning*, ligada ao eléctrodo.

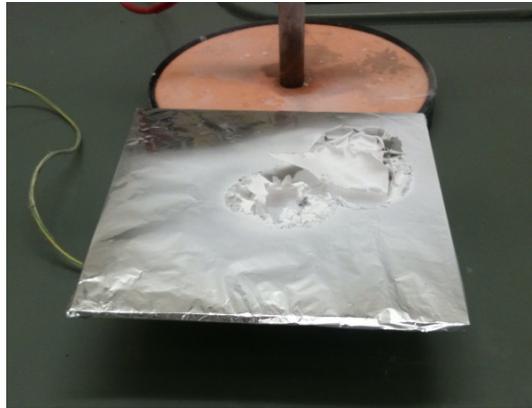


Figura 11 - Resultado do método de *electrospinning* com o PCL 14 kDa.

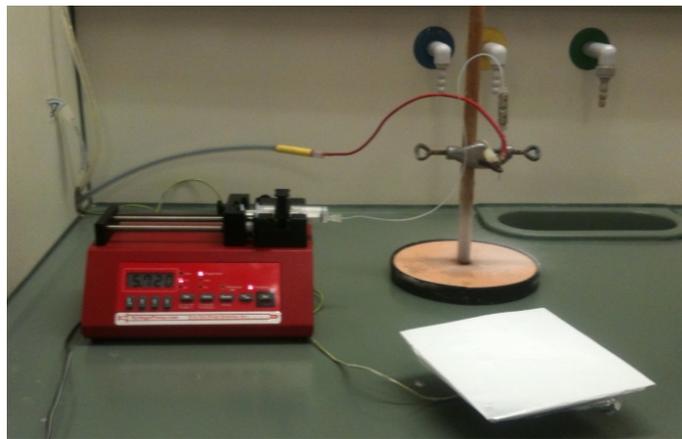


Figura 12 - Filme polimérico biodegradável obtido por *electrospinning*.



Figura 13 - Filme polimérico biodegradável obtido por *electrospinning* antes do corte.

4.3.3.2. Protocolo experimental

1. Preparou-se uma mistura de solventes:

Tabela 5 - Mistura dos reagentes.

Polímero	Mistura de solventes (70:30)
PCL 37 kDa	Diclorometano/Dimetilformamida
PLA 120 kDa	Clorofórmio/Dimetilformamida

2. Pesou-se o PCL 37 kDa, a PLA 120 kDa e a dexametasona;
3. Misturou-se o polímero, a frio e com agitação magnética, com a mistura de solventes previamente preparada;
4. Depois de o polímero se dissolver homogeneamente na mistura de solventes, juntou-se o fármaco;
5. Após se obter uma mistura homogênea, encheu-se a seringa do equipamento com a mistura;
6. Montagem do equipamento com os seguintes parâmetros:

Tabela 6 - Parâmetros do equipamento de *electrospinning*.

Parâmetros	PCL 37 kDa	PLA 120 kDa
Diâmetro da seringa (mm)	15,80	15,80
Diâmetro interno da agulha (mm)	0.41	0.41
Volume a dispensar (ml)	10,00	10,00
Caudal (ml/h)	3,00	3,00
Voltagem (kw)	17,0	17,0
Amperagem (mA)	13,0	13,0

7. Ligou-se o gerador de voltagem, e após aproximadamente 2 horas e 30 minutos os filmes ficaram prontos;
8. Para secar, colocaram-se os filmes na *hotte* durante 48 horas;
9. Cortaram-se os filmes em quadrados de 1cm² (Tabela 7).

Tabela 7 - Representação esquemática dos polímeros, fármacos, razões mássicas fármaco/polímero (F/P) e respectivas quantidades usadas em cada metodologia.

		MÉTODOS				
		<i>Melting</i>		<i>Solvent casting</i>		<i>Electrospinning</i>
FÁRMACOS		Dexametasona	Fosfato de dexametasona dissódico	Dexametasona	Fosfato de dexametasona dissódico	Dexametasona
POLÍMEROS	PCL 37 KDa	F/P: 10% F/P: 20mg/200mg	F/P: 10% F/P: 20mg/200mg	F/P: 10% F/P: 30mg/300mg	F/P: 10% F/P: 30mg/300mg	F/P: 3%
		F/P: 25% F/P: 62,5mg/250mg	F/P: 25% F/P: 62,5mg/250mg	F/P: 25% F/P: 62,5mg/250mg	F/P: 25% F/P: 62,5mg/250mg	F/P: 22,5mg/750mg
	PCL 80 KDa	F/P: 10% F/P: 25mg/250mg	F/P: 10% F/P: 25mg/250mg	F/P: 10% F/P: 25mg/250mg	F/P: 10% F/P: 25mg/250mg	
		F/P: 25% F/P: 62,5mg/250mg	F/P: 25% F/P: 62,5mg/250mg	F/P: 25% F/P: 62,5mg/250mg	F/P: 25% F/P: 62,5mg/250mg	
	PLA 120 KDa			F/P: 10% F/P: 25mg/250mg	F/P: 10% F/P: 25mg/250mg	F/P: 3%
				F/P: 25% F/P: 62,5mg/250mg	F/P: 25% F/P: 62,5mg/250mg	F/P: 22,5mg/750mg

4.3.4. Ensaio de libertação *in vitro*

4.3.4.1. Descrição e considerações

A libertação pode ser definida, de forma simplificada, como o processo através do qual o fármaco é libertado da sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo (24).

Os estudos de libertação *in vitro* são uma ferramenta indispensável (i) nas várias etapas dos processos do desenvolvimento galénico, (ii) para a identificação de variáveis críticas na produção, formulação e controlo de qualidade, (iii) no estabelecimento de correlações *in vitro/in vivo* e (iv) para os assuntos regulamentares.

É primordial desenvolver ensaios de libertação que possam prever de forma mais eficaz o comportamento *in vivo* das formas farmacêuticas, devendo levar não só à redução dos custos e trabalho necessários ao desenvolvimento de uma forma farmacêutica, mas também ao número e tamanho dos estudos clínicos requeridos.

O conhecimento e controlo das variáveis que podem influenciar a libertação da substância ativa, bem como a padronização e consequente calibração e validação de equipamentos e procedimentos, fortalecem a importância destes ensaios tornando-os mais confiáveis, robustos e exequíveis.

A seleção criteriosa das condições do ensaio deve ser orientada no sentido de se obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de deteção de eventuais desvios aos padrões de qualidade inicialmente pretendidos (25, 26 e 27).

4.3.4.2. Protocolo experimental

1. De forma a mimetizar o pH 7,4 do olho humano, os dispositivos foram colocados em *falcons* com PBS;
2. Para o ensaio ocorrer à temperatura corporal e consequentemente do olho humano, os *falcons* foram colocados na estufa a 37°C;
3. Em intervalos previamente determinados, retirou-se todo o volume de PBS dos *falcons*, e substituiu-se por solução nova;
4. A medição da quantidade de fármaco libertado para o meio (solução de PBS) foi realizada no espectrofotómetro a comprimento de onda fixo de 242,0 nm.

4.3.5. Extração do fármaco remanescente nos implantes

4.3.5.1. Descrição e considerações

Depois de terminados os ensaios de libertação *in vitro*, e de forma a determinar a quantidade de fármaco não libertada, os dispositivos foram dissolvidos num solvente orgânico e o fármaco extraído com PBS.

4.3.5.2. Protocolo experimental para o fosfato de dexametasona dissódico

1. Colocaram-se os dispositivos com fosfato de dexametasona dissódico em tubos de ensaio de vidro;
2. Para dissolver os polímeros adicionou-se clorofórmio;
3. Colocou-se de seguida PBS, e agitou-se vigorosamente a emulsão formada, de forma a promover o contacto entre as duas fases e, dessa forma, a migração do fármaco da fase orgânica para a fase aquosa. De seguida os tubos foram centrifugados a 1500 rpm, para separar as duas fases. No final, viu-se nitidamente as duas fases distintas;
4. Retirou-se o sobrenadante (correspondente à fase aquosa) e procedeu-se à leitura no espectrofotómetro a comprimento de onda fixo de 242 nm.

4.3.5.3. Protocolo experimental para a dexametasona

1. Colocaram-se os dispositivos com dexametasona em tubos de ensaio de vidro;
2. Para dissolver os polímeros adicionou-se clorofórmio;
3. Colocou-se de seguida PBS, e agitou-se vigorosamente a emulsão formada, de forma a promover o contacto entre as duas fases e, dessa forma, a migração do fármaco da fase orgânica para a fase aquosa. De seguida os tubos foram centrifugados a 1500 rpm, para separar as duas fases. No final, viu-se nitidamente as duas fases distintas;
4. Reservou-se o sobrenadante;
5. Repetiram-se novamente os passos 3 e 4;
6. Procedeu-se à leitura dos sobrenadantes no espectrofotómetro a comprimento de onda fixo de 242 nm.

4.3.6. Caracterização térmica dos materiais e implantes

4.3.6.1. Descrição e considerações

A DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) mede a temperatura e a entalpia (calor) associadas às transições nos materiais. Esta técnica proporciona informações quantitativa e qualitativa acerca das alterações físicas e químicas que envolvem processos exotérmicos ou endotérmico, ou mudanças na capacidade calorífica.

Muitos materiais farmacêuticos exibem comportamento polimórfico no qual a substância pode existir em várias formas cristalinas, dependendo das condições de processamento. A DSC é uma ferramenta útil para a detecção e quantificação destas formas diferentes.

A forma cristalina de uma substância farmacologicamente ativa afeta as suas propriedades físicas, e conseqüentemente a sua atividade terapêutica. Fatores jurídicos relacionados com questões de patentes também estão envolvidos, uma vez que o aparecimento de uma nova estrutura cristalina normalmente não está protegida pela patente (28 e 29).

4.3.6.2. Protocolo experimental

Foram realizados termogramas da dexametasona, do fosfato de dexametasona dissódico, do PLA 120 kDa e do PCL 37kDa.

Foram realizados os termogramas dos implantes (de dexametasona e de fosfato de dexametasona dissódico) preparados pelos métodos de *solvent casting* e *melting*, com o PCL 37 kDa e uma F/P de 25%. Só foram realizados termogramas destes implantes, dado que estes revelaram-se ser representativos do comportamento dos restantes implantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaio de Libertação *in vitro*

5.1.1. Determinação da Percentagem de Fármaco Libertado após 2 meses

Os valores de absorvância lidos no espectrofotómetro, para as amostras recolhidas durante o ensaio de libertação *in vitro*, foram usados para a determinação da concentração de fármaco na amostra (C_{fa}). A equação desta última grandeza foi obtida através das retas de calibração determinadas pelos valores de absorvância das soluções padrão de PBS lidos no espectrofotómetro.

Com os valores da C_{fa} foi possível determinar a massa libertada pelos dispositivos em cada período de recolha ($m_{libertada\ t=t}$).

$$m_{libertada\ t=t} = Volume_{PBS} \times Fator\ Diluição \times C_{fa}$$

A partir da $m_{libertada\ t=t}$ calculou-se a $m_{acumulada\ final}$.

A percentagem de fármaco libertado ($\%_{fl}$) pelo dispositivo durante o tempo que decorreu o ensaio, calculou-se através da $m_{acumulada\ final}$ e os respetivos valores de EDL (grandeza apresentada mais à frente).

$$\%_{fl} = \left(\frac{m_{acumulada\ final}}{EDL} \right) \times 100\%$$

5.1.2. Determinação da Massa Teórica de Fármaco no dispositivo (*Theoretical Drug Loading – TDL*)

O TDL é uma grandeza que expressa a percentagem de fármaco que deveria existir, se não tiverem ocorrido perdas, no dispositivo. Determinou-se a partir dos valores das massas de fármaco, de polímero e de dispositivo pesadas.

$$TDL = \left(\frac{m_{fármaco}}{m_{fármaco} + m_{polímero}} \right) \times m_{dispositivo}$$

5.1.3. Determinação da Massa Real de Fármaco no dispositivo (*Experimental Drug Loading – EDL*)

A massa real de fármaco no dispositivo (EDL) determinou-se a partir dos valores da massa de fármaco no sobrenadante (m_{fs}) e da massa de fármaco acumulada ($m_{acumulada\ final}$) correspondente à última recolha do ensaio de libertação. O primeiro valor foi obtido através da metodologia de extração do fármaco remanescente.

$$EDL = m_{acumulada\ final} + m_{fs}$$

5.2. Determinação da Eficiência de Encapsulamento do Fármaco (EE)

A eficiência de encapsulamento do fármaco (EE) serve para determinar se toda a quantidade de fármaco pesada e adicionada ao polímero ficou incorporada no sistema. O valor desta grandeza é expresso em percentagem, sendo que 100% significa que todo o fármaco pesado ficou incorporado no implante.

$$EE = \frac{EDL}{TDL} \times 100\%$$

5.3. Extração do fármaco remanescente

Depois de terminados os ensaios de libertação *in vitro*, determinou-se a quantidade de fármaco não libertada pelos dispositivos durante o ensaio *in vitro* (m_{fs}).

Após a recolha dos sobrenadantes procedeu-se à leitura dos valores de absorvância para determinar a concentração de fármaco no sobrenadante (C_{fs}). A equação desta última grandeza foi obtida através das retas de calibração determinadas pelos valores de absorvância das soluções padrão de PBS lidos no espectrofotómetro.

Com os valores da C_{fs} foi possível determinar a massa de fármaco no sobrenadante (m_{fs}).

$$m_{fs} = Volume_{PBS} \times Fator\ Diluição \times C_{fs}$$

A percentagem de fármaco retido ($\%_{fr}$) pelo dispositivo calculou-se através da m_{fs} e os respetivos valores de EDL.

$$\%_{fr} = \left(\frac{m_{fs}}{EDL} \right) \times 100\%$$

5.4. Resultados dos Ensaio de Liberação *in vitro* da Dexametasona

Tabela 8 - Correspondência da designação dos implantes de dexametasona ao método, polímero e F/P utilizados.

Designação do implante	Método	Polímero	F/P%
M_PCL37_10_D	Melting	PCL 37 kDa	10
M_PCL37_25_D	Melting	PCL 37 kDa	25
M_PCL14_10_D	Melting	PCL 14 kDa	10
M_PCL14_25_D	Melting	PCL 14 kDa	25
SC_PCL37_10_D	Solvent casting	PCL 37 kDa	10
SC_PCL37_25_D	Solvent casting	PCL 37 kDa	25
SC_PCL14_10_D	Solvent casting	PCL 14 kDa	10
SC_PCL14_25_D	Solvent casting	PCL 14 kDa	25
SC_PLA_10_D	Solvent casting	PLA 120 kDa	10
SC_PLA_25_D	Solvent casting	PLA 120 kDa	25
E_PCL37_D	Electrospinning	PCL 37 kDa	3
E_PLA_D	Electrospinning	PLA 120 kDa	3

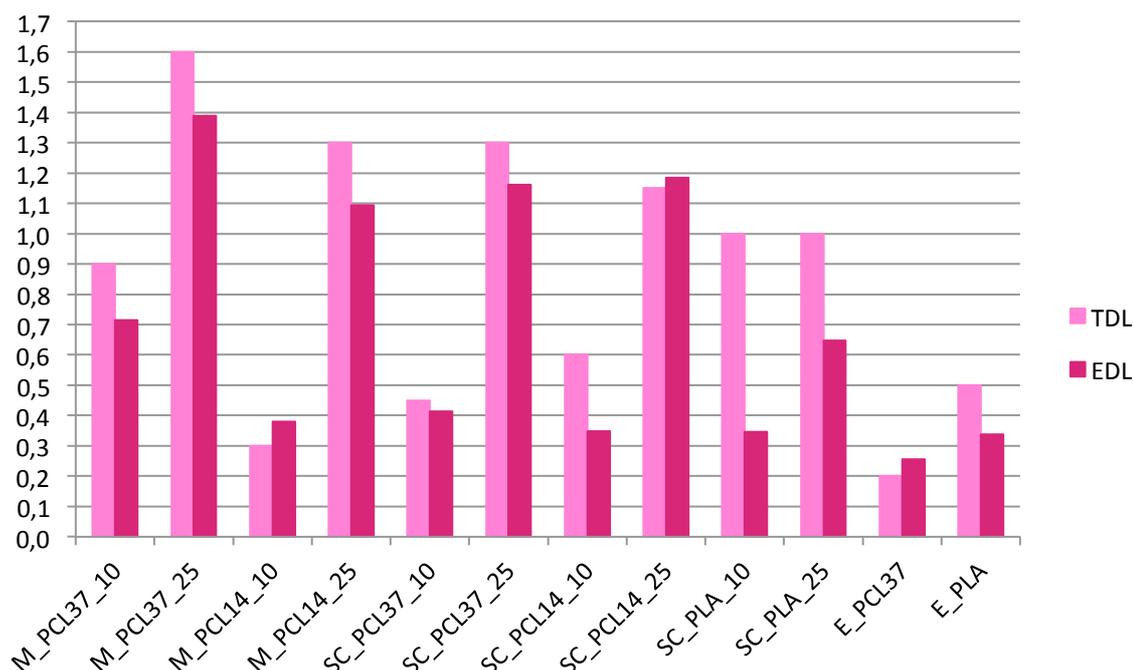


Gráfico I - Valores de TDL e EDL nos dispositivos de dexametasona.

Através da análise do Gráfico I observa-se que existem três implantes que apresentam um valor de EDL maior que o valor de TDL. Isto é, a massa real de fármaco que estes dispositivos continham era superior à massa teórica que se esperava encontrar. Esta diferença entre as duas grandezas traduz-se também em termos de eficiência de

encapsulamento do fármaco (EE), que expressa a percentagem de fármaco pesado que ficou efetivamente incorporada no implante. No caso destes três dispositivos (M_PCL14_10, SC_PCL14_25 e E_PCL37) o valor de EE é superior a 100%. Isto acontece, porque o fármaco não ficou uniformemente distribuído na matriz do polímero. E quando do corte em peças dos filmes, muitas destas peças foram cortadas em sítios do filme onde existia mais quantidade de fármaco.

O dispositivo SC_PCL37_10 é aquele que apresenta valores mais aproximados entre o TDL e o EDL, sendo este o dispositivo que em termos de quantidades absolutas, tem maior quantidade de fármaco e consequentemente um melhor valor de EE.

O implante, onde se verifica uma diferença maior entre os valores de TDL e EDL é o SC_PLA_10, a qual se traduz numa menor quantidade de fármaco existente no implante e, consequentemente, também numa menor eficiência na encapsulação.

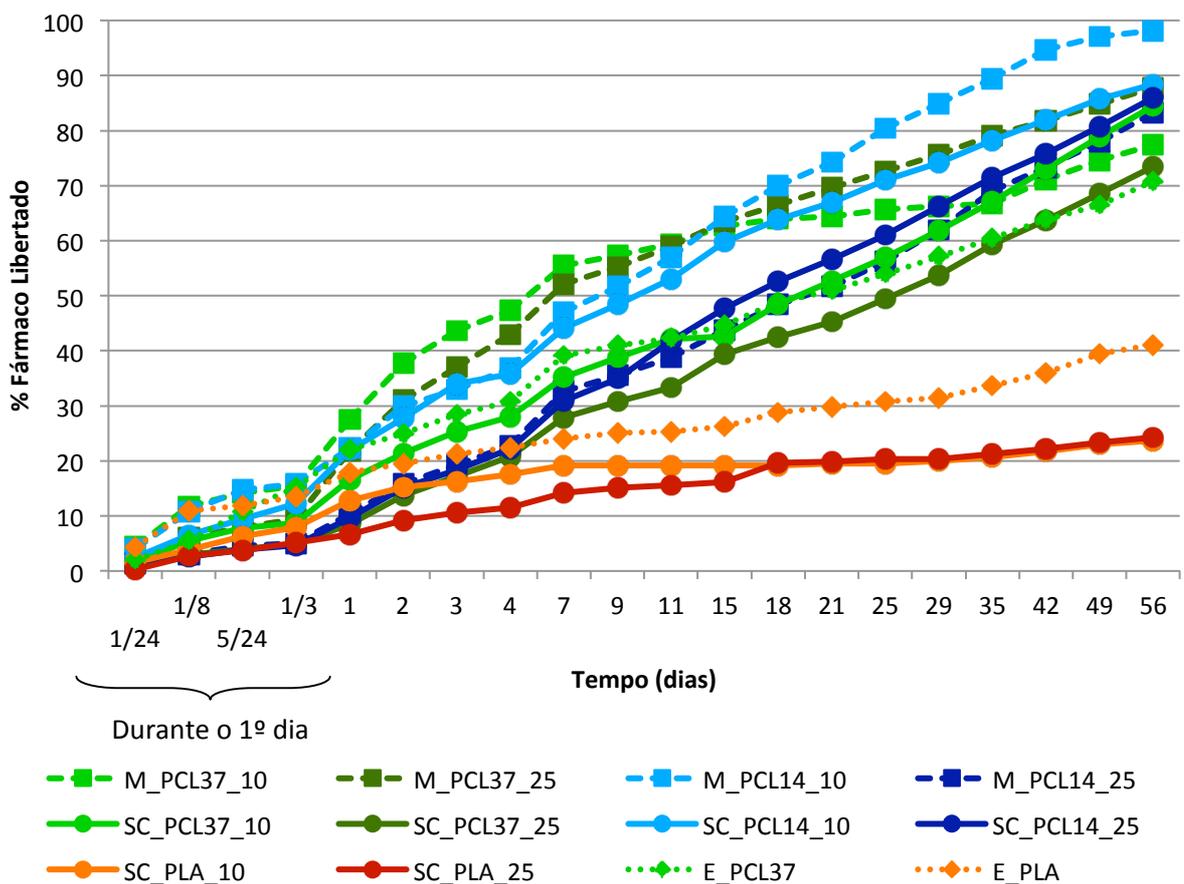


Gráfico 2 - Ensaio de libertação *in vitro* da dexametasona.

Pela análise do Gráfico 2 verifica-se que, de uma forma geral, todos os implantes têm a capacidade de libertar a dexametasona de forma gradual e ao longo de um período de

tempo de pelo menos dois meses. Este facto é facilmente justificável, dado que como a dexametasona é hidrofóbica tem afinidade para os polímeros, que também são hidrofóbicos, libertando para o meio uma quantidade menor de fármaco e de forma gradual. Este é o comportamento ideal, pois é característico dos sistemas de libertação controlada.

Verifica-se que os implantes que apresentam uma maior taxa de libertação são aqueles preparados com os dois PCL's –(PCL 14 kDa e PCL 37 kDa), independentemente do método utilizado e da razão mássica fármaco/polímero. Para estes implantes, a percentagem de fármaco libertada ao fim de dois meses situa-se entre os 71% e 98%, percentagem correspondente aos implantes E_PCL37 e M_PCL14_10 respetivamente.

O dispositivo M_PCL14_10 é o que apresenta uma percentagem de libertação de dexametasona maior (98%), ao longo dos dois meses. Este comportamento deve-se ao facto de:

- (i) A metodologia usada ser o *melting*, o que significa que o fármaco, ao contrário do que acontece nos outros dois métodos, não está solubilizado na matriz polimérica. No *melting* o fármaco encontra-se apenas disperso, estando facilitada a sua libertação para o meio;
- (ii) O polímero que o constitui é o PCL 14 kDa, que ao possuir um peso molecular muito baixo, faz com que as suas cadeias poliméricas sejam menos rígidas, não permitindo ao fármaco ficar preso na sua estrutura.

Através do mesmo gráfico observa-se que os dois implantes que libertaram menos fármaco (24%) durante os dois meses, foram os implantes obtidos por *solvent casting* e com PLA. O implante obtido por *electrospinning* e com PLA, também registou uma taxa de libertação baixa (41%). Estes dispositivos inicialmente, também apresentaram diferenças significativas entre os valores das grandezas TDL e EDL (Gráfico 1), o que pode justificar em parte este comportamento. Se estes dispositivos tinham à partida uma quantidade de fármaco menor, a sua taxa de libertação de fármaco seria mais baixa que o esperado.

Segundo a bibliografia, a duração e a taxa de libertação dos fármacos são afetadas pelos pesos moleculares dos polímeros; pela área de superfície total e pelo volume das matrizes; e pela quantidade e características do fármaco. Todos estes fatores podem regular o perfil de libertação do fármaco (15).

É de salientar que, o dispositivo com um maior perfil de libertação é constituído pelo polímero com menor peso molecular utilizado neste trabalho experimental (PCL 14 kDa), e

em contrapartida, os dispositivos que possuem um perfil de libertação menor, são os três únicos dispositivos constituídos por PLA 120 kDa. Este corresponde ao polímero com peso molecular maior. Estes perfis de libertação são assim justificáveis pelo facto de a velocidade de degradação dos polímeros ser afetada pelo seu peso molecular. Quanto maior o peso molecular, menor a velocidade de degradação do dispositivo, e conseqüentemente, menor quantidade de fármaco é libertado.

5.5. Resultados dos Ensaios de Liberação *in vitro* do Fosfato de Dexametasona Dissódico

Tabela 9 - Correspondência da designação dos implantes de fosfato de dexametasona dissódico ao método, polímero e F/P utilizados.

Designação do implante	Método	Polímero	F/P%
M_PCL37_10	<i>Melting</i>	PCL 37 kDa	10
M_PCL37_25	<i>Melting</i>	PCL 37 kDa	25
M_PCL14_10	<i>Melting</i>	PCL 14 kDa	10
M_PCL14_25	<i>Melting</i>	PCL 14 kDa	25
SC_PCL37_10	<i>Solvent casting</i>	PCL 37 kDa	10
SC_PCL37_25	<i>Solvent casting</i>	PCL 37 kDa	25
SC_PCL14_10	<i>Solvent casting</i>	PCL 14 kDa	10
SC_PCL14_25	<i>Solvent casting</i>	PCL 14 kDa	25
SC_PLA_10	<i>Solvent casting</i>	PLA 120 kDa	10
SC_PLA_25	<i>Solvent casting</i>	PLA 120 kDa	25

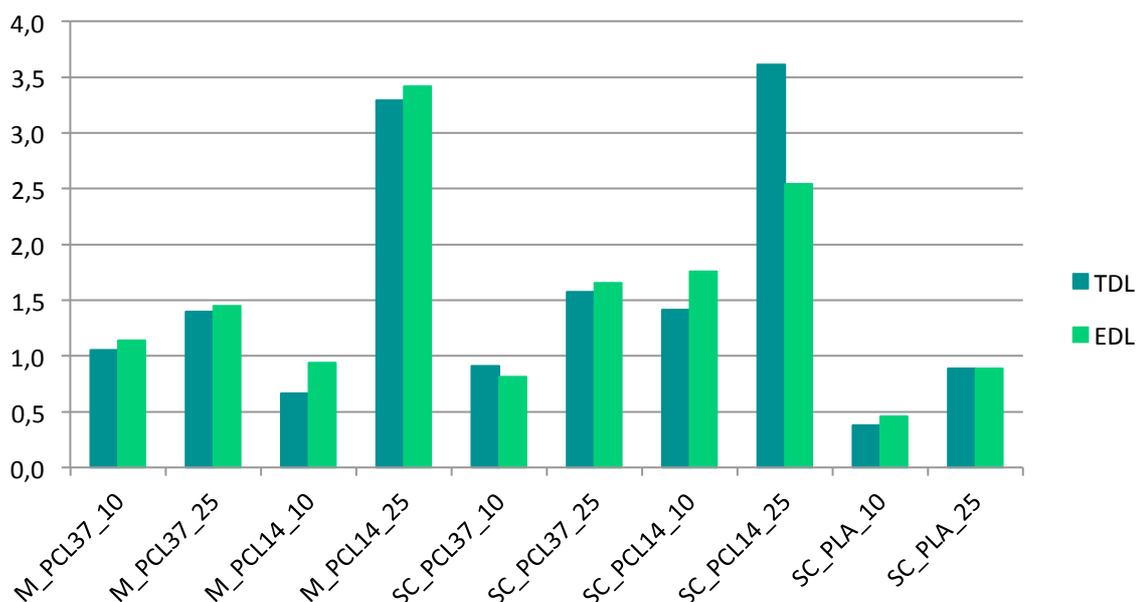


Gráfico 3 - Valores de TDL e EDL nos dispositivos de fosfato de dexametasona dissódico.

Pela análise do Gráfico 3, observa-se que existem apenas dois implantes que apresentam um valor de TDL maior que o valor de EDL. Estes implantes são os SC_PCL37_10 e o SC_PCL14_25. É de salientar que este segundo dispositivo apresenta uma quantidade muito baixa de fármaco em relação à esperada (grande diferença entre as barras das duas grandezas), o que se traduz numa baixa eficiência de encapsulamento do fármaco neste dispositivo.

Nos restantes implantes os valores de TDL são menores que os valores de EDL, ou seja, a massa real de fármaco que existe nestes dispositivos é superior à massa teórica que deveria estar incorporada. Nestes implantes a eficiência de encapsulação é superior a 100%, o que quer dizer que o fosfato de dexametasona dissódico não se distribuiu uniformemente na matriz do polímero, e quando se procedeu ao corte, foram retiradas peças onde existia uma maior quantidade de fármaco.

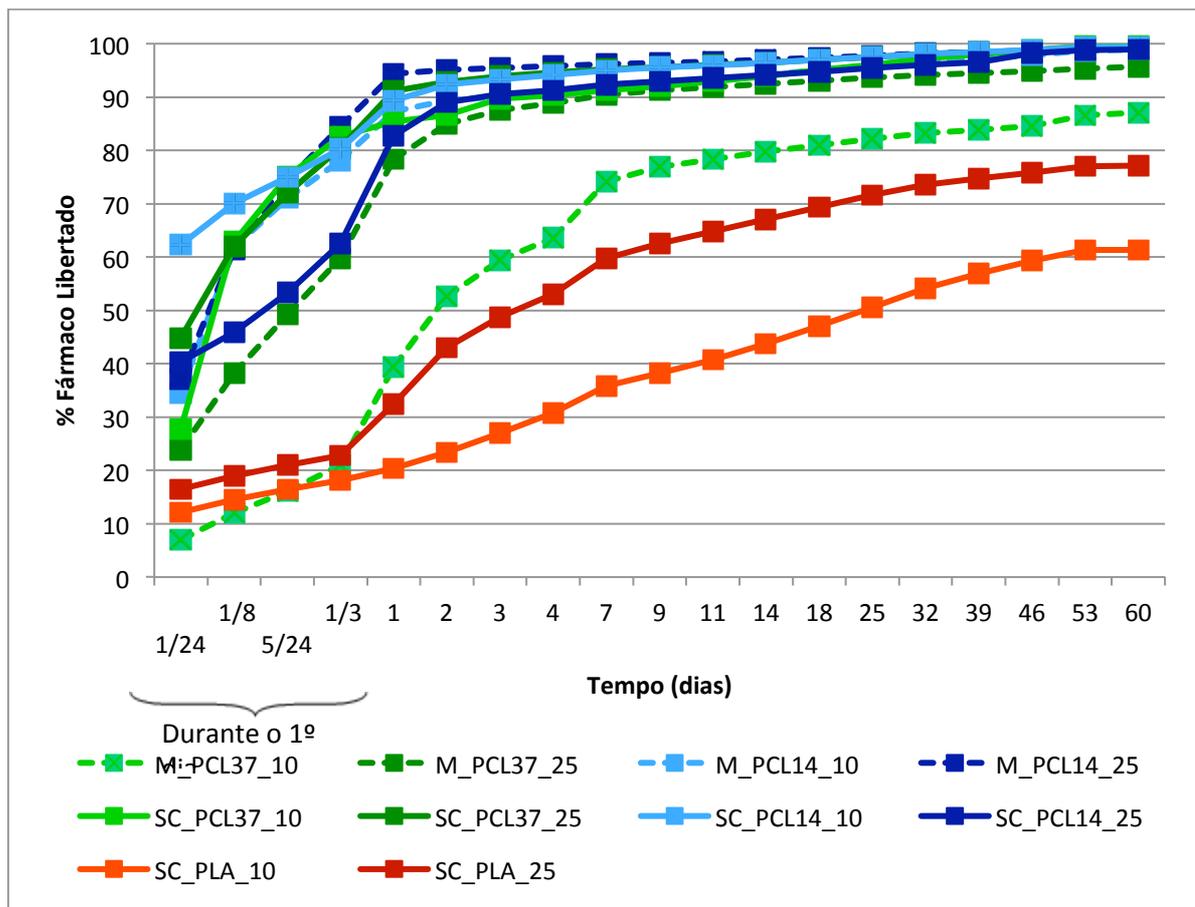


Gráfico 4 - Ensaio de liberação *in vitro* do fosfato de dexametasona dissódico.

Pela análise do Gráfico 4, observa-se que todos os implantes apresentam um padrão idêntico de liberação de fármaco – existe um pico de liberação que ocorre logo no início, no qual é libertado grande parte do fármaco. Após este pico, a quantidade de fármaco libertada mantém-se constante, mas é muito diminuta (a maior parte do fármaco foi libertada logo no início). Isto acontece, dado que o fosfato de dexametasona dissódico, ao contrário da dexametasona, é muito solúvel em meio aquoso, libertando mais facilmente e, conseqüentemente, mais rapidamente o fármaco dos dispositivos.

Verifica-se que existem vários implantes com um perfil de libertação muito idêntico (valores muito próximos). Mas o implante que libertou na totalidade o fármaco, foi o dispositivo obtido pelo método de *solvent casting*, com PCL 37 kDa e com 10% F/P.

Os dois implantes com menor libertação de fármaco durante os 2 meses, foram os implantes SC_PLA_10 e o SC_PLA_25, com libertações de 61% e 77% respetivamente. Estes dois implantes com menor libertação de fármaco, são mais uma vez, os implantes que possuem o polímero com maior peso molecular (PLA 120 kDa). Por outro lado, o dispositivo com a razão mássica fármaco/polímero de 10% é o dispositivo que libertou menos fármaco. Este facto é justificável, primeiro porque o dispositivo ao ter incorporada menor percentagem de fármaco, tem uma quantidade menor disponível e assim liberta menos; segundo, porque como tem menor quantidade de fármaco, este está mais incorporado na estrutura da matriz polimérica, não forma aglomerados e liberta-se mais dificilmente, ao contrário dos dispositivos com 25% F/P.

5.6. Caracterização térmica dos materiais e implantes

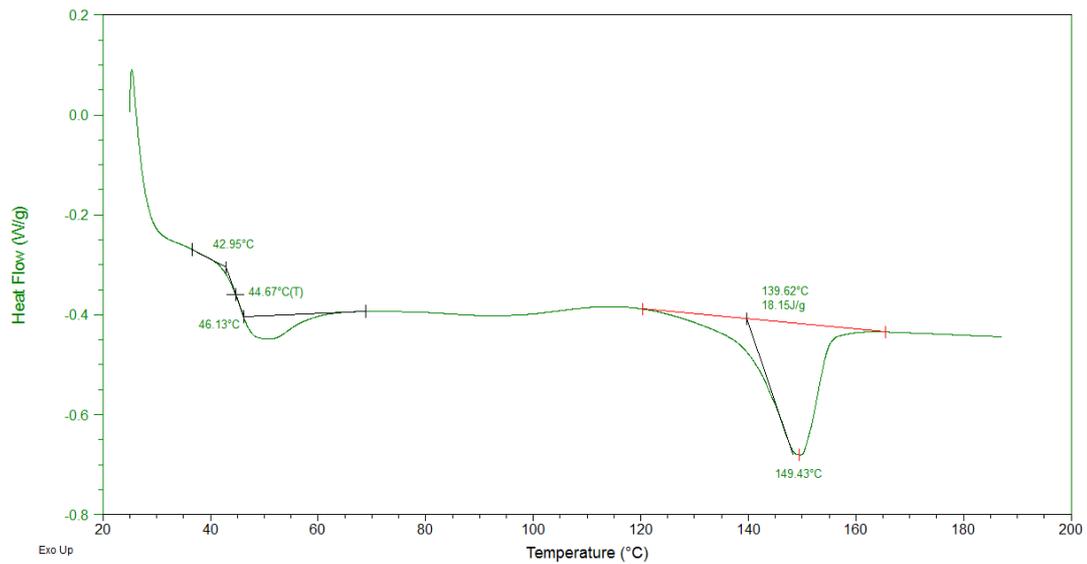


Figura 14 - Termograma do PLA 120 kDa.

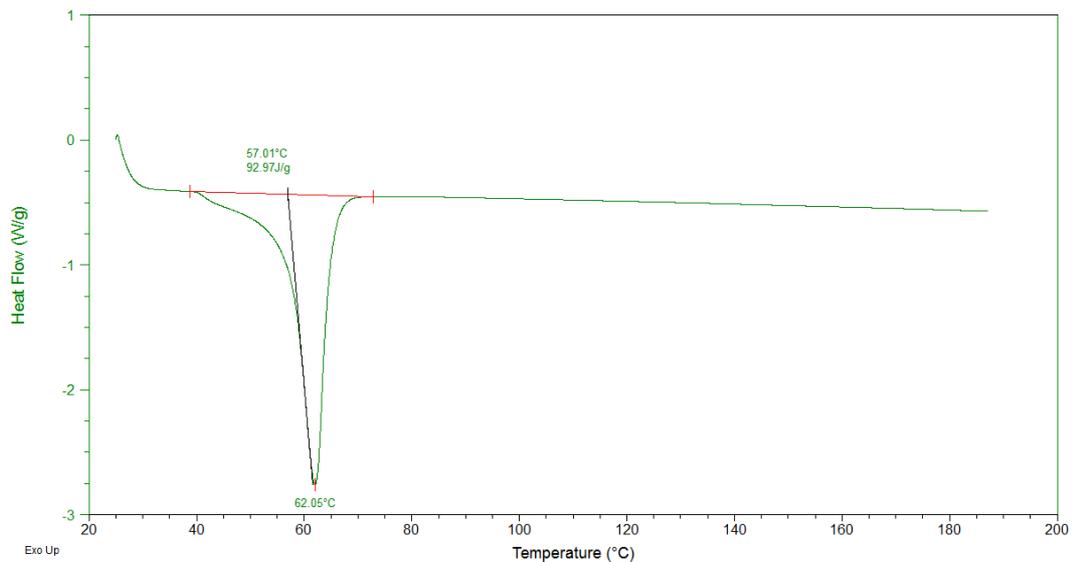


Figura 15 - Termograma do PCL 37 kDa.

Nas Figuras 14 e 15, encontram-se os termogramas obtidos para os polímeros PLA e PCL 37 kDa.

Como polímeros semi-cristalinos, os materiais compostos por PLA e PCL exibem normalmente dois grandes eventos térmicos:

- (I) Uma transição vítrea, que corresponde à transição do estado vítreo para o estado de borracha das regiões amorfas do polímero;

(2) É um fenómeno de fusão, correspondente à fusão das regiões cristalinas do polímero.

Estes dois fenómenos, e as temperaturas a que ocorrem, podem ser observados no termograma do PLA (Figura 14): a transição vítrea, caracterizada por uma mudança brusca na linha de base do termograma, ocorre a cerca de 45°C; e a fusão, caracterizada por um pico endotérmico, dá-se a 149°C.

Quanto à PCL (Figura 15), pode-se observar que a fusão ocorre aos 62°C, e a temperatura de transição vítrea ocorre a -60°C, numa gama de temperaturas não analisada.

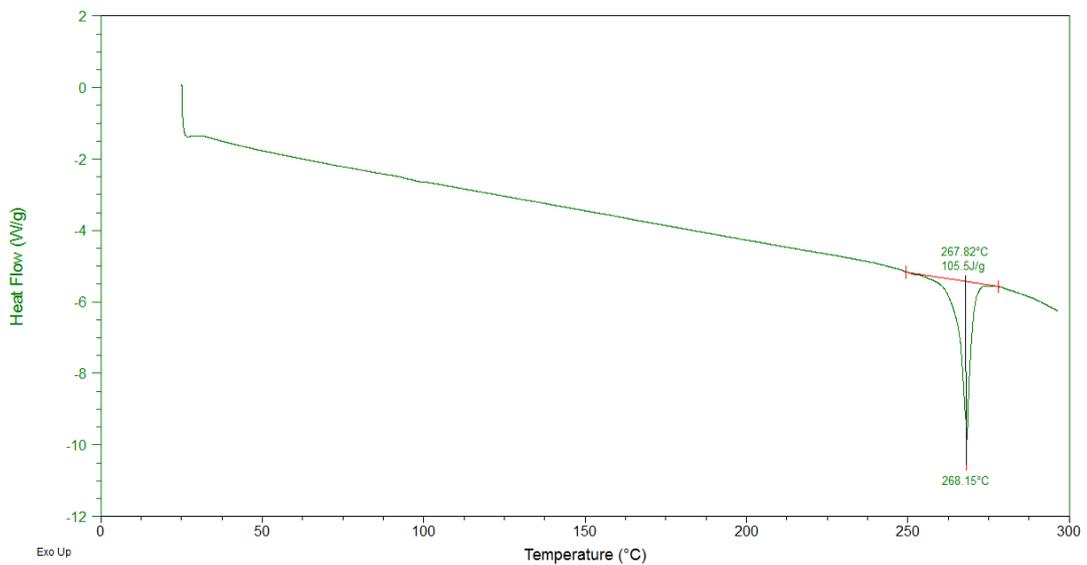


Figura 16 - Termograma da dexametasona.

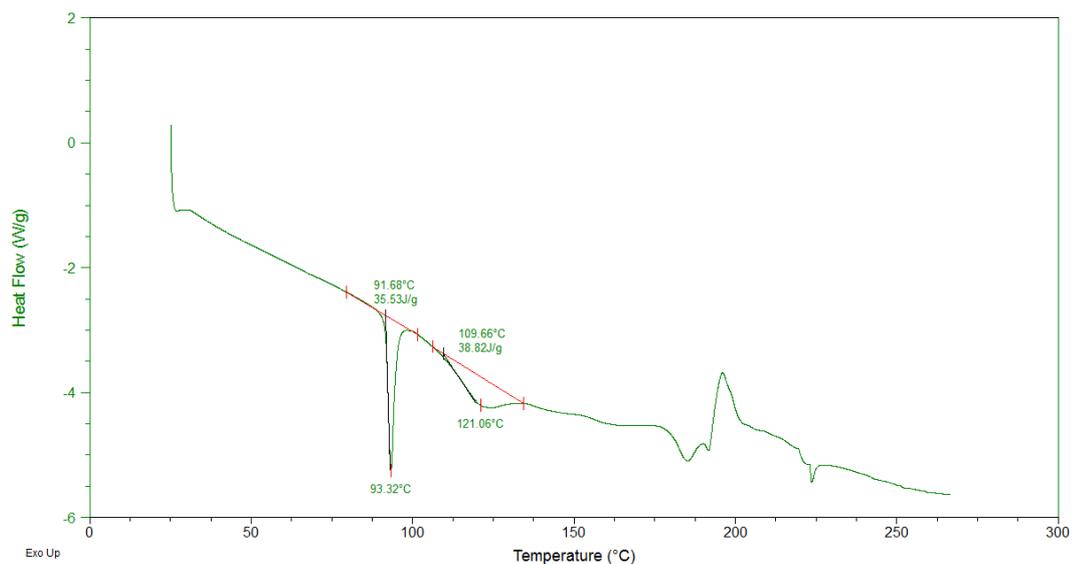


Figura 17 - Termograma do fosfato de dexametasona dissódico.

Nas Figuras 16 e 17 são apresentados os termogramas da dexametasona e do fosfato de dexametasona dissódico, respetivamente.

No termograma da dexametasona observa-se um pico exotérmico bem definido a 268°C, que corresponde à fusão. O facto deste evento térmico se encontrar muito bem definido, indica que a dexametasona se encontra num estado cristalino.

O comportamento térmico do fosfato de dexametasona dissódico é completamente distinto da dexametasona, e bastante mais complexo. É caracterizado por dois picos exotérmicos a 91 e 121°C, que podem estar associados a algum fenómeno de fusão da fase cristalina, mas também podem refletir outros fenómenos endotérmicos, tal como a desidratação de moléculas de água fortemente ligadas às moléculas de sal. Verifica-se também que a temperaturas superiores a cerca de 170°C aparecem uma série de picos endotérmicos e exotérmicos que possivelmente assinalam o início da degradação do fármaco. Este comportamento indicia que o fosfato de dexametasona dissódico é menos estável termicamente que a dexametasona, degradando-se a temperaturas mais baixas.

O comportamento térmico de alguns implantes foi também analisado.

Nas figuras seguintes são apresentados os termogramas dos implantes preparados pelos métodos de *solvent casting* e *melting*, com o PCL 37 kDa e uma F/P de 25%. São apresentados só termogramas para estes implantes, dado que estes revelaram-se ser representativos do comportamento dos restantes implantes.

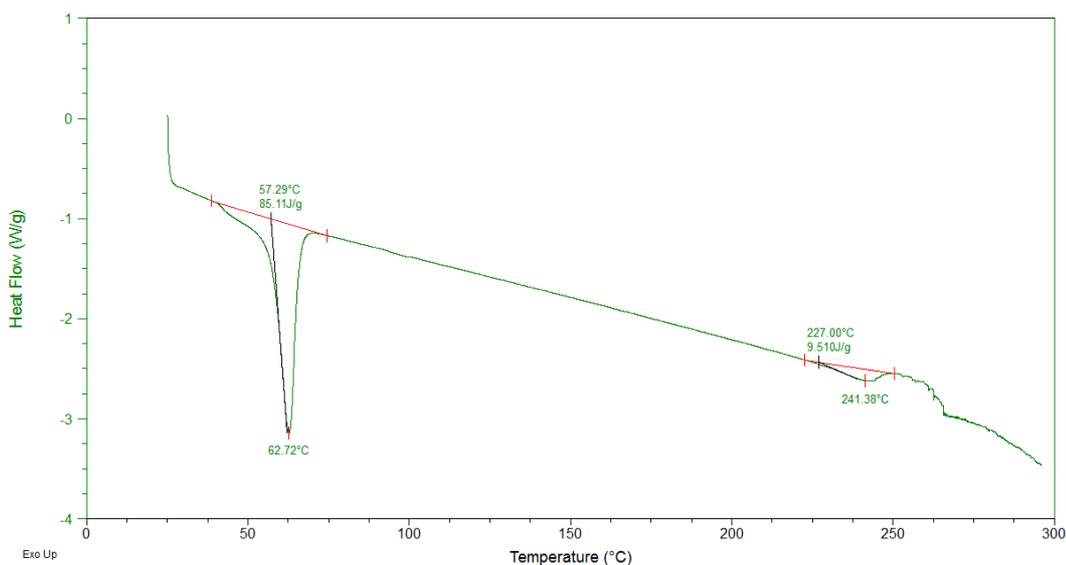


Figura 18 - Termograma do implante de dexametasona com PCL 37 kDa e 25% F/P obtido por *solvent casting*.

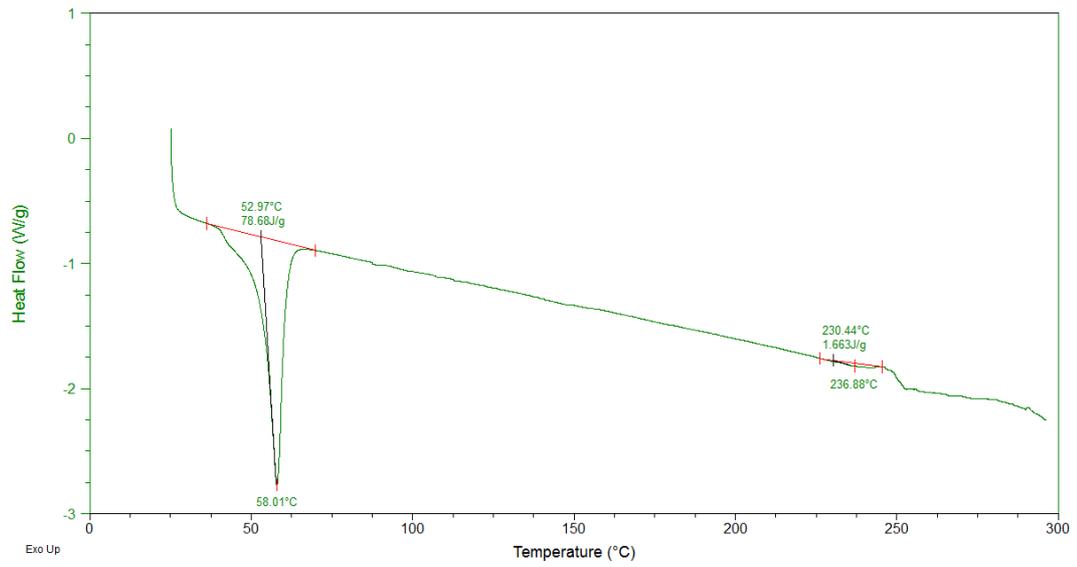


Figura 19 - Termograma do implante de dexametasona com PCL 37 kDa e 25% F/P obtido por *melting*.

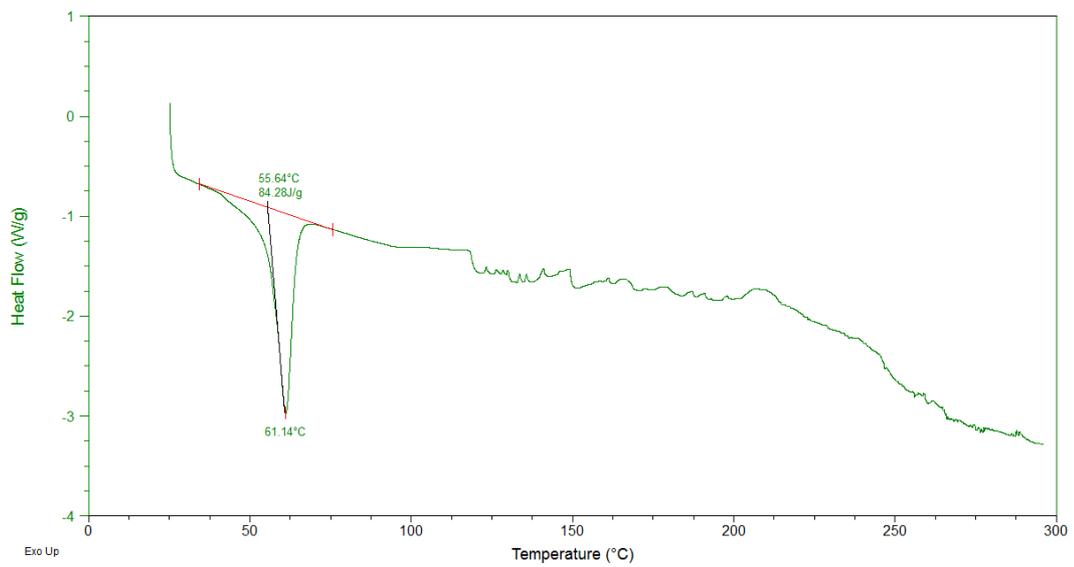


Figura 20 - Termograma do implante de fosfato de dexametasona dissódico com PCL 37 kDa e 25% F/P obtido por *solvent casting*.

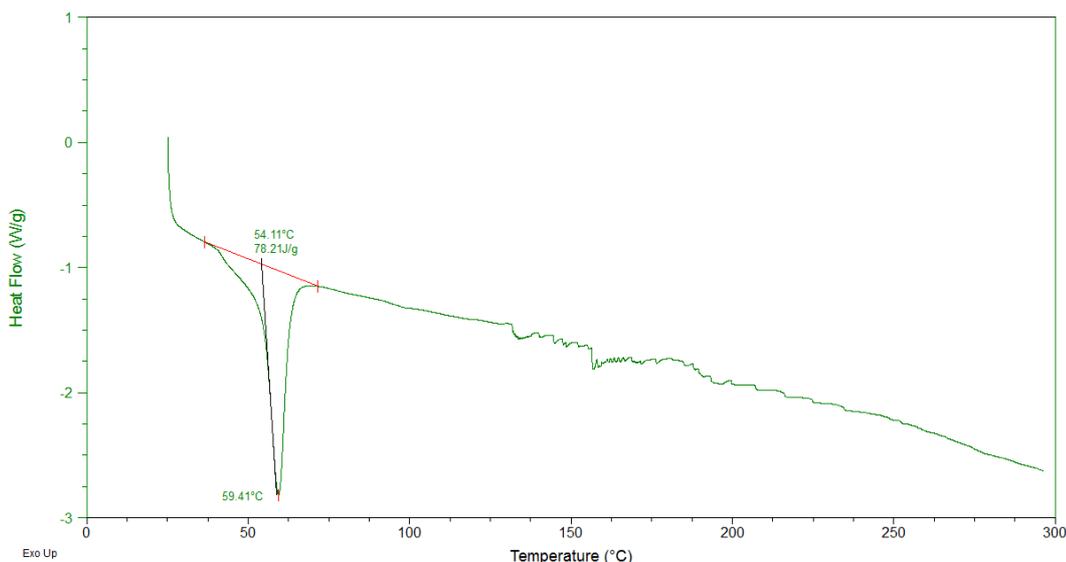


Figura 21 - Termograma do implante de fosfato de dexametasona dissódico com PCL 37 kDa e 25% F/P obtido por *melting*.

As duas primeiras figuras correspondem à dexametasona e as duas últimas ao fosfato de dexametasona dissódico. Como se pode observar, em todos os termogramas o fenómeno de fusão da PLC é bem visível e parece não sofrer grandes alterações.

Nos termogramas dos implantes com dexametasona (Figuras 18 e 19), observa-se, a temperaturas mais elevadas, uma pequena depressão endotérmica, que em princípio corresponderá à fusão da fração de fármaco incorporada no polímero que permaneceu no estado cristalino. No entanto, as temperaturas a que se dá este evento, 241°C (para o método de *solvent casting*) e 236°C (para o método de *melting*), são cerca de 30°C abaixo da temperatura de fusão observada no fármaco puro (Figura 16). Isto parece indicar que a estrutura cristalina do fármaco sofreu alguma alteração devido ao processamento e incorporação na matriz polimérica.

Relativamente aos implantes com fosfato de dexametasona dissódico (Figuras 20 e 21), observa-se, que a partir dos 150°C, os termogramas tornam-se irregulares e impossíveis de interpretar. Este padrão, semelhante ao observado para o fosfato de dexametasona dissódico puro (Figura 17), provavelmente reflete o início da degradação do fármaco no interior da matriz polimérica, o que revela, mais uma vez, que o fosfato de dexametasona dissódico é menos estável termicamente que a dexametasona.

6. CONCLUSÕES

Em todo o mundo as deficiências visuais afetam mais de 160 milhões de pessoas, das quais 37 milhões estão cegas (4).

O presente trabalho teve como objetivo criar um implante oftalmológico biodegradável de dexametasona para o tratamento de doenças do segmento posterior do olho.

Durante este trabalho foi realizado um estudo comparativo dos perfis de liberação *in vitro* de implantes oftalmológicos diferentes de dexametasona preparados por três diferentes metodologias: *melting*, *solvent casting* e *electrospinning*. Nos três métodos investigou-se o efeito de quatro variáveis nos perfis de liberação do fármaco:

- Tipo de polímero biodegradável utilizado poli(ϵ -caprolactona) e poli(ácido láctico);
- Razão mássica fármaco/polímero (3%, 10% e 25%);
- Peso molecular da poli(ϵ -caprolactona) (37 kDa e 14 kDa);
- Forma do fármaco (dexametasona e fosfato de dexametasona dissódico).

Foram concebidos vinte e dois tipos diferentes de implantes oftalmológicos de dexametasona, os quais foram submetidos a ensaios de liberação durante 2 meses.

No final, e depois de se compararem os resultados dos ensaios de liberação, concluiu-se que o/os implantes que exibem o potencial para libertar a dexametasona de forma controlada, por um maior período de tempo foi/foram os implantes:

- Obtidos pelo método de *solvent casting*. Neste método usaram-se solventes orgânicos que solubilizaram o fármaco na matriz polimérica, o que provocou uma liberação mais lenta do fármaco;
- Constituídos por PLA 120 kDa. Segundo a bibliografia, a duração e a taxa de liberação dos fármacos são afetadas pelos pesos moleculares dos polímeros que constituem o dispositivo. Quanto maior o peso molecular, menor a velocidade de degradação do dispositivo, e conseqüentemente, menor quantidade de fármaco é libertado. Neste estudo, o PLA era o polímero com peso molecular maior, e conseqüentemente todos os dispositivos constituídos por ele apresentaram os melhores resultados;
- Com o fármaco sob a forma de dexametasona. Como a dexametasona é hidrofóbica, tem mais afinidade para os polímeros que também são hidrofóbicos, fazendo com que a liberação do fármaco em meio aquoso se realiza de forma mais lenta e gradual. A caracterização térmica do fármaco por DSC revelou que o fosfato de dexametasona

dissódico é menos estável termicamente que a dexametasona, sendo esta o melhor fármaco para as formulações;

- Com razão mássica fármaco/polímero de 10%. Nos dispositivos com F/P de 10% existe menos quantidade de fármaco disponível, não existindo aglomerados de fármaco. Neste sentido, o fármaco encontra-se mais incorporado na matriz polimérica, libertando-se em menor quantidade ao longo do tempo.

7. PERSPETIVAS FUTURAS

Apesar de se terem atingido os objetivos previamente estabelecidos, para trabalho futuro seria de todo o interesse realizar novos ensaios de libertação *in vitro* durante um período de tempo mais prolongado. Também seria interessante estudar o fenómeno detetado pela análise DSC da dexametasona, dado que se verificou que a estrutura cristalina do fármaco sofreu alteração devido ao processamento e incorporação na matriz polimérica.

Seria igualmente pertinente, e antes de se realizar qualquer ensaio *in vivo*, fazerem-se ensaios de citotoxicidade de forma a estudar o efeito tóxico que os dispositivos poderiam despoletar num organismo vivo (30).

Numa fase posterior, também se poderia proceder a ensaios de libertação *in vivo*. Nestes ensaios deveriam ser usados coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus hyplus*), modelo animal estabelecido internacionalmente para este tipo de estudos em Oftalmologia. E consoante os resultados, equacionar a progressão ou não para ensaios clínicos (31, 32 e 33).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) MAIA, J. [et al] – Ocular Injectable Formulation Assessment for Oxidized Dextran-Based Hydrogels. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 1948-1955.
- (2) FIALHO, S. L.; JÚNIOR, A. S. C. – Drug Delivery Systems for the Posterior Segment of the Eye: Fundamental Basis and Applications. *Arq Bras Oftalmol.* Vol. 70, No. 1 (2007) 173-179.
- (3) AMO, E. M.; URTTI, A. – Current and future ophtalmic drug delivery systems: A shift to the posterior segment. *Drug Discovery Today.* Vol 13. No 3/4 (2008).
- (4) BIBLIOWICZ, J.; TITTLE, R. K.; GROSS, J. M. – Towards a Better Understanding of Human Eye Disease: Insights from the Zebrafish, *Danio rerio.* *Prog Mol Biol Transl Sci.* Vol. 100 (2011) 287-330.
- (5) HELLER, J. – Ocular Delivery using poly(ortho esters). *Advanced Drug Delivery Reviews.* 57 (2005) 2054.
- (6) FIALHO, S. L.; BEHAR-COHEN, F.; CUNHA, A. S. – Dexamethasone-loaded poly(ϵ -caprolactone) intravitreal implants: A pilot study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* Vol. 68 (2008) 637-638.
- (7) DASH, A. K.; CUDWORTH, G.C. – Therapeutic Applications of Implantable Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* Vol. 40 (1998) 1-12.
- (8) FINAMOR, L. P.; JR., F. F.; MUCCIOLI, C. – Corticosterapia e Uveítes. *Arq Bras Oftalmol.* Vol. 65 (2002) 483-484.
- (9) Osswald, W; Guimarães, S. – *Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas.* 4ª Edição. Porto: Porto editora, 2004. ISBN 972-0-06030-1.

- (10) CUNNINGHAM, M. A.; EDELMAN, J. L.; KAUSHAL, S. – Intravitreal Steroids for Macular Edema: The Past, the Present, and the Future. Vol. 53, No. 2 (2008) 139-149.
- (11) DUVALL, B.; KERSHNER, R. – Ophthalmic Medications and Pharmacology. Second Edition. New Jersey: Slack Incorporated, 2006. ISBN 978-1-55642-750-3. 54-58.
- (12) RUPENTHAL, I. D.; GREEN, C. R.; ALANY, R. G. – Comparison of ion-activated in situ gelling systems for ocular drug delivery. Part I: Physicochemical characterization and in vitro release. International Journal of Pharmaceutics. 411 (2011) 69-77.
- (13) YASUKAWA, T. [et al] – Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. Progress in Retinal and Eye Research. Vol. 23 (2004) 254, 256-259.
- (14) GAUDANA, R. [et al] – Ocular Drug Delivery. The AAPS Journal. Vol. 12, No. 3 (2010) 348-360.
- (15) YASUKAWA, T. [et al] – Biodegradable sclera plugs for vitreoretinal drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews. Vol. 52 (2001) 26-27.
- (16) KIM, Y. [et al] – A novel design of one-side coated biodegradable intrascleral implant for the sustained release of triamcinolone acetonide. European Journal of Biopharmaceutics. 70 (2008) 179.
- (17) OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. – Polymers in Drug Delivery Systems. Revista Eletrónica de Farmácia. Vol 3 (2006) 29.
- (18) BOURGES, J. L. [et al] – Intraocular implants for extended drug delivery: Therapeutic applications. Advanced Drug Delivery Reviews. Vol. 58 (2006) 1183-1185.
- (19) BAJER, K. [et al] – Properties of poly (lactic acid) / Ecoflex rigid foil sheets applied in thermoforming process. Polimery. Vol. 55, No. 7-8 (2010) 591.
- (20) VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. – Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. Polímeros: Ciência e Tecnologia. Vol. 20, No 1 (2010) 51-64.

- (21) HUH, K. M.; CHO, Y. W.; PARK, K. – PLGA - PEG Block Copolymers for Drug Formulations. *Drug Development & Deliver.* Vol. 3, No. 5 (2003).
- (22) HAESSLEIN, A. [et al] – Matrix Modifications Modulate Ophthalmic Drug Delivery From Photo-Cross-Linked Poly(propylene Fumarate) – Based Networks. *Journal of Biomaterials Science* 20 (2009) 50.
- (23) TAVARES, M. V. N. – Drug loading strategies and processing of polymer blends for intraocular controlled drug release application. *Universidade de Coimbra.* (2011) 34.
- (24) CHORILLI, M. [et al] – Estudo de perfil de dissolução dos medicamentos de referência, genérico e similar contendo cefalexina na forma farmacêutica cápsula. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences.* 31 (2010) 69.
- (25) MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. – A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de libertação modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* Vol. 36, N° 4 (2002) 375.
- (26) TANG, M.; LI, Y.; HUANG, D. – An Intraocular Lens Power Calculation Formula Based on Optical Coherence Tomography: A Pilot Study. *J Refract Surg.* Vol. 26, No. 6 (2010) 430-443.
- (27) OKABE, J. [et al] – Biodegradable Intrascleral Implant for Sustained Intraocular Delivery of Betamethasone Phosphate. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* Vol. 44, No. 2 (2003) 740-745.
- (28) WIESE, M. – DSC Detection of Polymorphism in Pharmaceutical Anhydrous Dexamethasone Acetate. *TA Instruments.* Vol. 302 (2009) 1-2.
- (29) VACANTI, N. M. [et al] – Localized Delivery of Dexamethasone from Electrospun Fibers Reduces the Foreign Body Response. *Biomacromolecules.* 13 (2012) 3032.
- (30) DERWENT, J. J. K.; MIELER, W. F. – Thermoresponsive hydrogels as a new ocular drug delivery platform to the posterior segment of the eye. *Trans Am Ophtalmol Soc.* Vol 106 (2008) 207.

(31) NAKAMURA, K. M.; DIEHL, N. N.; MOHNEY, B. G. – Incidence, Ocular Findings and Systemic Associations of Ocular Coloboma: A Population-Based Study. *Arch Ophthalmol.* Vol. 129, No. 1 (2011) 69-74.

(32) RUPENTHAL, I. D.; GREEN, C. R.; ALANY, R. G. – Comparison of ion-activated in situ gelling systems for ocular drug delivery. Part 2: Precorneal retention and in vivo pharmacodynamic study. *International Journal of Pharmaceutics.* Vol. 411 (2011) 78-85.

(33) YASUKAWA, T. [et al] – Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 57 (2005) 2040-2043.