

GISELE RODRIGUES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES INTRA-
OCULARES CONSTITUÍDOS DE POLIURETANOS
BIODEGRADÁVEIS E ACETATO DE DEXAMETASONA**

**BELO HORIZONTE
FACULDADE DE FARMÁCIA – UFMG
2009**

GISELE RODRIGUES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE IMPLANTES INTRA-
OCULARES CONSTITUÍDOS DE POLIURETANOS
BIODEGRADÁVEIS E ACETATO DE DEXAMETASONA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Lambert Oréfice

**BELO HORIZONTE
FACULDADE DE FARMÁCIA – UFMG
2009**

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago, a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Fernando Pessoa

Dedico este trabalho

*aos meus pais, Lourdes e Geraldo,
pelo amor incondicional, incentivo e apoio*

*aos meus irmãos, Leonardo e Fabinho,
pelo companheirismo e amizade*

*ao Marcílio,
pelo amor incondicional e carinho*

*ao Armando e ao Rodrigo,
pela valiosa contribuição em todas as
etapas do desenvolvimento deste
trabalho*

AGRADECIMENTOS

Meu Deus, eu te agradeço porque Tu és a sombra fresca que me cobres durante todos os dias. Eu te agradeço porque - invisível, carinhoso, envolvente - Tu cuidas de mim em todas as horas.

Ao professor Dr. Armando da Silva Cunha Junior por ter me presenteado com as idéias desta tese, pela orientação e pelo privilégio de ter a sua amizade e confiança.

Ao professor Dr. Rodrigo Lambert Oréfice pela orientação, oportunidade de convivência e por sempre ser extremamente atencioso.

À professora Dra. Francine Behar-Cohen pelo profissionalismo, competência e por ter me recebido em seu laboratório.

À professora Dra. Eliane Ayres pela generosidade em me ensinar a preparar e fornecer os polímeros usados neste trabalho.

À professora Dra. Sandra Aparecida Moura pelo incentivo, ajuda e amizade.

Ao professor Dr. Gerson Antônio Pianetti pela confiança.

À Juliana Saliba pelos conselhos, apoio e amizade.

À Brigitte Goldenberg pelos conselhos, apoio e por sempre ser muito amável.

Ao Diego e à Laurinha pela ajuda constante, paciência e dedicação ao trabalho.

Meus sinceros agradecimentos a todos os outros, aqui e ali, que tornaram este trabalho possível.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
RESUMO	16
ABSTRACT	18
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 Anatomia ocular	25
2.1.1 Cavidade orbital e pálpebras	25
2.1.2 Bulbo ocular	25
2.1.3 Córnea	26
2.1.4 Esclera	27
2.1.5 Lente	27
2.1.6 Íris e corpo ciliar	27
2.1.7 Coróide	28
2.1.8 Retina	28
2.1.9 Corpo vítreo	31
2.2 Implantes intra-oculares	31
2.2.1 Implantes intra-oculares não-biodegradáveis	32
2.2.1.1 Implantes intra-oculares não-biodegradáveis para o tratamento da retinite por CMV	32
2.2.1.2 Implantes intra-oculares não-biodegradáveis para o tratamento das uveítes não infecciosas	34
2.2.1.3 Implantes intra-oculares não-biodegradáveis para o tratamento das doenças relacionadas à retinopatia diabética	36
2.2.1.4 Implantes intra-oculares não biodegradáveis contendo células para o tratamento das desordens da retina	37
2.2.2 Implantes intra-oculares biodegradáveis	38
2.2.2.1 Implantes intra-oculares biodegradáveis para o tratamento da retinite por citomegalovírus	42
2.2.2.2 Implantes intra-oculares biodegradáveis para o tratamento das uveítes	43
2.2.2.3 Implantes intra-oculares biodegradáveis para o tratamento da	46

vitreoretinopatia proliferativa	
2.3 Síntese dos poliuretanos	49
2.4 Poliuretanos aplicados na oftalmologia	53
3 OBJETIVOS	61
4 MATERIAIS	63
5 MÉTODOS	66
5.1 Desenvolvimento e caracterização dos implantes à base de poliuretanos biodegradáveis e ACT	67
5.1.1 Síntese das dispersões aquosas de poliuretanos (PUD5 e PUD6)	67
5.1.2 Incorporação do acetato de dexametasona (ACT)	69
5.1.3 Formação dos implantes de poliuretanos e acetato de dexametasona	70
5.1.4 Caracterização dos implantes de poliuretanos e acetato de dexametasona	71
5.1.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	71
5.1.4.2 Difração de raios-X (XRD)	71
5.1.4.3 Espalhamento de raios-X em baixo ângulo (SAXS)	71
5.2 Estudo de degradação <i>in vitro</i> dos poliuretanos	71
5.2.1 Degradação <i>in vitro</i> dos poliuretanos	71
5.2.2 Caracterização dos poliuretanos degradados	72
5.2.3 Teste de citotoxicidade dos produtos de degradação	72
5.3 Estudo de liberação <i>in vitro</i> do acetato de dexametasona a partir dos implantes	72
5.4 Estudo de biocompatibilidade <i>in vitro</i> dos poliuretanos	73
5.4.1 Cultura de células ARPE-19 sobre os poliuretanos	73
5.4.2 Adesão celular sobre os poliuretanos	73
5.4.3 Proliferação celular sobre os poliuretanos	74
5.4.4 Microscopia eletrônica de varredura	74
5.4.5 Imunofluorescência	75
5.5 Estudo de biocompatibilidade <i>in vivo</i> dos poliuretanos	75
5.5.1 Animais	75
5.5.2 Implantação dos poliuretanos no espaço subretiniano e corpo vítreo	76
5.5.3 Avaliação histopatológica	76
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
6.1 Desenvolvimento e caracterização dos implantes à base de poliuretanos	79

biodegradáveis e ACT	
6.2 Estudo de degradação <i>in vitro</i> dos poliuretanos	86
6.3 Estudo de liberação <i>in vitro</i> do acetato de dexametasona a partir dos implantes	97
6.4 Estudo de biocompatibilidade <i>in vitro</i> dos poliuretanos	98
6.5 Estudo de biocompatibilidade <i>in vivo</i> dos poliuretanos	105
7 CONCLUSÕES	109
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
9 ANEXOS	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Corte sagital vertical do olho humano adulto.	26
Figura 2 – Corte histológico da retina humana. As dez camadas da retina são: camada pigmentar (A), camada dos segmentos externo e interno (cones e bastonetes) (B), camada limitante externa (C), camada nuclear externa (D), camada plexiforme externa (E), camada nuclear interna (F), camada plexiforme interna (G), camada ganglionar (H), camada de neurofibras (I) camada limitante interna (J).	29
Figura 3 – Formação da ligação uretano.	50
Figura 4 – Reações dos isocianatos.	51
Figura 5 – Diagrama esquemático das micelas dos pré-polímeros catiônicos (a) e aniônicos (b) dispersas em água.	53
Figura 6 – Queratoprótese feita de poliuretano.	54
Figura 7 – Fotografias das etapas 1 a 4 de inserção e retirada do dispositivo dilatador da pupila feito de poliuretano. Etapa 1 - a extremidade do dispositivo é introduzida na câmara anterior por meio de uma incisão corneana. Etapa 2 - um instrumento é introduzido na incisão corneana para auxiliar o posicionamento da parte superior do dispositivo. Etapa 3 - a esfíncter da íris é completamente capturada pelo dispositivo, e conseqüentemente, a pupila se dilata. Etapa 4 - o dispositivo é retirado e a pupila retorna ao seu diâmetro original.	56
Figura 8 – Hidrólise da ligação éster gerando ácido carboxílico e álcool.	57
Figura 9 – Hidrólise da ligação uretano gerando álcool, amina e dióxido de carbono.	57
Figura 10 – Representação esquemática da síntese das dispersões aquosas de poliuretanos (PUD5 e PUD6).	70
Figura 11 – Implantes constituídos dos poliuretanos [(A) PUD5 e (B) PUD6] e de acetato de dexametasona.	70
Figura 12 – Espectros FTIR do PUD5 puro (12-a), ACT puro (12-b), PUD5 contendo ACT (12-c) e subtração espectral entre PUD5 contendo ACT e PUD5 puro (12-d).	79
Figura 13 - Espectros FTIR do PUD6 puro (13-a), ACT puro (13-b), PUD6 contendo ACT (13-c).	80
Figura 14 – Padrões XRD para PUD6 puro (14-a), PUD6 contendo ACT (14-b) e ACT puro (14-c).	81

Figura 15 – Curvas SAXS para PUD5 puro (15-a), PUD5 contendo ACT (15-b), PUD6 puro (15-c) e PUD6 contendo ACT (15-d).	84
Figura 16 – Dados SAXS processados por tratamento matemático para aumentar a resolução dos picos de espalhamento pequenos. No topo da figura: exemplo de como os dados SAXS foram explorados neste trabalho para aumentar a resolução de picos de espalhamento pequenos: (16-a) dados SAXS originais; (16-b) ajuste de Guinier dos dados originais; (16-c) resultado da subtração entre os dados originais e ajuste Guinier.	84
Figura 17 – Invariante Q extraída dos dados de espalhamento SAXS para PUD5 e PUD6 contendo ACT.	85
Figura 18 - Padrões XRD para PUD5 não degradado (PUD5_0) (18-a), PUD5 submetido à biodegradação por 4 meses (18-b) (PUD5_4). O padrão XRD para a PCL pura (18-c) foi incluído como referência.	86
Figura 19 - Padrões XRD para PUD6 não degradado (PUD6_0) (19-a), PUD6 submetido à biodegradação por 4 meses (19-b) (PUD6_4). O padrão XRD para a PCL pura (19-c) foi incluído como referência.	87
Figura 20 - Curvas SAXS para PUD5 não degradado (PUD5_0) (20-a) e PUD5 submetido a 4 meses de biodegradação (PUD5_4) (20-b).	88
Figura 21 - Curvas SAXS para PUD6 não degradado (PUD6_0) (21-a) e PUD6 submetido a 4 meses de biodegradação (PUD6_4) (21-b).	88
Figura 22 – Porcentagem de perda de massa do PUD5 e PUD6 em condições fisiológicas simuladas (tampão fosfato pH 7,4, temperatura de 37 °C e agitação de 30 rpm). Os dados obtidos representam a média ± desvio padrão (n = 3 para cada poliuretano).	89
Figura 23 - Espectros FTIR do PUD5 não degradado (PUD5_0) (23-a) e do PUD5 submetido à biodegradação por 4 meses (PUD5_4) (23-b).	91
Figura 24 - Espectros FTIR do PUD6 não degradado (PUD6_0) (24-a) e do PUD6 submetido à biodegradação por 4 meses (PUD6_4) (24-b).	91
Figura 25 – Principais bandas de absorção FTIR observadas para os poliuretanos (PUD5_0 e PUD6_0) não degradados e submetidos à biodegradação (PUD5_4 e PUD6_4).	92
Figura 26 – Absorvâncias normalizadas das principais bandas de absorção FTIR do PUD5 e PUD6 antes (PUD5_0 e PUD6_0) e após a biodegradação (PUD5_4 e PUD6_4).	94
Figura 27 – Deconvolução da região espectral da carbonila (C=O): PUD5_0 (antes da biodegradação) e PUD5_4 (após biodegradação).	94
Figura 28 – Região espectral C-O.	95

- Figura 29 – Porcentagem de células ARPE-19 viáveis incubadas numa mistura de solução de produtos de degradação dos poliuretanos PUD5 e PUD6, coletada após 4 meses de degradação dos polímeros, e meio de cultura, nas proporções de 1:10 e 3:10 (n = 5 para cada PUD e controle, para cada proporção). A viabilidade das células incubadas no meio de cultura contendo os produtos de degradação foi expressa em relação à viabilidade das células incubadas no meio de cultura sem os produtos de degradação (controle), fixada em 100%. 96
- Figura 30 – Perfis de liberação acumulada *in vitro* do acetato de dexametasona (ACT) a partir de PUD5 e PUD6. Os dados representam média \pm desvio padrão (n = 4 para cada poliuretano). 98
- Figura 31 – Adesão das células ARPE-19 nas superfícies PUD5 e PUD6 após 8 horas em cultura. Os dados foram expressos como sendo a porcentagem de células aderidas em relação ao controle (n = 15 para cada poliuretano e para o controle). As porcentagens de células aderidas sobre os poliuretanos não apresentaram diferença estatística significativa (teste t de Student - $p < 0,05$) após 8 horas em cultura. As porcentagens de células aderidas sobre o controle e poliuretanos apresentaram diferença estatística significativa (ANOVA - $p < 0,05$) após 8 horas de incubação. 99
- Figura 32 – Cinética de proliferação das células ARPE-19 nas superfícies controle, PUD5 e PUD6. Os dados foram expressos como sendo a média dos núcleos \pm desvio padrão em cada tempo (n = 15 para cada poliuretano e controle, para cada dia) ($p < 0.05$). 100
- Figura 33 – Microscopia eletrônica de varredura de pequenos aglomerados de células ARPE-19 arredondadas sobre as superfícies de PUD5 (A) e PUD6 (C), após 1 dia em cultura. Ampliação das micrografias: células com microvilosidades apicais sobre PUD5 (B), e células alongadas sobre PUD6 (D) com projeções PUD6 (E). 102
- Figura 34 – Micrografias das células ARPE-19 nas superfícies do controle (A), PUD5 (C) e PUD6 (E) demonstrando a marcação das fibras de actina com faloidina FITC após 7 em cultura. Micrografias (B), (D) e (F) representam a fusão das fibras de actina e dos núcleos, marcados com iodeto de propídeo. Barra - 100 μm . 103
- Figura 35 – Zônulas de oclusão formadas entre as células ARPE-19 adjacentes nas superfícies do controle (A), PUD5 (B) e PUD6 (C) após 15 dias em cultura. As zônulas de oclusão foram reveladas devido à marcação da ocludina (cor verde). Barra - 500 μm . 105
- Figura 36 – Observação macroscópica do PUD5 (A) e PUD6 (B) implantados por 15 dias no espaço subretiniano de olhos de ratos. Os filmes de poliuretanos se apresentam na forma triangular e cor branca. Corte histológico do olho mostrando que PUD5 (C) (4 X) e PUD6 (D) (20 X) se encontram no espaço subretiniano: os poliuretanos estão degradados devido ao processo de fixação dos bulbos oculares; os círculos (O) indicam as camadas da retina sobre os poliuretanos. Cortes histológicos da retina localizada sobre os poliuretanos PUD5 (E) e PUD6 (F) (60 106

X). A arquitetura da retina foi bem preservada, mas observaram-se pequenas áreas de descontinuidade das camadas celulares da retina [PUD6 (F)].

Figura 37 – Cortes histológicos das camadas da retina após a implantação do PUD5 (A) e PUD6 (C) na cavidade vítrea de olhos de ratos (40 X) e ampliação dos mesmos: PUD5 (B) e PUD6 (D) (80 X). Os cortes histológicos foram obtidos 15 dias após a introdução dos poliuretanos e demonstram a integridade da arquitetura das camadas da retina. 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulação (% em massa) das dispersões aquosas de poliuretano.	69
Tabela 2 – Atribuições das bandas FTIR para PUD5 e PUD6.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluoruracila
ACT	Acetato de dexametasona
AF	Acetato de fluocinolona
ARPE-19	Células epiteliais pigmentares da retina
at-RA	All-trans ácido retinóico
CMV	Citomegalovírus
CHP	Cis-hidroxi prolina
CNTF	Fator neurotrófico ciliar
CNTF- α	Receptor α do fator neurotrófico ciliar
CsA	Ciclosporina A
DBTDL	Di-butil di-laurato de estanho
DMEM	Meio de cultura – Dubelcco's modified Eagle Medium
DMPA	Ácido dimetilpropiônico
EVA	Poli(etileno-co-acetato de vinila)
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier – Reflexão Total Atenuada
HAART	Terapia anti-retroviral altamente ativa
HDI	Hexametileno diisocianato
H ₂ MDI	4,4'-diciclohexilmetano diisocianato
HZ	Hidrazina
IOP	Pressão intra-ocular
IPDI	Isoforona diisocianato
MM	Massa molecular
MTT	Dosagem colorimétrica baseada na conversão mitocondrial do sal de tetrazólio
PBS	Tampão fosfato pH 7,4
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PEG	Poli(etileno glicol)
PGA	Poli(glicólico)
PGLC	Copolímero glicólico-co-láctico-co-caprolactona
PLA	Poli(D,L-láctico)
PLGA	Poli(D,L-láctico-glicólico)
PMMA	Polimetil metacrilato
POE	Poli(orto-éster)
PUD5	Dispersão aquosa do poliuretano 5
PUD6	Dispersão aquosa do poliuretano 6
PVA	Álcool polivinílico
PVR	Vitreoretinopatia proliferativa
REP	Células epiteliais pigmentares da retina

SAXS	Espalhamento de raios-X em baixo ângulo
SFB	Soro fetal bovino
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
TEA	Trietilamina
t-PA	Ativador plasminogênio tecidual
XRD	Difração de raios-X

RESUMO

O tratamento de doenças do segmento posterior do olho é limitado pela dificuldade no transporte de doses efetivas de fármacos para o vítreo, retina e coróide. Apesar dos fármacos administrados por via sistêmica atingirem o segmento posterior do olho, as barreiras oculares naturais dificultam a absorção, e doses elevadas dos fármacos são requeridas para a manutenção da concentração dos fármacos em níveis terapêuticos eficazes dentro do olho. Injeções intravítreas são capazes de transportar os fármacos para o segmento posterior do olho, mas é uma técnica invasiva, pouco tolerada pelos pacientes e apresenta riscos de infecções oculares e danos aos tecidos. Visando a obtenção de níveis terapêuticos adequados de fármacos no segmento posterior do olho por longos períodos, sistemas de liberação poliméricos implantados diretamente no vítreo estão sendo investigados para o tratamento de várias doenças vítreo-retinianas. Neste trabalho, poliuretanos denominados PUD5 e PUD6, derivados de poli(ϵ -caprolactona) e poli(etileno glicol), foram produzidos baseados em dispersões aquosas destes polímeros, e o acetato de dexametasona foi incorporado às dispersões aquosas destes poliuretanos. A partir desta incorporação, implantes constituídos de poliuretanos e acetato de dexametasona foram desenvolvidos e explorados como dispositivos intra-oculares de liberação controlada do fármaco, destinados ao tratamento de doenças inflamatórias graves que acometem o segmento posterior do olho. Estes implantes foram caracterizados por FTIR, XRD e SAXS, e também foram submetidos ao estudo de liberação *in vitro* do acetato de dexametasona. Adicionalmente, os filmes de poliuretanos puros foram submetidos aos estudos de biodegradação *in vitro* e biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*. As diferentes técnicas de caracterização revelaram que o acetato de dexametasona manteve sua integridade química após dispersão nas matrizes poliméricas, e que o mesmo conduziu a uma nova morfologia do PUD5, enquanto que alterações significativas não foram detectadas na nanoestrutura do PUD6. Os sistemas poliméricos propiciaram a liberação controlada do acetato de dexametasona por um período prolongado, sem que picos de liberação do fármaco fossem detectados, representando uma vantagem dos sistemas. O processo de biodegradação dos poliuretanos conduziu à perda de massa e à formação de cristalitos, devido à hidrólise das ligações éster da poli(caprolactona) presentes nos segmentos macios destes biomateriais. Os segmentos rígidos, formados pelas ligações uretano, foram preservados durante a biodegradação. Além disso, células ARPE-19 incubadas em meio de cultura contendo os produtos de degradação de PUD5 e PUD6 apresentaram viabilidade, indicando que os

mesmos não apresentaram efeitos citotóxicos significantes. Os poliuretanos demonstraram biocompatibilidade *in vitro*, uma vez que as células ARPE-19 foram capazes de aderir, migrar, proliferar e formar uma monocamada altamente organizada e funcional sobre as superfícies poliméricas. Os poliuretanos também demonstraram biocompatibilidade *in vivo*, uma vez que sinais de inflamação e desorganização dos tecidos oculares não foram detectados após implantação de PUD5 e PUD6 no espaço subretiniano e vítreo de olhos de ratos. Portanto, PUD5 e PUD6, poliuretanos biodegradáveis e biocompatíveis, possibilitaram o desenvolvimento de implantes intra-oculares de liberação controlada de acetato de dexametasona, destinados ao tratamento de doenças oculares que atingem o segmento posterior do olho.

Palavras-chaves: poliuretano, acetato de dexametasona, implante intra-ocular, sistema de liberação controlada de fármacos, segmento posterior do olho

ABSTRACT

The treatment of diseases of the posterior segment of the eye is limited by the difficulty in delivering effective doses of the drug to the vitreous, retina and choroid. Despite of systemic drug administration reaches the posterior segment of the eye, the natural ocular barriers make difficult the absorption, and high doses of the drug are required to maintain the therapeutic range of the drug. Intravitreal injection can deliver drugs to the posterior segment of the eye, but it is an invasive technique and shows risk of infections and damages in ocular tissues. Aiming to reach adequate therapeutic range of the drugs in the posterior segment of the eye for long periods, controlled drug release systems implanted in the vitreous have been investigated for the treatment of several ocular diseases. In this study, polyurethanes, PUD5 and PUD6, derived from poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol), were synthesized based on aqueous dispersion of these polymers, and dexamethasone acetate was incorporated into the aqueous dispersion of the polyurethanes. Implants constituted by biodegradable polyurethanes and dexamethasone acetate were developed and explored as intraocular devices for controlled drug delivery for the treatment of posterior segment diseases of the eye. The implants were characterized by FTIR, XRD and SAXS and were submitted to the *in vitro* drug release study. Additionally, the pure polyurethane films were submitted to *in vitro* biodegradation and *in vitro* and *in vivo* biocompatibility studies. The different techniques of characterization revealed that dexamethasone acetate preserved its chemical integrity after incorporation into the polymeric matrices, and the drug led to the new morphology of PUD5, while alterations were not detected in the nanostructure of PUD6. The polymeric systems provided controlled dexamethasone acetate release for a long period, and it was not observed liberation burst of the drug, which represented an advantage of these systems. The biodegradation process of the polyurethanes led to the mass loss and formation of crystallites, due to the hydrolysis of ester bonds present in poly(caprolactone) segments. The hard segments, based on urethane bonds, were preserved during the biodegradation. Moreover, APRE-19 cells cultured with medium containing the degradation products from the polyurethanes showed viability, indicating their non-cytotoxic effect. The polyurethanes showed *in vitro* biocompatibility, since ARPE-19 cells were able to adhere, migrate, proliferate and form an organized and functional layer onto the polymeric surfaces. The polyurethanes showed also *in vivo* biocompatibility, since no inflammatory response and disorganization of the ocular tissues were observed after implantation of PUD5 and PUD6 in

the subretinal space and vitreous of mices' eyes. Therefore, PUD5 and PUD6, biodegradable and biocompatible polyurethanes, provided the development of intraocular implants for the controlled release of dexamethasone acetate, applied to the treatment of diseases of the posterior segment of the eye.

Keywords: polyurethane, dexamethasone acetate, intraocular implant, controlled drug release systems, posterior segment of the eye

1 INTRODUÇÃO

As retinites, uveítes e retinopatias são doenças oculares graves que acometem o segmento posterior do olho e que frequentemente conduzem à deficiência visual ou à perda completa da visão. O tratamento destas doenças representa um desafio, uma vez que o olho apresenta barreiras naturais, constituídas pelo epitélio e endotélio da córnea, epitélio da retina e endotélio vascular da retina, que dificultam a penetração dos fármacos no interior do bulbo do olho.

Geralmente o tratamento destas doenças oculares é realizado por meio das injeções subconjuntivais e intravítreas de fármacos ou por administração sistêmica. As injeções subconjuntivais apresentam a desvantagem de não possibilitarem o controle da concentração do fármaco que atinge o vítreo. Os fármacos administrados pela via sistêmica somente poderão atingir o segmento posterior do olho se ultrapassarem, primeiramente, a barreira hemato-retiniana. Como apenas uma pequena quantidade de alguns fármacos ultrapassa esta barreira, várias doses sistêmicas são requeridas para a manutenção da concentração dos fármacos em níveis terapêuticos eficazes dentro do olho. Esta abordagem não é viável para fármacos potentes e com índice terapêutico estreito, pois podem provocar sérios efeitos adversos e tóxicos ao paciente (HUGHES et al., 2005; YASUKAWA et al., 2001, AMO e URTTI, 2008). A utilização da via intravítrea minimiza a ocorrência de efeitos sistêmicos adversos. Porém, a rápida circulação sanguínea na coróide e na retina promove a diminuição da meia-vida dos fármacos, reduzindo, rapidamente, suas concentrações a níveis subterapêuticos. Para que os níveis se mantenham dentro da faixa terapêutica, são necessárias injeções repetidas, as quais podem causar desconforto para o paciente e conseqüentemente, a descontinuidade da terapia, além de hemorragia vítrea, endoftalmite, catarata e descolamento da retina (OGURA et al., 2001; YASUKAWA et al., 2001). O aumento da dose do medicamento poderia prolongar a eficácia das injeções individuais, mas também poderia provocar picos de concentração do fármaco dentro do olho, expondo o paciente aos efeitos tóxicos indesejáveis.

Os implantes intra-oculares representam método alternativo viável para o alcance de níveis terapêuticos de fármacos no interior do olho. Os implantes intra-oculares são vantajosos, pois inseridos após a barreira hemato-retiniana, liberam o fármaco diretamente no local de ação; de forma controlada e por tempo prolongado (o que é ideal para pacientes com doenças oculares crônicas); reduzindo a possibilidade de efeitos adversos que freqüentemente estão

associados com a administração de fármacos pela via sistêmica (BOURGES et al., 2006; YASUKAWA et al., 2005).

Os implantes intra-oculares podem ser preparados a partir de diferentes polímeros reconhecidamente biocompatíveis, que podem ser não-biodegradáveis ou biodegradáveis (DASH e CUDWORTH II, 1998). Os implantes intra-oculares não-biodegradáveis apresentam a vantagem de controlar a liberação do fármaco, numa cinética previsível, por períodos prolongados. Porém, ao contrário dos implantes intra-oculares biodegradáveis, estes sistemas devem ser removidos cirurgicamente do olho após a liberação total do fármaco, o que representa risco para o paciente e é uma desvantagem marcante dos implantes não-biodegradáveis. Por esta razão, os polímeros biodegradáveis naturais e sintéticos têm sido amplamente investigados para o desenvolvimento destes dispositivos de implantação intra-ocular (JAIN et al., 2000).

Poliuretanos especialmente projetados podem ser degradados por hidrólise dos grupos polares inseridos em sua arquitetura macromolecular (SANTERRE et al., 2005). Poliuretanos biodegradáveis e biocompatíveis podem ser preparados utilizando poliésteres de elevada massa molar, tais como a poli(ϵ -caprolactona) (PCL). O grupo éster alifático da PCL pode ser hidrolisado gerando produtos de degradação não tóxicos (FERNÁNDEZ et al., 2006). Entretanto, a taxa de biodegradação dos poliuretanos constituídos de PCL é reduzida à medida que a massa molecular da PCL é aumentada. Poli(etileno glicol) (PEG) é amplamente usada como co-monômero na síntese de poliuretanos ou copolímeros em bloco biodegradáveis e biocompatíveis, não só porque este componente controla a taxa de biodegradação dos polímeros devido à sua hidrofilicidade (LEE et al., 2001; GUAN et al., 2004), mas também devido à sua ausência de antigenicidade e imunogenicidade, e formação de produtos de degradação não tóxicos (PIAO et al., 2003). Logo, poliuretanos que tiram proveito das propriedades mecânicas proporcionadas pela PCL e das altas taxas de degradação do PEG podem ser utilizados em aplicações biomédicas diversas que demandam materiais flexíveis, e têm sido reportadas por diversos autores (GUAN et al., 2005; GUAN et al., 2004; MAHKAM et al., 2003).

Neste trabalho, poliuretanos biodegradáveis e biocompatíveis, derivados de PCL e PEG, foram produzidos baseados em dispersões aquosas destes polímeros. O acetato de dexametasona, um fármaco antiinflamatório esteroide amplamente utilizado na oftalmologia,

foi incorporado às dispersões aquosas dos poliuretanos. A partir desta incorporação, implantes constituídos de poliuretanos biodegradáveis e acetato de dexametasona foram desenvolvidos e explorados como dispositivos intra-oculares de liberação controlada do fármaco, destinados ao tratamento de doenças inflamatórias graves que acometem o segmento posterior do olho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomia ocular

2.1.1 Cavidade orbital e pálpebras

O bulbo do olho é protegido pelas pálpebras e órbita, que forma uma cavidade óssea no crânio com várias fissuras e forames que permitem a passagem dos nervos, músculos e vasos. Na órbita, uma membrana de tecido conjuntivo denominada cápsula de Tenon, o tecido adiposo e seis músculos extra-oculares sustentam e alinham o bulbo ocular para a visão. As pálpebras apresentam inervação sensorial densa, e em conjunto com os cílios, protegem o bulbo ocular contra lesões mecânicas e químicas. Movimentos coordenados dos músculos orbiculares, levantador das pálpebras e de Müller ajudam a distribuir as lágrimas sobre a córnea e conjuntiva. A superfície externa das pálpebras é coberta por uma camada fina de pele; a superfície interna é revestida pela parte palpebral conjuntiva, uma mucosa vascularizada em continuidade com a conjuntiva bulbar. Na reflexão das conjuntivas palpebral e bulbar, há um espaço conhecido como fórnix, que se localiza em posições superior e inferior por trás das pálpebras superior e inferior, respectivamente. Em geral, os fármacos tópicos são aplicados no fórnix inferior, também conhecido como fundo-de-saco inferior (HARDMAN e LIMBIRD, 2003).

2.1.2 Bulbo ocular

O bulbo ocular é constituído de duas esferas modificadas fundidas uma à outra. A anterior (que é formada pela córnea) tem raio menor (7,8 mm) que a posterior (formada pela esclera) que possui 12 mm de raio. A junção das duas é denominada limbo. Adicionalmente, o bulbo ocular é formado por três camadas ou túnicas concêntricas que envolvem os meios transparentes: camada externa ou de sustentação (córnea e esclera), média ou vascular (íris, corpo ciliar e coróide – estruturas que formam a uvéa) e interna ou sensorial (retina) (Figura 1). Finalmente, o bulbo ocular pode ser dividido em dois segmentos: anterior e posterior. O segmento anterior compreende córnea, íris, corpo ciliar e lente e é preenchido pelo humor aquoso. O segmento posterior compreende o complexo retina-coróide e é preenchido pelo corpo

vítreo. A esclera reveste parte do segmento anterior (excetuando-se a parte revestida pela córnea) e posterior (HARDMAN e LIMBIRD, 2003).

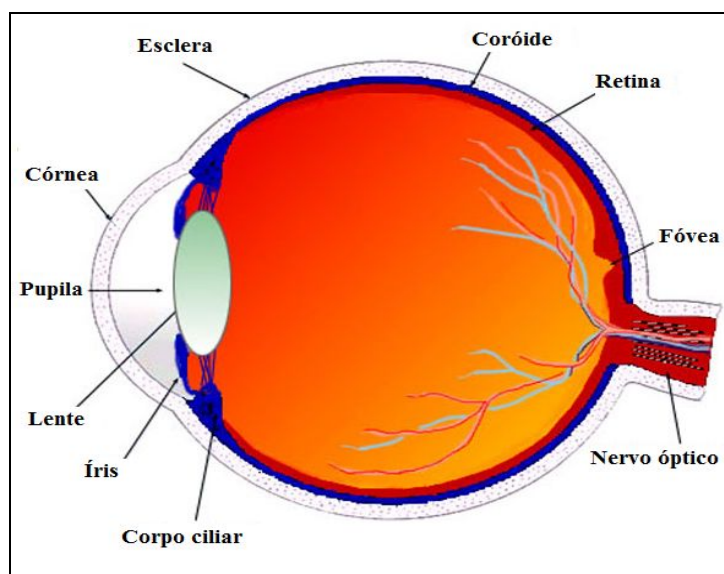


Figura 1 – Corte sagital vertical do olho humano adulto.
Fonte - <http://webvision.med.utah.edu/anatomy.html>

2.1.3 Córnea

A córnea é uma estrutura transparente que refrata a luz antes que esta atinja a pupila e entre no interior do bulbo do olho. Ela é uma estrutura avascular, e por isso recebe nutrientes provenientes do humor aquoso e oxigênio proveniente do meio ambiente. Ela apresenta 5 camadas distintas: epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio. Estas camadas desempenham funções fisiológicas diferentes. As células epiteliais são achatadas e formam junções intercelulares localizadas na sua superfície apical. Estas junções funcionam como barreiras à difusão dos fármacos administrados no segmento anterior do olho. A membrana de Bowman mantém a integridade e a organização epitelial (SNEEL e LEMP, 1998; MANNERMAA et al., 2006).

A penetração de fármacos nos tecidos oculares anteriores, via absorção trans-corneal, é determinada por dois fatores: o tempo de contato do fármaco com o olho e a permeabilidade do fármaco na córnea. A permeabilidade na córnea pode acontecer por meio da difusão passiva, da difusão facilitada ou pelo transporte ativo. O transporte ativo e a difusão facilitada requerem a expressão de transportadores pelo

epitélio corneal. A difusão passiva não é dependente dos transportadores, mas somente acontece se o fármaco apresenta coeficientes de partição e de difusão apropriados para transpor a bicamada lipídica das membranas celulares (MANNERMAA et al., 2006).

2.1.4 Esclera

A esclera (a parte branca do olho) é a camada mais externa do segmento anterior e se estende até o segmento posterior. A esclera forma uma camada protetora aos tecidos intra-oculares e é um suporte que se mantém estável durante variações da pressão interna e movimentos do olho, os quais poderiam perturbar o processo de visão devido a distorções na retina, na lente ou no diafragma da íris. Esta estabilidade, essencial para a visão, é propiciada pela organização e propriedades viscoelásticas dos tecidos conectivos da esclera (WATSON e YOUNG, 2004).

2.1.5 Lente

A lente é uma estrutura transparente e biconvexa. Situa-se posteriormente a íris e a pupila e está ligada ao corpo ciliar por meio do ligamento suspensor. O ligamento suspensor pode relaxar ou distender de acordo com os movimentos das fibras musculares conectadas ao corpo ciliar. Este processo leva à acomodação da lente, possibilitando-a refratar precisamente a luz na retina (SNELL e LEMP, 1998). A lente e a córnea recebem nutrientes provenientes do humor aquoso, uma vez que estas estruturas não possuem vasos sanguíneos. O humor aquoso é produzido pelas células do corpo ciliar, passa através da pupila e é drenado pelo canal de Schlemm. Como resultado deste processo, o bulbo apresenta uma pressão intraocular mensurável, a qual é dependente do balanço entre a taxa de produção do humor aquoso e a taxa de drenagem deste líquido (LLOYD et al., 2001).

2.1.6 Íris e Corpo ciliar

A íris é a porção colorida do olho, que impede o espalhamento da luz dentro do bulbo. O corpo ciliar se situa posteriormente a íris. Esta estrutura é responsável pelo

fornecimento de nutrientes a córnea e a lente, e também pela remoção de catabólitos por meio do humor aquoso (líquido produzido pelas células do corpo ciliar). A íris controla o tamanho da pupila, pois está conectada com fibras musculares que relaxam e contraem de acordo com uma resposta autônoma à variação da luz recebida (LLOYD et al., 2001).

2.1.7 Coróide

A coróide se estende do corpo ciliar ao nervo óptico. Ela é mais espessa na região posterior e gradualmente se torna mais fina ao se aproximar da região anterior. Encontra-se firmemente ligada à esclera, na região do nervo óptico, onde as artérias ciliares posteriores e os nervos ciliares penetram no olho. Esta estrutura prove nutrientes para as células da retina, uma vez que é altamente vascularizada. A retina e a coróide são separadas pela membrana de Bruch (LLOYD et al., 2001; COLTHURST et al., 2000).

2.1.8 Retina

A retina é funcionalmente constituída de duas partes: a neuroretina ou retina sensorial e a camada de células do epitélio pigmentar da retina. Contudo, a retina é dividida em 10 camadas na direção da órbita para o corpo vítreo, a saber: (1) camada pigmentar; (2) camada dos segmentos externo e interno (cones e bastonetes); (3) camada limitante externa; (4) camada nuclear externa; (5) camada plexiforme externa; (6) camada nuclear interna; (7) camada plexiforme interna; (8) camada ganglionar; (9) camada de neurofibras; (10) camada limitante interna (Figura 2).

A camada dos segmentos externo e interno é constituída pelas células fotorreceptoras da retina ou fotorreceptores denominados cones e bastonetes. Existem aproximadamente 100 milhões de bastonetes e 5 milhões de cones no olho humano. Eles são compostos do segmento interno, segmento externo, núcleo e axônio. O segmento externo dos fotorreceptores contém rodopsina e estão em contato com as microvilosidades das células epiteliais pigmentares da retina. A função dos fotorreceptores é converter a energia luminosa em impulso elétrico que será propagado pelas células bipolares, e

em seguida, pelas células ganglionares, as quais os axônios constituem o nervo óptico, transmitindo a informação até o córtex visual. A camada limitante externa é por onde passa a parte interna dos fotorreceptores. Esta camada é constituída por desmossomas que ligam as células de Muller entre elas e com os fotorreceptores. A camada nuclear externa contém os núcleos dos fotorreceptores. A camada plexiforme externa é constituída pelas junções entre os axônios dos fotorreceptores e dendritos das células bipolares da retina. A camada nuclear interna é constituída pelos núcleos das células bipolares, horizontais, Muller e amácrinas. Encontram-se nesta camada os capilares dos vasos centrais da retina. A camada plexiforme interna representa a sinapse entre as células bipolares e as células ganglionares. A camada ganglionar é constituída principalmente pelos núcleos das células ganglionares. A camada das neurofibras é constituída pelos axônios das células ganglionares e gliais e de vasos derivados da artéria central da retina. A camada limitante interna forma o limite interno da retina (RODIECK, 2003).

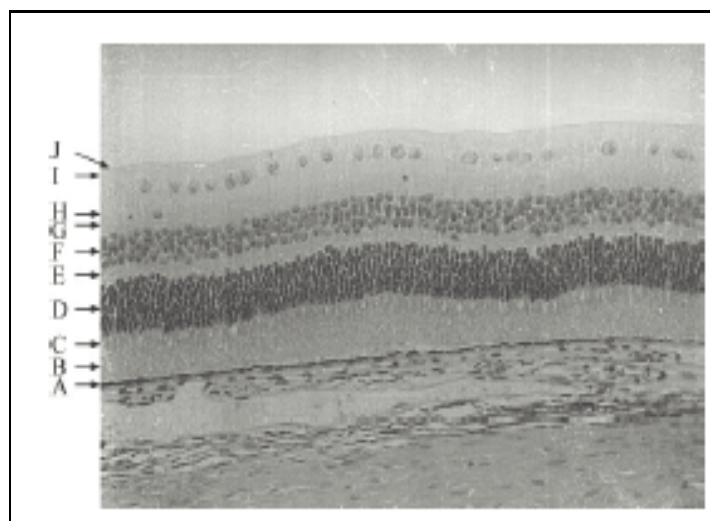


Figura 2 – Corte histológico da retina humana. As dez camadas da retina são: camada pigmentar (A), camada dos segmentos externo e interno (cones e bastonetes) (B), camada limitante externa (C), camada nuclear externa (D), camada plexiforme externa (E), camada nuclear interna (F), camada plexiforme interna (G), camada ganglionar (H), camada de neurofibras (I) camada limitante interna (J).

As células epiteliais pigmentares da retina (RPE) (camada pigmentar) formam uma monocamada de células hexagonais. Estima-se que o olho adulto contenha cerca de 4 a 6 milhões de células RPE. Posteriormente, o epitélio pigmentar se encontra sobre a membrana de Bruch. Lateralmente, as células do epitélio são unidas por meio das zônulas de oclusão, zônulas de aderência e desmossomas (BRON et al., 1998). As

zônulas de oclusão constituem as junções intercelulares caracterizadas pela fusão das membranas celulares de duas células RPE adjacentes. Estas junções são à base da barreira hemato-retiniana externa, uma vez que elas impedem a difusão passiva de substâncias da circulação coroidiana à retina neurosensorial. A superfície apical (anterior) das células RPE está em frente ao espaço subretiniano. O espaço subretiniano é ocupado pelos segmentos externos dos fotorreceptores e a matriz extracelular secretada, em sua grande maioria, pelas células epiteliais. O espaço subretiniano é limitado anteriormente pela camada limitante externa, formado pelas zônulas de aderência que se aderem aos fotorreceptores. O pólo apical das células RPE apresenta numerosas microvilosidades que estão em contato direto com a camada do segmento externo dos fotorreceptores. Além disso, as células RPE apresentam grânulos de melanina.

As células epiteliais pigmentares da retina são responsáveis por diversas funções que são indispensáveis para o sistema visual. As células RPE transportam íons, água e metabólitos que vêm do espaço subretiniano para o sangue, e também transportam os nutrientes, tais como, glicose, retinol e ácidos graxos provenientes do sangue para os fotorreceptores. As células RPE são também responsáveis pela fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores. Os segmentos externos dos fotorreceptores são digeridos, e substâncias essenciais, tais como o retinal, são recicladas e reenviadas aos fotorreceptores a fim de restaurar a sua sensibilidade à luz. Adicionalmente, as células RPE são capazes de secretar uma variedade de fatores de crescimento que ajudam a manter a integridade estrutural dos fotorreceptores e do endotélio dos capilares da coróide. Além disso, as células RPE também secretam fatores imunossupressores que são importantes no estabelecimento do privilégio imune do olho. Finalmente, o processo de visão começa quando a rodopsina, presente nos fotorreceptores, absorve a energia luminosa. A rodopsina, que constitui o pigmento visual, é uma molécula transmembrana formada por uma proteína, a opsina, e pelo isômero 11 cis-retinal. No momento em que um fóton é absorvido pela rodopsina, o 11 cis-retinal é isomerizado em 11 trans-retinal, que se desloca da opsina. Esta isomerização culmina na hiperpolarização dos fotorreceptores que origina o influxo nervoso visual que será enviado ao cérebro. Paralelamente, o 11 trans-retinal é reduzido em 11 trans-retinol, que por sua vez, é isomerizado pelas células RPE em 11

cis-retinol. Este é estocado sob a forma de éster ou óxido em 11 cis-retinal. O 11 cis-retinal é então secretado pelas células RPE no espaço subretiniano, que por sua vez, é recaptado pelos fotorreceptores, a fim de reconstituir a rodopsina. Devido a estas diferentes e complexas funções, as células RPE são essenciais para a visão, e a falha em uma destas funções pode levar à degeneração da retina, diminuição da acuidade visual e cegueira (STRAUSS, 2005).

2.1.9 Corpo vítreo

O corpo vítreo é constituído de colágeno, proteínas do plasma e ácido hialurônico. Esta última substância proporciona viscosidade ao corpo vítreo, pois forma um gel em baixas concentrações. O corpo vítreo está em contato direto com a retina, corpo ciliar e porção posterior da lente. O corpo vítreo é capaz de promover estabilidade aos componentes posteriores do olho, atenuando o estresse que pode ser gerado à retina, devido aos súbitos movimentos. Esta observação é justificável quando se considera que a primeira etapa no processo de descolamento da retina é sua separação do corpo vítreo (LLOYD et al., 2001).

2.2 Implantes intra-oculares

Os implantes intra-oculares são sistemas de liberação controlada de fármacos preparados a partir de diferentes polímeros reconhecidamente biocompatíveis, biodegradáveis ou não biodegradáveis. A inserção intra-ocular dos implantes deve ser realizada por meio de procedimento cirúrgico. Em geral, eles são introduzidos no vítreo a partir de uma incisão na *pars plana* do olho, que se situa posteriormente à lente e anteriormente à retina. Embora a técnica cirúrgica seja invasiva, os implantes apresentam diversas vantagens que sobrepõem os transtornos provocados pelo ato cirúrgico. Estas vantagens são: (1) ultrapassar a barreira hemato-retiniana, possibilitando a liberação do fármaco em níveis terapêuticos diretamente no sítio de ação; (2) possibilitar a liberação do fármaco por tempo prolongado; (3) evitar os efeitos colaterais associados frequentemente às injeções intravítreas e administração sistêmica; (4) diminuir a quantidade de fármaco necessário para o tratamento.

2.2.1 Implantes intra-oculares não-biodegradáveis

Os implantes intra-oculares podem ser confeccionados a partir de vários tipos de polímeros não-biodegradáveis que controlam a cinética dos fármacos nos sistemas de liberação. Os implantes poliméricos não-biodegradáveis apresentam-se em dois tipos: matriciais (sistemas monolíticos) e reservatórios. No sistema matricial, o fármaco é disperso, homogeneamente, na matriz polimérica ou absorvido na superfície. A difusão lenta do fármaco através da matriz polimérica proporciona a sua liberação controlada. No sistema reservatório, o fármaco está envolvido por uma membrana não degradável e permeável. Neste sistema, o fluido (água) se difunde através da membrana, dissolvendo o fármaco e criando uma solução saturada no interior do reservatório. Uma vez que há uma solução saturada, o fármaco se difunde para o exterior numa taxa de liberação em estado estacionário que persiste pela maior parte do período de implantação. Essa taxa de liberação, baseada na lei de Fick, é determinada pela área de liberação, pela espessura da cobertura polimérica, pela forma do implante e pela difusibilidade do fármaco a partir da cobertura polimérica. Os polímeros comumente utilizados no processo de manufatura destes implantes são o silicone, o álcool polivinílico (PVA) e o poli(etileno-co-acetato de vinila) (EVA). Polímeros, tais como silicone e PVA, são livremente permeáveis a uma variedade de fármacos lipofílicos, devido ao seu caráter hidrofóbico, e mantêm íntegro o reservatório do fármaco. O EVA é impermeável à maioria dos fármacos e é utilizado como uma cobertura em torno do reservatório para diminuir a velocidade de difusão do fármaco através do implante (BOURGÉS et al., 2006; YASUKAWA et al., 2005; DASH e CUDWORTH II, 1998; SMITH et al., 1992).

2.2.1.1 Implantes intra-oculares não-biodegradáveis para o tratamento da retinite por citomegalovírus

A retinite por citomegalovírus (CMV) é a infecção oportunista ocular de maior prevalência em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Existem duas formas clínicas de retinite por CMV. A forma fulminante é caracterizada pela necrose da retina posterior e hemorragia. Neste caso, os pacientes frequentemente apresentam perda de visão. A outra forma é reconhecida como uma

lesão granular na retina periférica com ou sem hemorragia. Os implantes intravítreos de ganciclovir são indicados para o tratamento da retinite por CMV, pois reduzem a frequência de infecções recorrentes que poderiam resultar em perda de visão, o que é inevitável em pacientes que não respondem satisfatoriamente à terapia HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) (VRABEC, 2004).

Diversos estudos foram conduzidos com o intuito de desenvolver implantes intra-oculares não-biodegradáveis de ganciclovir destinados ao tratamento da retinite por CMV em pacientes com SIDA (ASHTON et al., 1992; SANBORN et al., 1992; MARTIN et al., 1994; CHARLES e STEINER, 1996). Estes estudos, realizados em animais e em humanos, levaram ao desenvolvimento e a aprovação do Vitrasert[®] (Bausch & Lomb, USA), em 1996, pela *Food and Drug Administration* (FDA) (BOURGES et al., 2006).

O Vitrasert[®] é um implante intra-ocular de liberação controlada de 4,5 mg de ganciclovir. Este implante não-biodegradável do tipo reservatório é constituído de um comprimido de ganciclovir recoberto por PVA/EVA. O Vitrasert[®] foi desenvolvido antes da evolução da terapia anti-retroviral, quando a expectativa de vida dos pacientes era de aproximadamente 12 meses, o que impedia a avaliação das possíveis complicações do implante ao longo do tempo. Com a introdução da HAART, a expectativa de vida dos pacientes com SIDA aumentou significativamente, e o tratamento da retinite por CMV, bem como as complicações associadas com a utilização do implante e ao procedimento cirúrgico, puderam ser avaliadas por um período prolongado. Dentre as complicações cirúrgicas relatadas, a hemorragia vítrea foi a mais comum. Também aconteceram hemorragias operatórias principalmente durante o procedimento de retirada do implante. Dentre as complicações pós-operatórias relacionadas especificamente com o implante, cita-se o aparecimento de feridas, que foram observadas em 1 dia e 28 meses após a cirurgia de implantação; e o deslocamento do implante, que foi a única complicação observada após 3 anos. Há também o relato de complicações possivelmente relacionadas com o implante, a saber: catarata, descolamento da retina, hemorragia vítrea, hipotonia, formação de membrana epiretinal, edema macular e endoftalmite. Estas complicações foram mais comuns durante os primeiros 2 anos de implantação, o que leva a crer que a incidência

das mesmas está associada a múltiplos fatores e não unicamente devido à presença do implante. Observou-se também que a incidência de descolamento da retina foi menor em pacientes no esquema de tratamento HAART e aqueles que haviam se reconstituído imunologicamente. Portanto, pacientes que apresentavam maior controle da infecção, devido à administração dos medicamentos anti-retrovirais sistêmicos, apresentaram menores riscos de descolamento da retina, e que a presença dos implantes em longos períodos não implicou num aumento substancial dos riscos de descolamento. Em resumo, os resultados da pesquisa, realizada entre 1995 e 2001, sugeriram que as complicações diretamente relacionadas com o procedimento de implantação ou a presença do implante no olho são incomuns, mas podem ocorrer ao longo de 7 anos, o que indica a necessidade de selecionar os casos em que o implante deve ser utilizado. Evidenciou-se também que o uso contínuo do implante, associado à HAART, realmente protege contra a perda de visão, em virtude de sua habilidade em modular os fatores relacionados com a doença (KAPPEL et al., 2006).

2.2.1.2 Implantes intra-oculares não-biodegradáveis para o tratamento das uveítes não infecciosas

Uveíte é o termo originalmente utilizado para designar inflamações da uvéa (estrutura do olho formada pela íris, corpo ciliar e coróide), embora na prática também seja usado para designar inflamações que acometem a retina, o nervo óptico e o corpo vítreo (HERRERO-VANRELL e REFOJO, 2001). O tratamento das uveítes infecciosas ou não-infecciosas requer terapia farmacológica com esteróides, imunossupressores, antibióticos ou todos estes fármacos em conjunto, para suprimir processos inflamatórios crônicos ou prevenir a recorrência em casos específicos (YASUKAWA et al., 2004). Estas inflamações instaladas na uvéa podem provocar a diminuição da acuidade visual até a perda completa da visão. Para minimizar tais efeitos, implantes intra-oculares de liberação controlada de fármacos devem ser utilizados.

O Retisert[®], um implante intra-ocular de liberação controlada de acetato de fluocinolona (AF), foi desenvolvido e é comercializado pela empresa americana Bausch & Lomb, para o tratamento de uveítes não infecciosas que afetam o segmento

posterior do olho. O Retisert[®] é constituído de um comprimido de AF, celulose microcristalina, estearato de magnésio e PVA. Este comprimido é revestido por um elastômero de silicone que apresenta um orifício de liberação. Uma membrana semipermeável de PVA está posicionada entre o comprimido e o orifício, para criar uma barreira para a difusão e liberação do fármaco. Estudos clínicos realizados em pacientes com uveíte não infecciosa severa demonstraram a eficácia do Retisert[®], uma vez que o AF, liberado em aproximadamente 30 meses, reduziu significativamente a recorrência da doença, possibilitou o aumento da acuidade visual, e diminuiu a necessidade das terapias tópica, sistêmica e periocular suplementares. A progressão da catarata e o aumento da pressão intra-ocular (IOP) foram os efeitos adversos relacionados à utilização do Retisert[®] (JAFFE et al., 2006).

Estudos realizados por Debra et al. (2007) confirmaram que o aumento da IOP é um dos principais efeitos adversos relacionados ao uso do Retisert[®]. A incidência e a magnitude do aumento da IOP foram significativas nos olhos que receberam o implante, sendo necessário tratamento farmacológico ou procedimento cirúrgico para diminuir a IOP. Portanto, a elevação da IOP é um evento adverso que frequentemente pode estar associado ao tratamento com o Retisert[®], mas que deve ser balanceado com a eficácia do implante intravítreo em reduzir as uveítes recorrentes. Logo, os pacientes devem ser conscientizados da possibilidade real de aumento da IOP e prepará-los para a necessidade de monitorá-la periodicamente e para o risco significativo de desenvolvimento de glaucoma.

Outros estudos foram conduzidos no intuito de desenvolver dispositivos não biodegradáveis intra-oculares de liberação controlada de fármacos destinados ao tratamento das uveítes não infecciosas. Estes estudos estão descritos a seguir.

Cheng et al. (1995) confeccionaram implantes não-biodegradáveis para a liberação sustentada de dexametasona para o tratamento de uveíte experimental em olhos de coelhos. Estes implantes foram altamente efetivos na supressão da inflamação induzida por aproximadamente 105 dias. Sugeriu-se que os mesmos poderiam ser eficazes no tratamento de uveítes posteriores crônicas em pacientes que não toleraram as terapias sistêmica e periocular.

Jaffe et al. (1998) prepararam implantes de PVA/EVA destinados à administração intravítrea de ciclosporina A (CsA) para o tratamento de uveíte experimental em olhos de coelhos. Os cortes histológicos demonstraram que os olhos não tratados apresentavam inflamação exacerbada e desorganização das camadas de células da retina, enquanto que os olhos que receberam os implantes contendo CsA apresentaram uma redução significativa da inflamação e a arquitetura da retina foi preservada. Além disso, os implantes liberaram o fármaco em níveis terapêuticos por, no mínimo, 6 meses, sem que o fármaco fosse detectado na circulação sanguínea. Portanto, os implantes não-biodegradáveis de CsA foram eficazes na supressão do processo inflamatório induzido em olhos de coelhos, e este sistema poderia ser útil em pacientes que apresentam uveíte posterior crônica, e que são intolerantes às terapias sistêmica com imunossupressora.

Okabe et al. (2003) desenvolveram implantes de PVA/EVA de aplicação intra-escleral para liberação controlada de betametasona. Os implantes liberaram betametasona numa cinética de pseudo ordem zero por 4 semanas. As concentrações de betametasona na coróide e retina permaneceram acima das concentrações efetivas para suprimir vários processos inflamatórios por, no mínimo, 28 dias. Estes resultados sugeriram que a via intra-escleral também pode ser considerada para a implantação de sistemas de liberação controlada de fármacos destinados ao tratamento das uveítes posteriores.

2.2.1.3 Implantes intra-oculares não-biodegradáveis para o tratamento das doenças relacionadas à retinopatia diabética

A retinopatia diabética é a segunda maior causa de cegueira em pacientes adultos nos países ocidentais, correspondendo a cerca de 19% dos casos de cegueira. A maculopatia diabética, cuja principal manifestação é o edema macular, é a causa mais frequente de perda significativa da função visual em diabéticos, com prevalência de 18 a 20%, tanto em pacientes com diabetes tipo I quanto em pacientes com diabetes tipo II. A perda visual pelo diabetes pode ser evitada ou minimizada com controle clínico adequado e a realização de tratamentos local e sistêmico. Na retinopatia

diabética, o rompimento da barreira hemato-retiniana permite o extravasamento de líquidos e constituintes plasmáticos (principalmente lipoproteínas) para o espaço intersticial da retina, levando à formação dos edemas. O edema pode ser focal ou difuso e se manifesta clinicamente como retina espessa e opacificada. No edema focal, há áreas de vazamento a partir das lesões capilares específicas, que pode estar associado aos exsudatos duros (precipitação de resíduos lipídicos, após a reabsorção do fluido derivado do extravasamento de lipoproteínas plasmáticas). No edema difuso, há dilatação capilar e vazamento devido às quebras extensas na barreira hemato-retiniana, sendo que os exsudatos duros são menos comuns (MOTTA et al., 2008).

O tratamento da retinopatia diabética, e conseqüentemente, do edema macular diabético deve ser realizado por meio de diferentes abordagens nas vertentes da prevenção, intervenção e restauração. No tratamento preventivo, deve-se administrar medicamentos anti-hipoglicemiantes e anti-hipertensivos; na intervenção, deve-se utilizar esteróides intravítreos, antiangiogênicos e antiproliferativos; e finalmente na restauração, a abordagem cirúrgica é necessária (ÁVILA, 2003).

Implantes não-biodegradáveis contendo AF, destinados ao tratamento do edema macular diabético, estão sendo avaliados em estudos clínicos de fase III. Estes implantes, denominados Illuvien[®] (Allimera Sciences Products), são pequenos tubos de 3,5 mm de comprimento e 0,37 mm de diâmetro que devem ser inseridos no vítreo por meio de uma injeção ao invés de uma incisão cirúrgica, e possibilitaram a liberação controlada de AF por 24 a 36 meses.

2.2.1.4 Implantes intra-oculares não biodegradáveis contendo células para o tratamento das desordens da retina

Recentemente, McDonald et al. (2007) demonstraram a funcionalidade de uma nova abordagem terapêutica destinada ao tratamento das desordens da retina em pacientes (estudos clínicos de fase I). Trata-se de um implante intraocular não-biodegradável que contém células humanas epiteliais pigmentares da retina encapsuladas capazes de produzir o fator neurotrófico ciliar (CNTF). O CNTF é uma proteína da família da

interleucina-6 que se liga ao receptor CNTF- α presente nas células epiteliais pigmentares da retina, cones, bastonetes, células ganglionares da retina e seus axônios. Quando o CNTF se liga ao receptor, há a ativação do mecanismo regulado por quinases em cones e bastonetes, o que induz a neuroproteção. Pacientes com retinite pigmentosa que receberam estes implantes intravítreos apresentaram melhora da acuidade visual. Além disso, os implantes não provocaram efeitos adversos, tais como aumento da IOP, descolamento da retina, infecção ou inflamação severa. Adicionalmente, as células do implante liberaram CNTF em níveis terapêuticos por 6 meses. Os resultados obtidos nesta pesquisa encorajam a realização de estudos clínicos de fase II e III para investigar se CNTF diminui a neurodegeneração e prolonga as funções visuais.

Em resumo, os implantes intra-oculares não-biodegradáveis apresentam a vantagem de controlar a liberação do fármaco, numa cinética previsível, por períodos prolongados. Além disso, elevadas concentrações do fármaco são quantificadas no vítreo, e baixas concentrações são detectadas no humor aquoso ou no sangue. Porém, ao contrário dos implantes intra-oculares biodegradáveis, estes sistemas devem ser removidos cirurgicamente do olho após a liberação total do fármaco, o que representa risco para o paciente e uma desvantagem inerente dos implantes não-biodegradáveis. Por esta razão, diversos estudos vêm sendo realizados visando o desenvolvimento de implantes intra-oculares de liberação controlada de fármacos constituídos de polímeros biodegradáveis.

2.2.2 Implantes intra-oculares biodegradáveis

Os implantes constituídos de polímeros biodegradáveis também se apresentam em dois tipos: matriciais (sistemas monolíticos) e reservatórios. No sistema matricial, o polímero se degrada lentamente nas condições fisiológicas e o fármaco é liberado à medida que acontece a degradação. Neste caso, o fármaco também pode ser liberado por difusão através dos poros da matriz. No sistema reservatório, a membrana se degrada numa velocidade mais lenta que a de difusão do fármaco (DASH e CUDWORTH II, 1998; FIALHO et al., 2003).

Uma grande variedade de polímeros biodegradáveis naturais ou sintéticos tem sido estudada para o desenvolvimento dos implantes. Dentre os polímeros naturais citam-se as albuminas bovina e humana, colágeno, gelatina e hemoglobina. Porém, o uso destes polímeros é limitado devido ao alto custo e pureza questionável. Dentre os polímeros sintéticos citam-se as poliamidas, poliaminoácidos, polialquil- α -cianoacrilatos, poliuretanos, poliacrilamidas, poliésteres, poli(orto-ésteres) (POE), polímero poliglicólico (PGA), copolímero poli(D,L-láctico-glicólico) (PLGA) e polímero poli(D,L-láctico) (PLA) (JAIN, 2000).

Os polímeros dos ácidos láctico e glicólico (PGA, PLA e PLGA) são poliésteres alifáticos que podem ser degradados por hidrólise enzimática ou não-enzimática. As ligações éster destes polímeros são suscetíveis à degradação hidrolítica nas condições fisiológicas, e os produtos de degradação gerados, os ácidos láctico e glicólico, são metabólitos naturais do organismo, que entram no ciclo de Krebs, e são finalmente metabolizados em gás carbônico e água (YASUKAWA et al., 2005, CHANDRA e RUSTGI, 1998).

O PGA apresenta rápida taxa de degradação, com perda de massa entre 6 e 12 meses. Entretanto, os produtos de degradação rapidamente gerados levam à acidificação do meio, o que limita a aplicação biológica do PGA puro, fazendo com que ele seja utilizado na preparação de co-polímeros que não apresentam a desvantagem acima mencionada (MAURUS e KAEDING, 2004).

O PLA é sintetizado a partir do ácido láctico, que por sua vez, apresenta duas formas opticamente ativas: ácido L-láctico e ácido D-láctico. A polimerização destes monômeros leva à formação de PLA semicristalino, altamente hidrofóbico, e com taxas de degradação extremamente lentas, que variam conforme o grau de cristalinidade do polímero, bem como a porosidade da matriz. Por outro lado, a polimerização de misturas racêmicas dos ácidos L-láctico e D-láctico resulta na formação do PLA amorfo, que sofre perda de massa entre 12 e 16 meses devido à hidrólise (NAIR e LAURENCIN, 2007).

A taxa de degradação do PLGA varia conforme a proporção dos ácidos láctico e glicólico na matriz polimérica e a massa molecular do polímero. A utilização do PLGA tem sido extensivamente investigada como biomaterial para liberação controlada de fármacos e para suporte na engenharia de tecidos, já que este polímero apresenta taxas de degradação controláveis, excelente biocompatibilidade e aprovação do FDA para uso em humanos (NAIR e LAURENCIN, 2007).

A poli(ϵ -caprolactona) (PLC) é um poliéster semicristalino e hidrofóbico, que é sintetizado a partir da polimerização dos monômeros ϵ -caprolactona. A PCL sofre degradação hidrolítica devido à presença das ligações éster. Entretanto a taxa de degradação da PCL é relativamente lenta (2 a 3 anos) (BORUGES et al., 2006; NAIR e LAURENCIN, 2007). A degradação lenta, a excelente biocompatibilidade e a alta permeabilidade aos fármacos são características da PCL que vem sendo exploradas para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos no interior do olho (PEYMAN et al., 1996, DONG et al., 2006, FIALHO et al., 2008).

Os implantes intra-oculares contendo polímeros biodegradáveis, tais como o PLA, PLGA ou PCL, podem ser preparados pelas técnicas de moldagem, extrusão e preparação de filmes. Na moldagem, o polímero e o fármaco podem ser aquecidos e submetidos à compressão em moldes de tamanho e forma desejados. Na extrusão, o polímero e o fármaco são propulsionados continuamente, sob pressão, através de áreas de alta temperatura, provocando a fusão e a compactação da mistura de pós na forma do implante. A preparação de filmes pode ser realizada por meio de fusão e pressão do polímero e do fármaco ou por adição de solução. No método de adição de solução, os componentes são solubilizados no solvente apropriado, seguido pela evaporação do solvente. O filme seco é removido da superfície (KIMURA e OGURA, 2001).

Em geral, implantes preparados por compressão dispõem um perfil trifásico de liberação do fármaco, a saber: (1) a fase inicial é derivada da liberação de uma dose maior do fármaco presente na superfície da matriz polimérica, e é dependente da área superficial total do implante, da porcentagem de fármaco adicionada ao implante, e da solubilidade aquosa do fármaco. Portanto, quanto maior a área superficial do sistema,

maior a concentração e hidrofília do fármaco adicionado, maior a probabilidade de acontecerem efeitos tóxicos devido à exacerbação da fase inicial; (2) a fase de difusão caracterizada pela liberação gradual do fármaco devido à sua dissolução e a erosão da superfície da matriz polimérica. Esta fase é regulada pela velocidade de degradação do polímero, a área superficial total do implante, a porcentagem de fármaco adicionado e a solubilidade aquosa do fármaco; (3) a fase final é caracterizada pela hidrólise no interior da matriz e liberação repentina de uma dose mais elevada de fármaco. A liberação de uma dose elevada de fármaco é possivelmente problemática e representa uma desvantagem dos sistemas biodegradáveis (YASUKAWA et al., 2002).

Os poli(orto-ésteres) (POE) são polímeros biodegradáveis hidrofóbicos especialmente projetados para a liberação controlada de fármacos. Desde 1970, quatro famílias de POE têm sido investigadas em aplicações biomédicas. As famílias POE I e POE II não são usadas na oftalmologia. O POE III apresenta cadeias poliméricas altamente flexíveis, sendo um gel a temperatura ambiente. A natureza viscosa deste polímero possibilita a incorporação de agentes terapêuticos na matriz sem a necessidade de utilizar solventes. Além disso, POE III pode ser injetado diretamente no olho com agulhas apropriadas. A taxa de degradação do POE III pode ser acelerada pela incorporação de substâncias ácidas na matriz polimérica, uma vez que POE III apresentam ligações sensíveis a variação do pH. Já a incorporação de substâncias básicas estabiliza a matriz polimérica (BOURGES et al., 2006; NAIR e LAURENCIN, 2007). A biocompatibilidade intracameral e intravítrea de POE III foi extensivamente investigada. Observou-se que a biocompatibilidade intracameral é dependente da quantidade de polímero injetada na câmara anterior. Quando 50 μ L foram administrados, o polímero degradou em 2 semanas, e as observações clínicas demonstraram boa biocompatibilidade do POE III, sem toxicidade dos tecidos oculares ou aumento da IOP. A injeção de volumes maiores, 100 μ L de POE III, foi inadequada porque o contato direto do material com o endotélio corneal provocou edema reversível e inflamação na câmara anterior, que regrediu após alguns dias. A administração intravítrea de POE III foi bem tolerada, pois resposta inflamatória não foi desenvolvida. Além disso, o polímero se degradou lentamente no vítreo (EINMAHL et al., 2000). Apesar das características atrativas do POE III em

aplicações oculares, a consistência do gel e a dificuldade em produzi-lo em escala industrial são limitações deste polímero. O POE IV apresenta degradação apreciável devido à incorporação de segmentos curtos baseados nos ácidos láctico e glicólico na matriz polimérica. A taxa de degradação pode variar de dias a meses, de acordo com a proporção de segmentos ácidos adicionados. A biocompatibilidade do POE IV foi investigada no espaço subconjuntival, intracameral, intravítreo e supracoroidal de olhos de coelhos (EINMAHL et al., 2003). Após a injeção subconjuntival, o polímero foi bem tolerado e degradou completamente em cerca de 5 semanas. Na injeção intracameral, a biocompatibilidade do polímero foi satisfatória e a degradação na câmara anterior não foi completa ao final de 6 meses. Após as injeções intravítrea e supracoroidal, o polímero se degradou em aproximadamente 3 e 6 meses, respectivamente, e a biocompatibilidade foi excelente sem respostas inflamatórias detectáveis.

2.2.2.1 Implantes intra-oculares biodegradáveis para o tratamento da retinite por citomegalovírus

Kunou et al. (1995) prepararam implantes biodegradáveis a base de PLGA (75:25) e 25% (p/p) de ganciclovir destinados ao tratamento da retinite por CMV. Estes implantes apresentaram um perfil trifásico de liberação do fármaco. Na primeira fase, cerca de 40% do fármaco foi liberado em apenas 1 semana. Na fase difusional, cerca de 10% do ganciclovir foi liberado em 8 semanas, e na fase final, que aconteceu durante 4 semanas, aproximadamente 100% do princípio ativo foi liberado. Houve o desaparecimento completo do implante após 5 meses de implantação, devido à hidrólise não enzimática do PLGA.

As principais desvantagens dos implantes a base de co-polímeros dos ácidos láctico e glicólico são a liberação de uma grande quantidade de fármaco (*overdose*) na etapa final, e a dificuldade em prolongar e aumentar a taxa de liberação do fármaco na etapa difusional. Para tentar superar tais complicações, Kunou et al. (2000) prepararam implantes contendo uma mistura de PLA com diferentes massas moleculares (70-kDa e 50-kDa), na proporção 80:20. Estes sistemas propiciaram uma liberação mais homogênea de ganciclovir na etapa final, e também tiveram uma melhor taxa de

liberação de fármaco na fase difusional, com duração prolongada (mais de 25 semanas). Sugeriu-se que o PLA de alto peso molecular restringiu a degradação do PLA de baixa massa molecular, e que este segundo pôde regular a liberação do fármaco durante a fase difusional, devido à formação mais lenta de poros na matriz. Adicionalmente, o PLA de baixa massa molecular sofreu hidrólise, mas a associação ao PLA de massa molecular elevada impediu a quebra da estrutura, e conseqüentemente à liberação de grande quantidade de fármaco na etapa final. Estes implantes biodegradáveis apresentaram um perfil de liberação do ganciclovir, por tempo prolongado, comparável ao perfil de liberação de sistemas não-biodegradáveis.

2.2.2.2 Implantes intra-oculares biodegradáveis para o tratamento das uveítes

O Surodex[®] (Oculex Pharmaceuticals, Sunnyvale, Califórnia) é um sistema monolítico constituído de PLGA e 60 µg de dexametasona que estão homogeneamente dispersos. Este implante biodegradável é utilizado após a cirurgia de catarata com o intuito de evitar inflamações. Inicialmente, foi demonstrado que este sistema, implantado na câmara anterior de olhos de coelhos, proporcionava a liberação controlada da dexametasona numa cinética de ordem zero, durante 7 dias. A segurança deste implante foi demonstrada em estudos toxicológicos de Fase I (protocolo FDA número 94001). Em seguida, estudos em humanos foram realizados com o intuito de comparar os desempenhos do Surodex[®] e de um colírio contendo 0,1% de dexametasona, em olhos de pacientes que se submeteram a cirurgia de extração da catarata e implantação de lente intra-ocular. Os resultados mostraram que o Surodex[®] foi mais efetivo na redução do processo inflamatório pós-cirúrgico (TAN et al., 2001). Wadood et al. (2004) também compararam a segurança e eficácia do Surodex[®] e de um colírio contendo 0,1% de dexametasona, em pacientes que se submeteram a facoemulsificação. Novamente, o Surodex[®] se mostrou mais efetivo contra o desenvolvimento de resposta inflamatória. Portanto, de acordo com os estudos realizados, podem-se considerar três vantagens importantes destes implantes intra-camerais em relação aos colírios oftálmicos: (1) utilização de quantidade menor de fármaco, e conseqüente redução das reações adversas e da toxicidade sistêmica; (2) controle da liberação do fármaco no segmento anterior numa cinética de ordem zero; (3) redução das complicações em pacientes que não administram corretamente os

colírios devido à baixa adesão à terapia. Atualmente, o Surodex[®] está sendo avaliado em estudos clínicos de fase III (SEAH et al., 2005).

O Posurdex[®] (Allergan) é um implante intravítreo biodegradável constituído de PLGA e dexametasona. Este sistema de liberação controlada tem sido estudado em pacientes que apresentam edema macular persistente provocado por retinopatia diabética, oclusão de veias, uveíte e síndrome Irvine-Gass (estudos clínicos na Fase III) (AMO e URTTI, 2008). Kuppermann et al. (2007) pesquisaram a eficácia e segurança do Posurdex[®] contendo 350 e 700 µg de dexametasona, durante 6 meses, em 315 pacientes com edema macular persistente por, no mínimo, 90 dias. Os resultados mostraram que em 3 meses de tratamento, 35% e 24% dos pacientes que receberam a dose de 700 µg e 350 µg de dexametasona, respectivamente, apresentaram melhora de 10 letras ou mais na acuidade visual, e 18% dos pacientes tratados com 700 µg de fármaco melhoraram 15 letras ou mais na acuidade visual. Concluiu-se que o Posurdex[®] contendo a maior dose de dexametasona é mais eficaz no tratamento do edema macular persistente. Os resultados obtidos até o momento indicaram que o Surodex[®] e o Posurdex[®] poderão ser importantes no tratamento de uveíte dependendo do esquema posológico necessário (AMO e URTTI, 2008).

Fialho et al. (2006) prepararam implantes biodegradáveis de PLGA contendo 1000 µg de dexametasona visando o tratamento de desordens inflamatórias que acometem o segmento posterior do olho. Os implantes foram inseridos no vítreo de olhos de coelhos por meio de uma incisão na *pars plana*. O fármaco foi liberado por 8 semanas, dentro da faixa terapêutica necessária para suprimir uma inflamação ocular (0,15 a 4,00 µg/mL). Além disso, demonstrou-se a biocompatibilidade dos implantes, uma vez que reações tóxicas não foram observadas por meio de eletrorretinografia e exame histológico. Os resultados satisfatórios obtidos e a semelhança entre estes implantes e o Posurdex[®] encorajam estudos adicionais para a aplicação clínica destes sistemas.

Dong et al. (2006) prepararam implantes intravítreos constituídos de CsA e do copolímero glicólico-co-láctico-co-caprolactona (PGLC) que foram utilizados no tratamento de uveíte crônica experimental induzida em olhos de coelhos. Os

resultados obtidos demonstraram que a inflamação nos olhos dos animais que não receberam o implante ou que receberam doses orais de CsA foi mais severa do que nos olhos dos animais que se beneficiaram do tratamento com os implantes biodegradáveis. A terapia sistêmica foi intencionalmente incluída neste estudo para comparar a toxicidade do fármaco administrado por via oral e por meio do implante intra-ocular. Observou-se que os animais que receberam a CsA por via oral apresentaram distúrbios renais e hepáticas graves, com grande risco de falência dos órgãos; enquanto que os animais dos outros grupos não apresentaram estes mesmos problemas. Por outro lado, a concentração de CsA liberada no olho, a partir dos implantes, estava dentro da faixa terapêutica necessária para suprimir uma resposta inflamação, além de não induzirem toxicidade aos tecidos oculares.

Fialho et al. (2008) desenvolveram implantes intravítreos biodegradáveis contendo PCL e dexametasona. Estes implantes liberaram concentrações de dexametasona *in vitro* que poderiam suprimir vários processos inflamatórios e que não causariam reações tóxicas aos tecidos oculares. Além disso, estes sistemas foram bem tolerados após 30 dias de implantação em olhos de coelhos, uma vez que células inflamatórias não foram detectadas no vítreo ou na câmara anterior. No estudo de liberação *in vivo* utilizando olhos de coelhos, o fármaco foi liberado em concentração terapêutica por mais de 9 meses.

Kim et al. (2008) desenvolveram implantes biodegradáveis intraesclerais constituídos de PLA e acetato de triancinolona. Concentrações do princípio ativo liberado foram mensuradas no vítreo, humor aquoso, retina e coróide de olhos de coelhos após 1, 2, 4, 8 e 12 semanas de implantação. A triancinolona foi proporcionalmente liberada no humor aquoso, retina e coróide por 4 semanas. Entretanto, o fármaco não foi detectado no humor aquoso em 8 semanas e na retina e coróide em 12 semanas após a implantação. A triancinolona foi quantificada em concentrações constantes no vítreo durante 12 semanas. A razão pela qual a triancinolona foi detectada no vítreo por mais tempo que na retina, coróide e humor aquoso pode estar relacionada ao maior *clearance* do fármaco por meio dos vasos sanguíneos coroidais. Apesar dos resultados promissores obtidos, novos estudos devem ser conduzidos com o intuito de se avaliar

se concentrações sistêmicas do fármaco poderão ser detectadas e se existirão efeitos tóxicos nas células epiteliais pigmentares da retina.

2.2.2.3 Implantes intra-oculares biodegradáveis para o tratamento da vitreoretinopatia proliferativa

A vitreoretinopatia proliferativa (PVR) é o processo no qual há migração e proliferação de células no espaço subretiniano, no vítreo e na retina, que levam a formação de membranas fibrosas constituídas de células do epitélio pigmentar da retina, células gliais, macrófagos e fibroblastos. Estas membranas fibrosas contrácteis conduzem ao descolamento da retina e conseqüente perda da visão (YASUKAWA et al., 2004). Acredita-se que a PVR poderia ser inibida impedindo simultaneamente o curso de formação da doença que é dividido em três fases: inflamação, proliferação celular e cicatrização, a qual conduz a tração da retina. Portanto, para tratar a PVR é necessária a utilização de dispositivos intravítreos de liberação controlada de fármacos, seguida da cirurgia corretiva de descolamento da retina (ZHOU et al., 1998).

Existem diversos estudos que reportaram o tratamento da PVR experimental, induzida em olhos de coelhos, a partir da utilização de dispositivos intra-oculares contendo diferentes antimetabólitos, capazes de inibir o mecanismo de proliferação celular. Rubsamen et al. (1994) prepararam implantes intravítreos de PLGA contendo 1 mg de 5-fluoruracila (5-FU) que permitiram a liberação do antimetabólito na concentração entre 1 e 13 $\mu\text{g/L}$ durante 14 dias. Esta liberação sustentada auxiliou na involução da PVR, uma vez que a retina de 8 dos 9 coelhos utilizados permaneceu aderida. Por outro lado, apenas 1 animal do grupo controle (aquele que recebeu implante sem 5-FU) não apresentou descolamento da retina.

Yasukawa et al. (2002) prepararam implantes a partir de uma mistura de PLGA e várias concentrações de cis-hidroxiprolina (CHP). Os implantes de PLGA 65:35 (MM = 103.000) contendo 20% de CHP e os de PLGA 50:50 (MM = 93.000) contendo 15% de CHP foram selecionados para realização do estudo *in vivo*, baseado no perfil de liberação trifásico *in vitro*. Porém, estes implantes foram efetivos no tratamento da

doença apenas na primeira semana, pois a taxa da liberação do princípio ativo e a duração da fase difusional não foram satisfatórias. Para tentar superar estes problemas, um implante de PLGA 65:35 e outro de PLGA 50:50 foram inseridos juntos nos olhos dos coelhos, e estes diminuíram a incidência de descolamento da retina de 89% para 57%, 28 dias após a implantação. A diminuição da incidência de descolamento da retina foi similar aquela observada quando 20 µg de CHP foram diretamente injetadas em olhos de coelhos com PVR induzida. Dois implantes de PLGA 50:50 também foram implantados juntos e estes não apresentam efeito inibitório significativo da PVR. Estes resultados sugeriram que os perfis de liberação combinados de diferentes implantes são mais efetivos na inibição da incidência de descolamento da retina em olhos com PVR.

Dong et al. (2006) desenvolveram implantes de PLGA contendo 420, 650 e 1.040 µg de all-trans ácido retinóico (at-RA). Os implantes com a menor concentração de at-RA falharam na inibição da PVR. Por outro lado, os implantes com as maiores doses de at-RA apresentaram efeito anti-proliferativo satisfatório, com a liberação do antimetabólito em altas concentrações durante 8 semanas.

Em todos os estudos anteriormente relatados, os fármacos liberados no vítreo não provocaram reações tóxicas aos tecidos oculares e os implantes biocompatíveis apresentaram a potencialidade de aplicação clínica. Mas, para que estes implantes possam ser futuramente utilizados em pacientes, estudos adicionais deverão ser conduzidos para que se possa solucionar algumas questões ainda pendentes, tais como a necessidade de manter altas concentrações dos agentes terapêuticos durante a etapa de proliferação celular na PVR, o que induzirá mudanças não só na constituição polimérica do implante, mas também na proporção entre fármaco e polímero. Além disso, serão necessários estudos detalhados da farmacocinética intra-ocular dos diferentes antimetabólitos.

Implantes à base de POE IV (POE₇₀LA₃₀, Mm = 6900) e 5-FU puro, 5-FU associado à dexametasona ou dexametasona pura foram preparados com o intuito de prevenir a PVR experimental em olhos de coelhos. A PVR induzida foi clinicamente classificada da seguinte maneira: grau 0 - não há PVR; grau 1 - membranas epiretinais; grau 2 -

tração focal, vasos anormais e tortuosidade; grau 3 - descolamento localizado da retina; grau 4 - descolamento extensivo da retina e descolamento peripapilar; grau 5 - descolamento total da retina, dobras fixas e descontinuidade da retina. Os implantes que continham POE IV puro não afetaram o desenvolvimento da PVR, e os graus 4 e 5 foram observados. Por outro lado, os graus 2 e 3 foram observados em olhos tratados com POE contendo 1% de 5-FU ou 1% de dexametasona. Os olhos tratados com POE contendo os dois princípios ativos apresentaram o menor grau de PVR ($1,0 \pm 0,5$), demonstrando que a combinação destes fármacos em sistemas POE IV foi mais eficaz no tratamento da PVR (BOURGES et al., 2006).

Zhou et al. (1998) prepararam implantes de PLGA contendo 3 agentes terapêuticos: 5-FU (antimetabólito), triancinolona (antiinflamatório esteroide) e o ativador plasminogênio tecidual (t-PA) (agente trombolítico). Estes agentes poderiam prevenir a PVR por meio de três mecanismos distintos: (1) inibição da proliferação celular; (2) inibição da resposta inflamatória; (3) inibição da formação da matriz de fibrina. Estudos de liberação *in vitro* demonstraram que o 5-FU e a triancinolona foram liberados numa taxa de 1 $\mu\text{g}/\text{dia}$ durante 4 semanas e 10 a 190 $\mu\text{g}/\text{dia}$ durante 2 semanas. Após 2 dias, o t-Pa foi liberado numa taxa de 0,2 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{dia}$ em 2 semanas. Apesar dos resultados promissores, estes implantes multi-fármacos ainda devem ser avaliados *in vivo*.

Observam-se que pesquisas foram realizadas com implantes intra-oculares contendo apenas uma substância anti-proliferativa, enquanto que outros estudos foram conduzidos com implantes contendo dois ou mais fármacos, uma vez que a administração de múltiplos agentes terapêuticos potencializaria a eficácia do tratamento da PVR, já que as etapas de proliferação e migração celular, e de síntese das membranas seriam conjuntamente atacadas.

Portanto, para o tratamento das doenças intra-oculares crônicas, faz-se necessária a elaboração de implantes que possibilitem a liberação controlada e prolongada do princípio ativo exatamente no local de ação. Entretanto, exaustivos estudos pré-clínicos e clínicos deverão ser realizados para avaliar a eficácia e segurança dos diversos implantes intra-oculares até então desenvolvidos.

Como descrito nesta revisão, os implantes não biodegradáveis permitem a liberação controlada dos fármacos e o tratamento de doenças oculares experimentais e em pacientes, mas devem ser removidos após a liberação completa do princípio ativo. Por outro lado, os implantes biodegradáveis não precisam ser removidos do olho, pois serão degradados e absorvidos ou excretados pelo organismo, o que elimina a necessidade de nova cirurgia para remoção do reservatório vazio, aumentando a adesão do paciente à terapia. Entretanto, o desenvolvimento de sistemas biodegradáveis é mais complicado do que o desenvolvimento de sistemas não biodegradáveis, pois algumas variáveis devem ser consideradas. Por exemplo, a cinética de degradação do polímero *in vivo* deve acontecer numa taxa constante para manter a liberação do princípio ativo dentro da faixa terapêutica. Entretanto, a taxa de degradação destes sistemas pode ser afetada pelas variações de pH e temperatura corporal. Outra variável que deve ser considerada é a lenta difusão do fármaco a partir da matriz polimérica. A difusão acontece mais lentamente que a degradação do sistema. Logo, ajustes devem ser realizados na composição química do polímero utilizado na preparação do implante para minimizar o problema relatado. Enfim, desafios devem ser considerados e ultrapassados a fim de se elaborar implantes biodegradáveis que possibilitem a liberação prolongada do princípio ativo dentro da faixa terapêutica para o efetivo tratamento das doenças intra-oculares graves.

2.3 Síntese dos poliuretanos

Poliuretanos são polímeros nos quais a cadeia principal é composta por seções alifáticas ou aromáticas R e R' fixadas pela ligação uretano (Figura 3), enquanto que R' é um radical alifático ou aromático do monômero diisocianato, e R é um grupo derivado de um poliol [poli(éter) ou poli(éster)]. A síntese dos poliuretanos é baseada num processo de poli-adições que envolve os diisocianatos, os polióis com grupos hidroxila e os extensores de cadeia (KRÓL, 2007).

A decisão entre usar um diisocianato aromático ou alifático vai depender da aplicação a que se destina o poliuretano a ser preparado. De uma maneira geral, os diisocianatos alifáticos dão origem a poliuretanos mais flexíveis e resistentes às intempéries. Os

diisocianatos aromáticos dão origem a poliuretanos mais viscosos. Isso muitas vezes dificulta a preparação de poliuretanos isentos de solventes. Os monômeros alifáticos mais usados são o hexametileno diisocianato (HDI), o isoforona diisocianato (IPDI) e o 4,4'-d ciclohexilmetano diisocianato (H₁₂MDI) (AYRES, 2006).

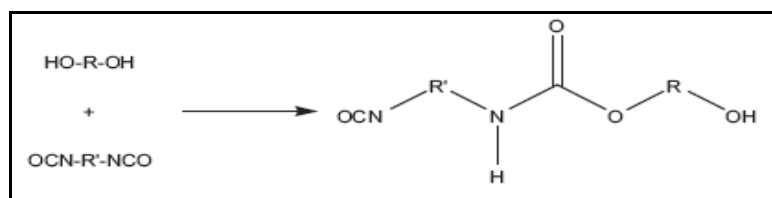


Figura 3 – Formação da ligação uretano.

Fonte – TATAI et al., 2007

Os isocianatos são compostos altamente reativos, pois possuem o grupo NCO com ligações duplas que reagem prontamente com compostos que contêm hidrogênios reativos, gerando produtos de adição. As reações básicas dos isocianatos com diferentes reagentes estão apresentadas na Figura 4. Os isocianatos reagem com hidroxilas para formar uretanos (a), e com aminas para formar uréias (b). Os isocianatos também reagem com a água formando, inicialmente, um ácido carbâmico instável, o qual decompõe gerando amina (c). A amina é um reagente nucleofílico que reage com o isocianato, gerando uréias (d). Outros produtos, tais como o biureto (e) e o alofanato (f) podem ser gerados a partir das reações dos isocianatos. Além disso, reações secundárias também podem acontecer, em menor escala, levando à formação de anéis uretidiona (g), isocianurato (h), e carbodiimina (j) (CHATTOPADHYAY e RAJU, 2007). Estas reações secundárias podem acontecer durante a síntese e estocagem e são inconvenientes na formação dos poliuretanos.

Os polióis utilizados na preparação dos poliuretanos podem ser poli(ésteres) ou poli(éteres), tais como a poli(ϵ -caprolactona) e o poli(etilenoglicol), respectivamente. Os poliésteres são polímeros termoplásticos que apresentam ligações éster em sua constituição química. Os poli(éster uretanos) são vulneráveis à hidrólise na ligação éster, levando à formação de ácido carboxílico e álcool. Esta instabilidade hidrolítica das ligações éster é uma característica importante em se tratando de poliuretanos biodegradáveis. Os poli(éteres) são polímeros que apresentam ligações éter em sua constituição química e são menos vulneráveis a hidrólise do que os poli(ésteres).

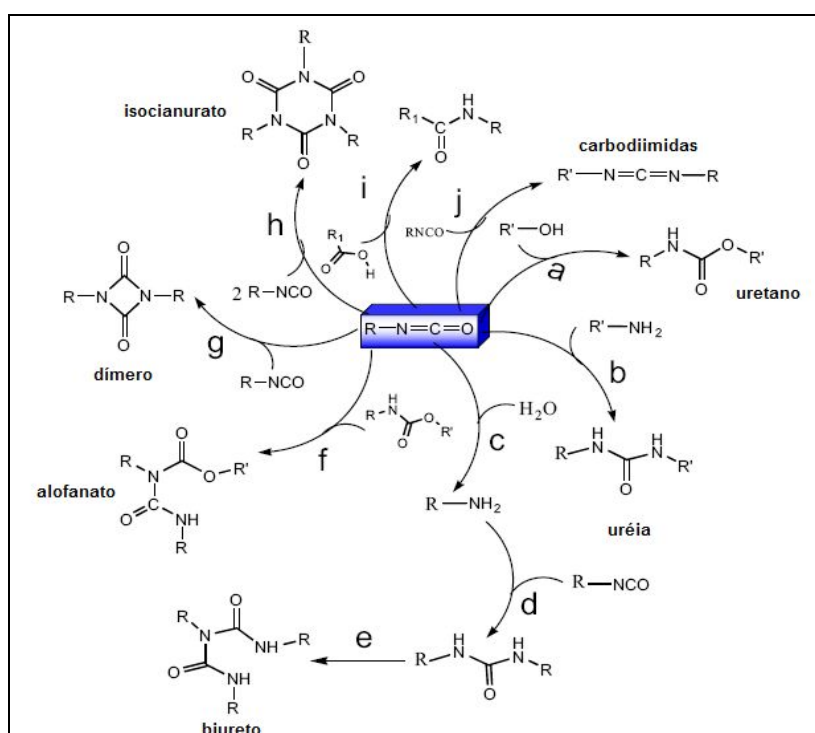


Figura 4 – Reações dos isocianatos.

Fonte - CHATTOPADHYAY e RAJU, 2007

Os catalisadores devem ser adicionados à síntese dos poliuretanos para tornar mais rápida a reação entre o diisocianato e a hidroxila do poliálcool. Vários catalisadores podem ser utilizados na formação do uretano, tais como, as aminas terciárias, especialmente o 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octano (DABCO), e os compostos organometálicos, principalmente os dibutiltindilauratos (DBTDL) e os dibutiltindioctanatos (KRÓL, 2007).

Poliuretanos segmentados podem ser descritos como copolímeros em blocos lineares. Um bloco do polímero consiste de um diol poli(éster) ou poli(éter) flexível de cadeia longa. Esse bloco é usualmente chamado de segmento macio, pois incorpora o caráter elastomérico ao polímero. O segundo bloco do co-polímero é o segmento rígido formado pela reação de diisocianatos com extensores de cadeia, com dióis ou trióis de baixa massa molar ou com diaminas, dando origem a ligações uretano ou uréia que são altamente polares e promovem a coesão do polímero. Os dois tipos de segmentos tendem a uma micro-separação de fases de maneira a formar micro-domínios. De modo geral, a segregação é mais pronunciada com poli(éteres) do que com

poli(ésteres) porque a estrutura do éter é menos polar e interage menos com os segmentos mais polares de uretano e uréia (CRAWFORD et al., 1998).

O interesse pela síntese de poliuretanos segmentados dispersos em água tem aumentado nos últimos anos, devido à redução da emissão de solventes orgânicos, potenciais poluidores do ambiente, e também devido à possibilidade de síntese de biomateriais.

Uma dispersão aquosa de poliuretanos é um sistema binário coloidal, no qual as partículas de poliuretano estão dispersas em água. Usualmente, os poliuretanos não são solúveis em água, e para que a dispersão aquosa possa ser formada é necessária a incorporação de grupos hidrofílicos aos polímeros pela adição de emulsificante. O emulsificante é um diol que contém um grupo iônico (carboxilato, sulfonato ou amônio quaternário) ou um grupo não iônico [óxido poli(etileno)] (CHATTOPADHYAY e RAJU, 2007). Os poliuretanos que contém grupos iônicos são chamados ionômeros e o processo para obtê-los é denominado processo do pré-polímero.

Os pré-polímeros catiônicos podem se auto-organizar em micelas com os grupos hidrofílicos carregados positivamente localizados na superfície e as cadeias hidrofóbicas concentradas no interior das micelas. Formam-se ligações de hidrogênio entre os grupos hidrofílicos e as moléculas de água, e então as micelas são solvatadas pela água. Para a preparação dos pré-polímeros catiônicos, o 3-dimetilamino-1,2-propanodiol pode ser utilizado para promover a dispersão aquosa dos poliuretanos, e em seguida, acontece a neutralização com um ácido fraco (CHATTOPADHYAY e RAJU, 2007).

Os pré-polímeros aniônicos são formados a partir da incorporação de ácido dimetilpropiónico (DMPA) aos polímeros, seguida da neutralização dos grupos carboxílicos do DMPA com a trietilamina (TEA). O íon carboxílico do DMPA é hidrofílico e serve como um centro aniônico nos poliuretanos, bem como emulsificador interno. Os grupos hidrofílicos aniônicos se localizam na superfície das micelas e permitem a distribuição homogênea das mesmas na água. A Figura 5 mostra

o diagrama esquemático das micelas dos pré-polímeros catiônicos (a) e aniônicos (b) dispersas em água (CHATTOPADHYAY e RAJU, 2007).

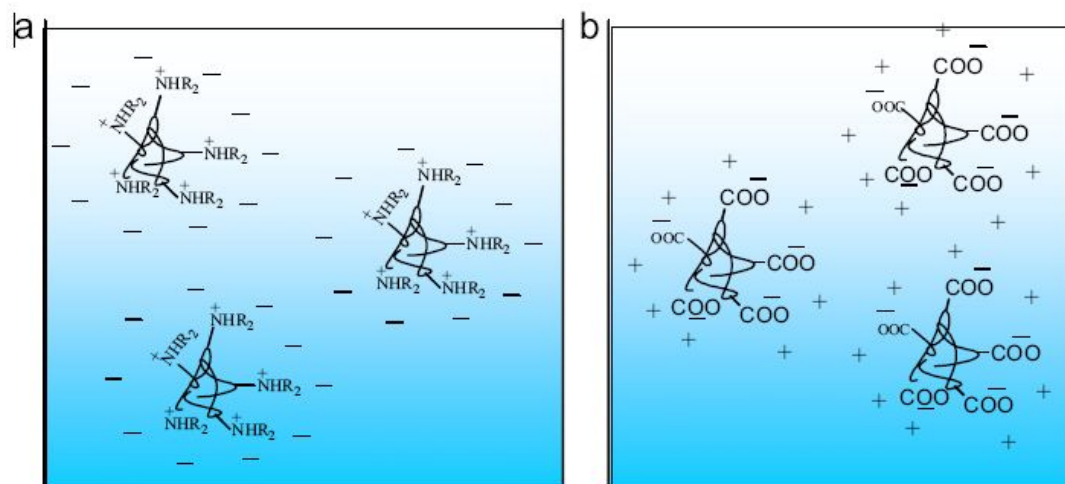


Figura 5 – Diagrama esquemático das micelas dos pré-polímeros catiônicos (a) e aniônicos (b) dispersas em água.

Fonte - CHATTOPADHYAY e RAJU, 2007

Após a realização da dispersão dos poliuretanos em água, faz-se posteriormente uma reação denominada extensão de cadeia, na qual o pré-polímero terminado em NCO reage com um diol de baixa massa molecular para formar ligações uretano, ou com grupos NH_2 para formar ligações uréia. Neste caso, será produzido poli (uretano-uréia). Geralmente os grupos NCO residuais são medidos pelo método de titulação com n-butilamina. A concentração de NCO residual é importante para a determinação da quantidade de extensor de cadeia a ser adicionado para a reação equimolar com o pré-polímero (AYRES, 2006).

2.4 Poliuretanos aplicados na oftalmologia

Os poliuretanos são biomateriais amplamente utilizados na confecção de dispositivos médicos, pois apresentam propriedades mecânicas excelentes associadas à biocompatibilidade. Válvulas cardíacas, membranas de diálise, cateteres, próteses ortopédicas e implantes mamários são exemplos de dispositivos fabricados a partir de poliuretanos bioestáveis (JIANG et al., 2007).

Os poliuretanos não biodegradáveis também já foram empregados no desenvolvimento de dispositivos oculares. Por exemplo, Lee et al. (2000) desenvolveram queratopróteses destinadas à readaptação visual de pacientes que sofreram queimadura química na córnea. Pacientes que receberam o dispositivo apresentaram alta tolerabilidade e aumentaram a acuidade visual significativamente após 8 meses de implantação. A queratoprótese projetada é constituída de uma parte óptica feita com polimetil metacrilato (PMMA), de uma esfera de poliuretano, e alças de polipropileno (Figura 6). As alças de polipropileno permitiram a ancoragem do dispositivo na esclera não danificada. A maioria das queratopróteses é fixada na córnea danificada, resultando em complicações não somente na capacidade curativa corneana, mas também em problemas de rejeição do dispositivo.

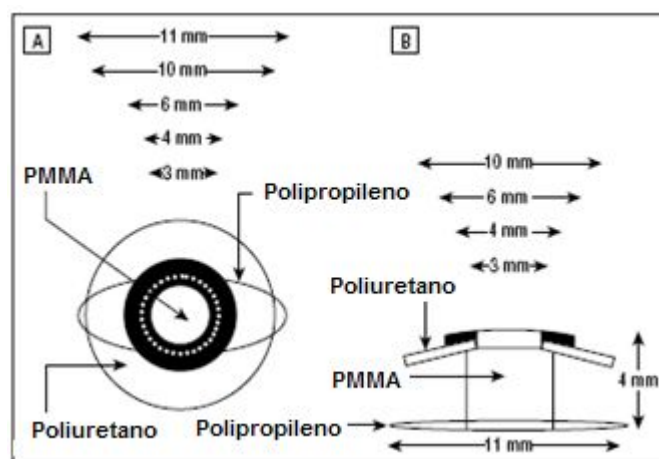


Figura 6 – Queratoprótese feita de poliuretano.
Fonte - LEE et al., 2000

Nuyts et al. (1999) demonstraram que um poliuretano, denominado NeuroPatch, pode ser utilizado no fechamento provisório de perfurações corneanas. O NeuroPatch é um poliuretano microporoso, de fácil manipulação, que apresenta excelente biocompatibilidade. Um pedaço de Neuro-Patch de 2 mm foi suturado sobre a perfuração corneana de um paciente, e após um mês, a sutura foi retirada e a lesão havia se reconstituído, sem sinais de inflamação no segmento anterior.

Existem pacientes que são refratários aos medicamentos dilatadores da pupila. A não dilatação da pupila pode impedir a visualização e a utilização dos instrumentos necessários durante uma cirurgia de catarata. Os métodos atualmente utilizados para promover a dilatação da pupila apresentam limitações. Kershner (2001) desenvolveu

um dispositivo alternativo de dilatação da pupila que pode ser utilizado durante o procedimento cirúrgico de remoção da catarata. Este dispositivo temporário foi projetado à base de um poliuretano biocompatível, flexível e com excelente memória de forma, pois após a introdução no olho, ele retoma o seu tamanho original de aproximadamente 8 mm.

Na Figura 7 está demonstrado o mecanismo de utilização do dispositivo dilatador da pupila feito de poliuretano. Na etapa 1, o dispositivo é removido do suporte estéril e a extremidade distal está embebida com uma pequena quantidade de hialuronato de sódio. Na etapa 2, esta extremidade do dispositivo é introduzida na câmara anterior por meio de uma incisão corneana. Na etapa 3, um instrumento é introduzido na incisão corneana para auxiliar o posicionamento da parte superior do dispositivo. Na etapa 4, a esfíncter da íris é completamente capturada pelo dispositivo, e conseqüentemente, a pupila se dilata. Ao término da cirurgia de remoção de catarata, o dispositivo é retirado e a pupila retorna ao seu diâmetro original.

Este dispositivo foi utilizado em 30 pacientes que se submeteram à cirurgia de remoção de catarata. Complicações operatórias, tais como dano da esfíncter da íris ou sangramento não foram observadas durante a operação. O tamanho médio da pupila destes pacientes, antes da cirurgia, era de aproximadamente 3,2 mm, e após a inserção do dispositivo era de cerca de 7,8 mm, e após a retirada do dispositivo era de aproximadamente 4,3 mm.

Os poliuretanos vêm sendo investigados como suporte para diversos tipos de células, inclusive células de tecidos oculares. William et al. (2005) estudaram a possibilidade de utilização de poliuretanos não biodegradáveis, comercialmente disponíveis, como suporte de células epiteliais pigmentares da retina (RPE). Supos-se que estes poliuretanos, denominados Pellethane[®], Tecoflex[®], Zytar[®], permitiriam o estabelecimento de uma monocamada de células RPE, e que seriam posteriormente transplantados no espaço subretiniano como auxiliares na terapia celular.

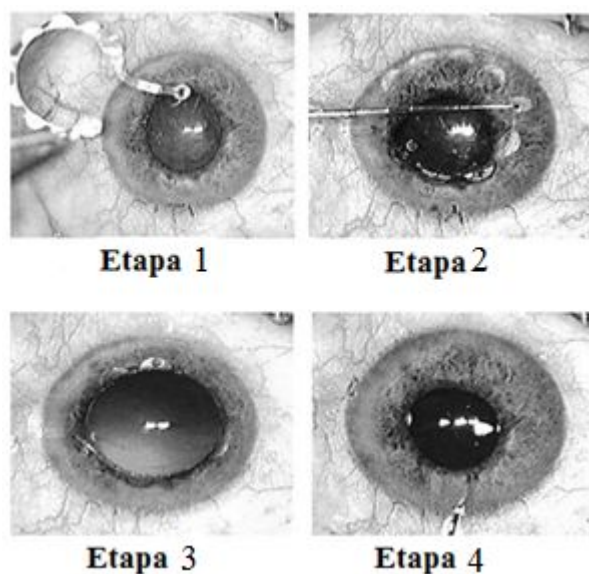


Figura 7 – Fotografias das etapas 1 a 4 de inserção e retirada do dispositivo dilatador da pupila feito de poliuretano. Etapa 1 - a extremidade do dispositivo é introduzida na câmara anterior por meio de uma incisão corneana. Etapa 2 - um instrumento é introduzido na incisão corneana para auxiliar o posicionamento da parte superior do dispositivo. Etapa 3 - a esfíncter da íris é completamente capturada pelo dispositivo, e conseqüentemente, a pupila se dilata. Etapa 4 - o dispositivo é retirado e a pupila retorna ao seu diâmetro original.

Fonte - KERSHNER, 2001

Os resultados obtidos demonstraram que Pellethane[®] e Tecoflex[®] não favoreceram a adesão e proliferação das células RPE, enquanto que sobre o Zytar[®], as células proliferaram e apresentaram morfologia normal. Sugeriu-se que a superfície do Zytar[®], mais hidrofílica que as superfícies dos outros poliuretanos, permitiu o estabelecimento de interações com as proteínas do soro, que são essenciais para a ancoragem inicial das células RPE. Uma vez aderidas, estas células proliferaram e formaram uma monocamada sobre a superfície do biomaterial. Em seguida, os poliuretanos Pellethane[®] e Tecoflex[®] foram tratados com a técnica gás-plasma, com o intuito de aumentar a hidrofília das superfícies destes polímeros devido à incorporação de grupos polares funcionais, que poderiam otimizar a interação com as proteínas do soro requeridas para a adesão celular. Os resultados obtidos foram satisfatórios, uma vez que as células RPE aderiram e proliferaram sobre as superfícies tratadas dos poliuretanos, e formaram uma monocamada de células funcionais.

Atualmente, observa-se uma nova tendência, ou seja, a substituição dos dispositivos de aplicação terapêutica temporária por dispositivos biodegradáveis que poderiam

ajudar o corpo a reparar e regenerar os tecidos danificados. Num sentido mais amplo, surge a necessidade de desenvolvimento de poliuretanos e outros biomateriais biodegradáveis auxiliares em novas tecnologias biomédicas, tais como, a engenharia de tecidos, a medicina regenerativa, os sistemas de liberação controlada de fármacos e as nanotecnologias (NAIR e LAURENCIN, 2007).

A suscetibilidade dos poliuretanos a biodegradação é extremamente dependente da sua composição química, ou seja, da biodegradação dos poli(ésteres) e poli(éteres), presentes no segmento macio. As ligações éster alifáticas em poli(éster uretanos) sofrem degradação hidrolítica (Figura 8), enquanto que os poli(éter uretanos) estão envolvidos em fenômenos degradativos de formação crack e propagação. Adicionalmente, os poli(éter uretanos) que contém metais têm sido objeto de oxidações catalisadas por produtos de corrosão dos componentes metálicos (SANTERRE et al., 2005). As ligações uretano também podem sofrer degradação hidrolítica, mas estudos indicam que grupos hidrolisáveis presentes no segmento macio são preferencialmente clivados, e estes conduzem a taxa de degradação hidrolítica dos poliuretanos (Figura 9) (WANG et al., 1997).

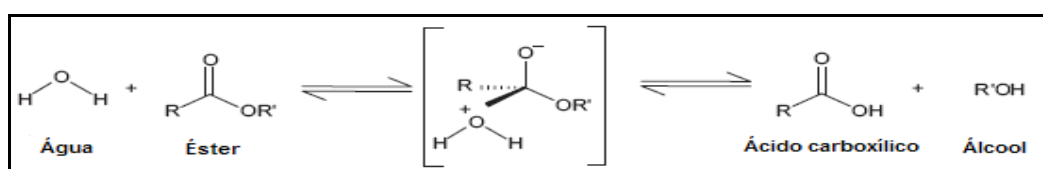


Figura 8 – Hidrólise da ligação éster gerando ácido carboxílico e álcool.

FONTE – TATAI et al., 2007

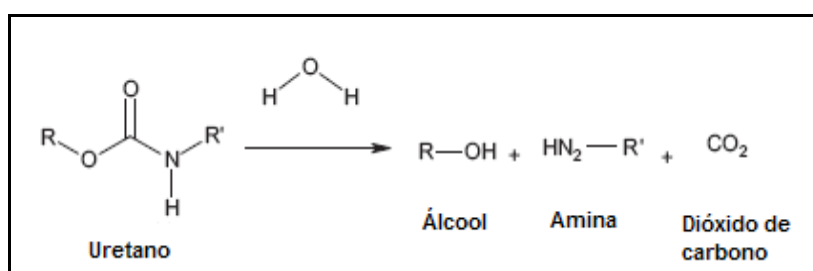


Figura 9 – Hidrólise da ligação uretano gerando álcool, amina e dióxido de carbono.

FONTE – TATAI et al., 2007

As enzimas também promovem a degradação dos poliuretanos. Apesar das enzimas serem planejadas para interações altamente específicas com substratos biológicos particulares, algumas são capazes de reconhecer substratos “não naturais”, tais como

os poliuretanos (SANTERRE et al., 2005). Estudos feitos por Aktusu et al. (1998) demonstraram que as esterases apresentam um domínio hidrofóbico, que possibilita a adsorção na superfície do polímero, e um domínio catalítico, que promove a hidrólise da ligação éster. Estudos realizados por Labow et al. (2002) demonstraram que as enzimas colesterol esterase e carboxil esterase (obtidas a partir da ruptura de macrófagos derivados de monócitos, presentes em abundância em dispositivos removidos do corpo e secretores de muitas enzimas hidrolíticas), foram capazes de degradar poliuretanos e as evidências apontaram uma contribuição significativa das mesmas na degradação *in vivo* de biomateriais poliméricos. Adicionalmente, Wang et al. (1997) investigaram os produtos de degradação de um poliuretano em contato com a enzima colesterol esterase, e concluíram que a clivagem enzimática do poliuretano foi predominantemente associada às ligações éster do segmento macio e não às ligações uretano, o que também ocorre em degradações hidrolíticas dos poliuretanos.

Estudos têm sido realizados a fim de investigar os mecanismos de degradação oxidativa dos poliuretanos. Diferentes condições têm sido exploradas para tentar mimetizar o ambiente oxidativo *in vivo*. Sabe-se que este ambiente oxidativo pode ser formado devido à presença de células do sistema imune, que tentam degradar o biomaterial. Os mecanismos de degradação oxidativa de poliuretanos são totalmente dependentes da constituição química dos segmentos rígidos e macios, e da susceptibilidade dos mesmos em serem oxidados.

A complexidade do ambiente *in vivo* possibilita que outros mecanismos de degradação sejam ativados, além dos hidrolíticos, enzimáticos e oxidativos. Múltiplos parâmetros bioquímicos e celulares podem estar diretamente envolvidos na biodegradação, e quando existem danos provocados pela degradação do biomaterial ou ausência de biocompatibilidade, a resposta inflamatória aguda é iniciada imediatamente, caracterizada pela vasodilatação local transitória e aumento da permeabilidade capilar. Em seguida, há uma fase retardada e subaguda, caracterizada por infiltração de leucócitos e células fagocitárias. Por último, há uma fase proliferativa crônica, na qual ocorrem degeneração tissular e fibrose (MARQUES, 2004).

A avaliação da biocompatibilidade dos biomateriais é realizada por meio de estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Os estudos de citotoxicidade *in vitro* são feitos por meio da análise qualitativa de células colocadas em contato com o biomaterial. Esta análise envolve o exame morfológico das células e os distúrbios homeostáticos celulares, caracterizados por mudanças bioquímicas. Os estudos de citotoxicidade *in vivo* envolvem a implantação do biomaterial no local ao qual se destina. Uma fase inflamatória aguda sempre acontece após a implantação de qualquer material. Se a ação deletéria do material permanece, a resposta crônica se instala, conduzindo a falhas no implante. A avaliação do tipo e extensão da resposta inflamatória é baseada em análises histológicas dos tecidos ao redor do implante. A presença e a quantidade de certos tipos de células, tais como, neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, linfócitos, fibroblastos e células gigantes, na interface do tecido-implante, são indicativas da resposta gerada pelo implante. Estas células, quando ativadas, produzem enzimas hidrolíticas, responsáveis pela lesão tissular (MARQUES, 2004).

Diversos poliuretanos biodegradáveis e biocompatíveis têm sido investigados em diferentes aplicações biomédicas, principalmente na engenharia de tecidos (ADHIKARI et al., 2008; GOGOLEWSKI e GORNA, 2007; CHIA et al., 2006; YEGANEH et al., 2005; GUAN et al., 2005; POUSSARD et al., 2004; GRAD et al. 2003). A extensiva utilização dos poliuretanos nesta área está relacionada com as características extremamente atrativas destes biomateriais, listadas a seguir: (1) porosidade elevada, que permite o estabelecimento e proliferação de células, e também a fácil nutrição destas células pelos vasos sanguíneos; (2) propriedades mecânicas controláveis, pois estas são dependentes da estrutura química, porosidade, método de fabricação, cristalinidade, etc; (3) taxas de degradação controláveis, o que é fundamental pois à medida que a matriz polimérica se degrada, acontece o preenchimento simultâneo do espaço resultante pelo tecido em crescimento; (4) formação de produtos de degradação que podem ser absorvidos ou excretados pelo organismo, e que conseqüentemente não geram efeitos tóxicos para o organismo; (5) excelente biocompatibilidade com os tecidos e hemocompatibilidade (no caso de poliuretanos que estarão em contato direto com o sangue). As tentativas para aumentar a hemocompatibilidade dos poliuretanos se baseiam na inserção de grupos

funcionais carregados negativamente nos segmentos rígidos, que por sua vez, irão repelir as proteínas sanguíneas.

Outras aplicações biomédicas podem ser propostas para os poliuretanos biodegradáveis e biocompatíveis, como por exemplo, a possibilidade de torná-los sistemas de liberação controlada de fármacos, a partir da incorporação prévia destes fármacos. Estes sistemas poderiam ser implantados em órgãos ou tecidos específicos, para o tratamento de doenças crônicas diretamente no sítio de ação. Na oftalmologia, os sistemas de liberação de princípios ativos poderiam ser implantados no olho, e permitiriam o tratamento de doenças oculares graves que acometem o segmento posterior do olho, já que estes dispositivos distribuiriam o princípio ativo no próprio local de ação, em níveis terapêuticos eficazes, por um período de tempo prolongado e com risco mínimo de efeitos colaterais local e sistêmico.

Neste trabalho, poliuretanos biodegradáveis e biocompatíveis, derivados de PCL e PEG, foram produzidos baseados em dispersões aquosas destes polímeros. Acetato de dexametasona, um fármaco antiinflamatório esteroide amplamente utilizado na oftalmologia, foi incorporado às dispersões aquosas dos poliuretanos. A partir desta incorporação, implantes constituídos de poliuretanos biodegradáveis e acetato de dexametasona foram desenvolvidos e explorados como dispositivos intra-oculares de liberação controlada do fármaco, destinados ao tratamento de doenças inflamatórias graves que acometem o segmento posterior do olho.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

- Desenvolver implantes intra-oculares constituídos de poliuretanos biodegradáveis e acetato de dexametasona, destinados à liberação controlada deste fármaco no segmento posterior do olho para o tratamento de doenças oculares inflamatórias graves.

Objetivos específicos

- Desenvolver e caracterizar os implantes à base de poliuretanos e acetato de dexametasona.

- Avaliar o perfil de degradação *in vitro* dos poliuretanos.

- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do acetato de dexametasona a partir dos implantes.

- Avaliar a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* dos poliuretanos.

4 MATERIAIS

Acetato de dexametasona 99,99% - Sigma-Aldrich
Ácido clorídrico 1 mol/L - Merck
Ácido dimetilol propiônico 98,3% – Fluka
Anticorpo primário anti-occludina (*rabbit anti-occludin*) – Zymed Laboratories
Anticorpo secundário Alexa Flúor 488 (*goat anti-rabbit Alexa 488*) – Molecular Probes
Azul de bromofenol
Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltertrazólio – Sigma Chemical
Células epiteliais pigmentares da retina (ARPE-19) – linhagem de células ARPE-19 cedidas pelo Prof. Dr. Hjelmeland (Universidade da Califórnia, EUA)
Dibutil dilaurato de estanho $M_n = 631,55$ g/mol – Miracema Nuodex
Di-n-butilamina
Etanol absoluto – Merck
Faloidina FITC – Sigma-Aldrich
Gel Mount - Biomeda
Glutaraldeído - Sigma-Aldrich
Hexametildisilazina - Sigma-Aldrich
Hidrazina 64% - Arch Química Brasil Ltda.
Iodeto de propídeo - Sigma-Aldrich
Isoforona diisocianato – Desmodur I Bayer
Isopropanol – Merck
LabTek de 4 poços - NuncTM (Nalge Nunc International)
Meio de cultura Dubelcco's modified Eagle meio/Ham's F-12 – Invitrogen-Gibco
Meio de inclusão historesina – Leica Historesin Embedding Kit (7022 31731)
Meio de infiltração historesina – Leica Historesin Embedding Kit (7022 31731)
Metanol - Merck
Ouro - Balzer MD 010
p-formaldeído - Merck Eurolab
Poli(ϵ -caprolactona) diol MM = 1000 g/mol – ToneTM Polyol 2221 Dow
Poli(ϵ -caprolactona) diol MM = 2000 g/mol – ToneTM Polyol 0249 Dow
Poli(etileno glicol) MM = 1500 g/mol – Sigma-Aldrich
Soro fetal bovino – Invitrogen-Gibco
Tetróxido de ósmio - Merck
Trietilamina 98% - Vetec
Tripsina-EDTA – Gibco 25300

Triton X-100 - Sigma-Aldrich

Tolueno - Merck

5 MÉTODOS

5.1 Desenvolvimento e caracterização dos implantes à base de poliuretanos biodegradáveis e acetato de dexametasona

5.1.1 Síntese das dispersões aquosas de poliuretanos (PUD5 e PUD6)

Prepararam-se as dispersões aquosas de poliuretanos (Tabela 1) pelo método convencional do pré-polímero e todo o procedimento de síntese foi realizado em ambiente de N₂. Transferiram-se quantidades exatas de poli(ε-caprolactona) (PCL 1000, PCL 2000), poli(etileno glicol) (PEG 1500) e ácido dimetilol propiônico (DMPA) para o reator. Agitou-se por cerca de 30 minutos, a temperatura de 60 °C, para que os polióis e o DMPA se dissolvessem completamente. Adicionou-se ao reator quantidade exata de isoforona diisocianato (IPDI) para uma razão NCO/OH = 2,3. Aqueceu-se a mistura reacional a 70-75 °C, por 2 horas. Em seguida, adicionou-se o catalisador dibutil dilaurato de estanho (DBDLT) e manteve-se a temperatura a 70-75 °C por 1 hora. Resfriou-se a mistura reacional a 50-60 °C e retiraram-se 10 g do pré-polímero para determinação da porcentagem teórica de grupos NCO residual. A determinação titulométrica dos grupos NCO residuais deve ser próxima à porcentagem teórica, calculada por meio da equação 1 (AYRES, 2006).

$$\%NCO_T = \frac{(n_{NCO} - n_{OH}) \times 42100}{m_{pp}} \quad (1)$$

em que:

$\%NCO_T$ = porcentagem teórica calculada de grupos NCO residuais

n_{NCO} = número de equivalente-grama do isocianato

n_{OH} = somatório do número de equivalente-grama de todos os reagentes hidroxilados

m_{pp} = massa total do pré-polímero

Para realizar a titulação, colocaram-se 50 mL de solução de di-n-butilamina e 10 g do pré-polímero em erlenmeyer de 500 mL. Aqueceu-se até iniciar a ebulição. Após o resfriamento, adicionaram-se 100 mL de metanol e 2 gotas de azul de bromofenol. Titulou-se com ácido clorídrico 1 mol/L até a mudança da cor para amarelo claro. Realizou-se ensaio em branco. Evidenciou-se o ponto de viragem pela mudança de cor de

azul para levemente amarelado. Calculou-se a porcentagem de NCO residual por meio da equação 2 indicada abaixo (AYRES, 2006).

$$\boxed{\%NCO = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) \times f \times 4,202}{P_{amostra}}} \quad (2)$$

em que:

$V_{amostra}$ = volume em mL de HCl 1 mol/L consumido na titulação

V_{branco} = volume em mL de HCl 1 mol/L consumido na titulação de di-n-butilamina

f = fator de correção da concentração de HCl 1 mol/L

$p_{amostra}$ = peso da amostra

Para preparar a solução de di-n-butilamina pesaram-se 206,8 g de di-n-butilamina, adicionou-se quantidade suficiente de tolueno que garantiu a dissolução completa de di-n-butilamina e completou-se o volume para 2 litros com o mesmo solvente (AYRES, 2006).

Adicionou-se trietilamina (TEA) ao pré-polímero com grupos NCO terminais, a fim de neutralizar 100% dos grupos carboxílicos do DMPA. Calculou-se a quantidade de TEA utilizando a equação 3. Manteve-se a temperatura a 40 °C, por 40 minutos, sob agitação vigorosa (AYRES, 2006).

$$\boxed{m = n \times 101} \quad (3)$$

em que:

m = massa de trietilamina

n = número de equivalentes-grama de grupamentos carboxílicos obtidos dividindo-se a massa de DMPA usada no pré-polímero por 134 que é o equivalente grama do DMPA em relação ao grupamento carboxílico

101 = equivalente-grama da trietilamina

Em seguida, dispersou-se o pré-polímero neutralizado em água e imediatamente após adicionou-se a hidrazina (HZ), como extensor de cadeia, para finalização da síntese. Manteve-se a temperatura da dispersão aquosa a 40 °C, por 1 hora. Calculou-se a quantidade de HZ substituindo os termos da equação 4, que leva em consideração a

porcentagem de grupos NCO residuais, encontrada por meio da titulação (AYRES, 2006).

$$m = \frac{\left(\frac{m_{pp}}{100 \times NCO_p} \right) \times \left(\frac{16}{0,64} \right)}{42} \quad (4)$$

em que:

m = massa de hidrazina (equivalente = 16 g/mol e concentração de 64%)

m_{pp} = massa de pré-polímero

NCO_p = %NCO obtido na titulação

42 é o equivalente-grama do grupamento NCO

Como descrito na Tabela 1, produziram-se dois tipos de dispersões aquosas de poliuretanos: (1) PUD5 contendo apenas poli(ϵ -caprolactona) no segmento macio e (2) PUD6 contendo poli(ϵ -caprolactona) e poli(etileno glicol) no segmento macio. Na Figura 10 é mostrada uma representação esquemática da síntese de PUD5 e PUD6 (AYRES, 2006).

Tabela 1 – Formulação (% em massa) das dispersões aquosas de poliuretano^a

	IPDI	PCL 1000	PCL 2000	PEG 1500	DMPA	TEA	H ₂ O	HZ	NCO _T %	NCO _P %
PUD-5	8,58	4,85	9,09	-	0,97	0,73	74,70	1,08	7,80	7,58
PUD-6	8,58	4,85	8,36	0,73	0,97	0,73	74,70	1,08	7,88	7,50

^a 0,01 % de DBDLT baseado nas quantidades de IPDI, PEG e DMPA

% NCO_T – porcentagem de grupos NCO terminais calculada pela equação (1).

% NCO_P – porcentagem de grupos NCO terminais calculada pela equação (2) após titulação da amostra.

5.1.2 Incorporação do acetato de dexametasona (ACT)

Dissolveram-se 300 mg de ACT nas dispersões aquosas de poliuretanos, por meio de agitação vigorosa por 60 minutos, visando obter concentração de 5% (p/p) de fármaco.

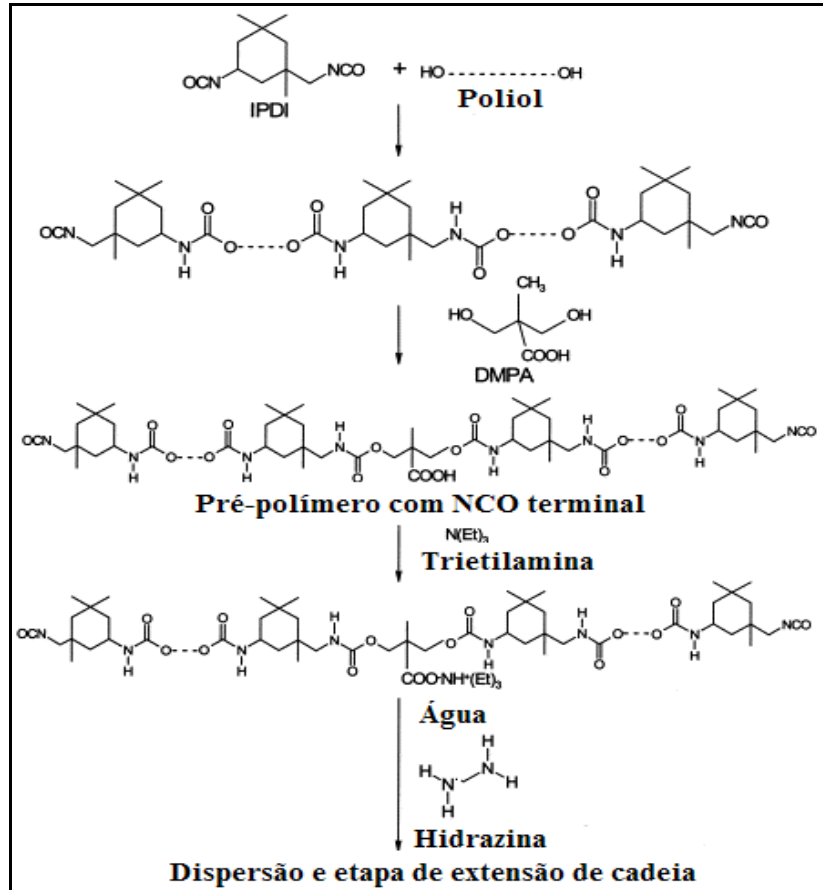


Figura 10 – Representação esquemática da síntese das dispersões aquosas de poliuretanos (PUD5 e PUD6).

5.1.3 Formação dos implantes de poliuretanos e acetato de dexametasona

As dispersões aquosas de poliuretanos que continham ACT dissolvido foram transferidas para moldes de Teflon® e deixadas a temperatura ambiente por 7 dias. Em seguida, os filmes formados foram colocados em estufa e mantidos a 60 °C, por 24 horas, para a pós-cura. Prepararam-se também filmes sem ACT. Os filmes foram cortados no formato de círculos de 4,5 mm de diâmetro (Figura 11).

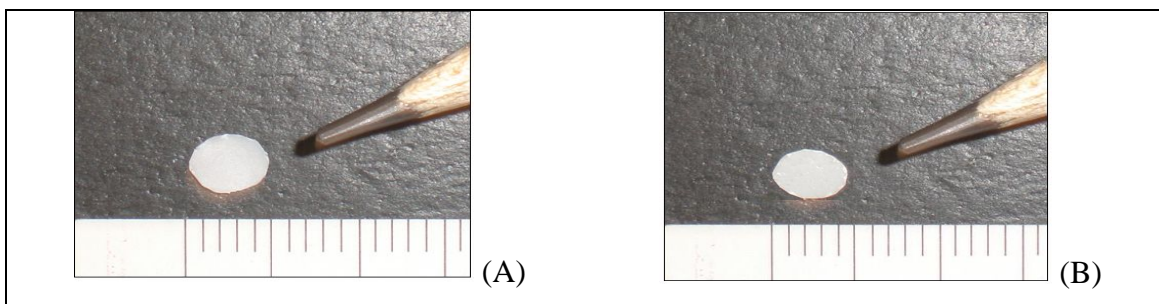


Figura 11 – Implantes constituídos dos poliuretanos [(A) PUD5 e (B) PUD6] e de acetato de dexametasona.

5.1.4 Caracterização dos implantes de poliuretanos e acetato de dexametasona

5.1.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 1000. Obtiveram-se os espectros dos filmes usando-se a técnica de Reflexão Total Atenuada (ATR), na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} , a partir de 32 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} .

5.1.4.2 Difração de raios-X (XRD)

A difração de raios-X foi realizada em difratômetro de raios-X Philips modelo PW 3710 com alvo de cobre ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) e equipado com filtro de níquel. Foram feitas varreduras a partir de 2θ na faixa de 1 a 90° a uma taxa de $1^\circ/\text{min}$.

5.1.4.3 Espalhamento de raios-X em baixo ângulo (SAXS)

Os espectros de espalhamento de raios-X em baixo ângulo foram coletados usando a linha SAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Brasil). As condições de análise foram: $\lambda = 1,608 \text{ \AA}$ e tempo de coleta de 900 s. Os espectros foram corrigidos quanto ao background (espectro parasita) e não homogeneidade do detector.

5.2 Estudo de degradação *in vitro* dos poliuretanos

5.2.1 Degradação *in vitro* dos poliuretanos

A degradação *in vitro* dos filmes de poliuretanos foi realizada em incubadora, a 30 rpm e 37°C . Colocaram-se os filmes ($n = 3$ para cada poliuretano) em frascos de vidro contendo 3 mL de PBS. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, os filmes foram removidos do PBS, lavados com água deionizada e secadas por 48 horas em dessecador à vácuo a temperatura ambiente. A perda de massa foi calculada por meio da equação 5 (GUAN et al., 2005). Os resultados obtidos foram expressos como sendo a média \pm desvio padrão.

$$\text{Perda de massa (\%)} = 100 \times m_i / m_f \quad (5)$$

em que:

m_i = massa inicial do poliuretano

m_f = massa final do poliuretano no intervalo de tempo pré-estabelecido

5.2.2 Caracterização dos poliuretanos degradados

Os filmes de poliuretanos degradados foram caracterizados por meio das técnicas de FTIR, XRD e SAXS conforme descrito anteriormente.

5.2.3 Teste de citotoxicidade dos produtos de degradação

Avaliou-se a viabilidade de células humanas do epitélio pigmentoso da retina (ARPE-19) em contato com os produtos de degradação dos poliuretanos por meio da dosagem colorimétrica baseado na conversão mitocondrial do sal de tetrazólio (MTT). As células foram semeadas na densidade de 2×10^4 em placas de poliestireno de 96 poços. Após 24 horas, incubaram-se as células em uma mistura de solução contendo os produtos de degradação do poliuretano, coletada após 4 meses de degradação, e meio de cultura DMEM contendo 10% de SFB, nas proporções de 1:10 e 3:10 (GUAN et al., 2005). Após 48 horas, removeu-se o meio de incubação e adicionaram-se 100 μ L de sal de tetrazólio (1 mg/mL em PBS) em cada poço. Após 2 horas de incubação a 37 °C, as células foram lisadas com 100 μ L de isopropanol, e os valores de absorvância foram medidos a 570 nm versus 630 nm usando o leitor BioRad (San Diego, CA) (VALAMANESH et al., 2007). Os resultados obtidos foram expressos como sendo a média \pm desvio padrão. Os dados foram avaliados quanto à normalidade e a significância estatística foi investigada por meio da análise de variância de uma classificação (ANOVA). Valor p menor que 0,05 foi considerado significativo.

5.3 Estudo de liberação *in vitro* do acetato de dexametasona a partir dos implantes

A liberação *in vitro* do acetato de dexametasona a partir dos implantes foi realizada em incubadora, a 30 rpm e 37 °C. Colocaram-se os implantes (n = 4 para cada implante) em frascos de vidro contendo 3 mL de PBS. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, 1 mL

do meio de incubação foi coletado e 1 mL de PBS recém preparado foi adicionado a cada frasco. Quantificou-se o acetato de dexametasona liberado no meio por cromatografia líquida de alta eficiência (GARCIA et al., 2003). O método analítico foi previamente validado considerando os seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão e limites de quantificação e detecção. A porcentagem de fármaco liberado a cada tempo foi expressa como sendo a média \pm desvio padrão. Os dados obtidos para PUD5 e PUD6 foram avaliados quanto à normalidade e a significância estatística foi investigada por meio do teste t de Student. Valor p maior que 0,05 foi considerado significativo. Observou-se que o tempo de retenção do acetato de dexametasona liberado a partir dos implantes era particularmente idêntico ao tempo de retenção do fármaco padrão. Considerando este fato, sugeriu-se que o acetato de dexametasona liberado dos implantes se apresentava íntegro e ativo no meio de incubação.

5.4 Estudo de biocompatibilidade in vitro dos poliuretanos

5.4.1 Cultura de células ARPE-19 sobre os poliuretanos

Os filmes de poliuretanos foram esterilizados por meio da exposição à luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) por 60 minutos cada lado. Os filmes esterilizados foram caracterizados por meio da técnica FTIR. Os espectros FTIR obtidos revelaram que as absorções típicas dos poliuretanos foram preservadas após a exposição à luz ultravioleta. Os filmes esterilizados foram transferidos para o LabTek de 4 poços. Incubaram-se as células sobre os poliuretanos e controle de poliestireno na densidade de 2×10^4 células/poço. Utilizou-se o meio de cultura DMEM associado a 10% de SFB. Mantiveram-se as placas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂.

5.4.2 Adesão celular sobre os poliuretanos

Após 8 horas de incubação, aspirou-se o meio de cultura e lavaram-se as células sobre os filmes de poliuretanos e do controle com PBS (n = 3 para cada poliuretano e controle). Fixaram-se as células com uma solução de para-formaldeído 4% em PBS por 15 minutos. As células fixadas foram lavadas novamente com PBS por 5 minutos, e imersas em solução Triton X-100 0,3% em PBS por 15 minutos. Após lavagem com PBS por 5

minutos, os núcleos das células foram marcadas com solução de iodeto de propídeo em PBS (1:100) por 10 minutos, a temperatura ambiente. Finalmente, lavaram-se as células com PBS, por 5 vezes consecutivas, em intervalos de 5 minutos, e 1 vez com água destilada. Montaram-se as lâminas utilizando Gel Mount. As células foram visualizadas por meio do microscópio Olympus IX70 acoplado à câmara digital. Cinco campos foram fotografados por poliuretano e controle (total de 15 campos por superfície). Contaram-se os núcleos de cada campo de visão. O número médio de núcleos na superfície do controle foi estabelecido como sendo 100% e o número médio de núcleos \pm desvio padrão em cada superfície polimérica foi calculado como sendo a porcentagem em relação ao controle. Os dados obtidos para controle e poliuretanos foram avaliados quanto à normalidade e a significância estatística foi investigada por meio da análise de variância de uma classificação (ANOVA). Valor p menor que 0,05 foi considerado significativo. Os dados obtidos para os poliuretanos PUD5 e PUD6 foram comparados estatisticamente por meio do teste t de Student. Valor p maior que 0,05 foi considerado significativo.

5.4.3 Proliferação celular sobre os poliuretanos

Após 1, 2, 7 e 15 dias em cultura, as células sobre os filmes de poliuretanos e controle foram submetidas ao mesmo procedimento descrito no item *Adesão celular sobre os poliuretanos*. Os resultados obtidos foram expressos como sendo a média do número de núcleos \pm desvio padrão em cada superfície polimérica e controle. Os dados obtidos para controle e poliuretanos foram avaliados quanto à normalidade e a significância estatística foi investigada por meio da análise de variância de uma classificação (ANOVA). Valor p menor que 0,05 foi considerado significativo. Os dados obtidos para os poliuretanos PUD5 e PUD6 foram comparados estatisticamente por meio do teste t de Student. Valor p maior que 0,05 foi considerado significativo.

5.4.4. Microscopia eletrônica de varredura

Após 1 dia em cultura, as células sobre os filmes de poliuretanos foram fixadas em solução de glutaraldeído 4% em PBS por 60 minutos a temperatura ambiente. Lavaram-se as células com PBS, por 3 vezes consecutivas, em intervalos de 10 minutos, a temperatura ambiente. Procedeu-se pós-fixação com a solução de tetróxido de ósmio 2% em PBS (1:1) por 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram desidratadas

numa série etanólica progressiva (50, 70, 95 e 100%), a 4 °C, em intervalos de 5 minutos e 2 vezes consecutivas para cada concentração de etanol. Em seguida, os filmes de poliuretanos, contendo as células, foram transferidos para dessecador e foram embebidos em hexametildisilazano, para induzir a secagem das células. Em seguida, os filmes foram colados num suporte de alumínio e as células foram metalizadas com ouro por meio de pulverização catódica. As células foram examinadas por meio do microscópio eletrônico JEOL 840A a 10 kV. Este procedimento foi realizado conforme instruções do Serviço de Microscopia Eletrônica da Universidade Pierre e Marie CURIE – Paris VI.

5.4.5 Imunofluorescência

Após 7 em cultura, as células sobre os filmes de poliuretanos e controle foram submetidas ao mesmo procedimento descrito no item *Adesão celular sobre os poliuretanos*. Após a marcação dos núcleos com iodeto de propídeo, as fibras de actina foram marcadas com uma solução de Faloidina FTIC em PBS (1:250) por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas, inseridas em Gel Mount e fotografadas utilizando o microscópio Olympus IX70 acoplado à câmara digital.

Após 15 dias em cultura, as células sobre os filmes de poliuretanos e controle foram fixadas em solução de para-formaldeído 4% em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. As células fixadas foram incubadas em solução Triton X-100 0,1% em PBS por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se a solução do anticorpo primário anti-occludina (*rabbit anti-occludin*) em PBS contendo 0,1% de Triton X-100 (1:100) por 60 minutos. Lavaram-se as células com PBS, 2 vezes consecutivas, por 10 minutos, e adicionou-se a solução do anticorpo secundário Alexa Flúor 488 (*Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit*) por 60 minutos, ao abrigo da luz. Finalmente, as células foram lavadas com água destilada, inseridas em Gel Mount e fotografadas utilizando o microscópio Olympus IX70 acoplado à câmara digital.

5.5 Estudo de biocompatibilidade in vivo dos poliuretanos

5.5.1 Animais

Utilizaram-se 16 ratos da raça Lewis fêmeas, com idade média de 2 meses e pesando entre 100 e 120 g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com ração e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura e umidade controladas. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) para uso de animais em pesquisa em oftalmologia. Este estudo também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais.

5.5.2 Implantação dos poliuretanos no espaço subretiniano e corpo vítreo

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, utilizou-se um microscópio de operação (OM-5, TAKAGI, Nagano, Japão). Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de cloridrato de cetamina (80 mg/kg) e cloridrato de xilasina (20 mg/kg) e os olhos receberam anestesia local de oxibuprocaina 0,4%. A pupila foi dilatada usando tropicamida (Mydrin P 1%). Para introdução do poliuretano no espaço subretiniano, realizou-se incisão na conjuntiva no quadrante temporal superior. Realizou-se incisão na esclera à 2 mm do limbo, e em seguida, uma incisão na coróide. Uma tesoura microcirúrgica foi utilizada para revelar o espaço subretiniano. O poliuretano foi introduzido no espaço subretiniano em direção ao pólo posterior. A esclera e conjuntiva foram suturadas com fio absorvível. Para introdução do poliuretano no vítreo, realizou-se incisão na conjuntiva no quadrante temporal superior. Realizou-se incisão na esclera à 2 mm do limbo. Introduziu-se o poliuretano no vítreo. A esclera e conjuntiva foram suturadas com fio absorvível. Imediatamente após a cirurgia, o fundo do olho foi examinado para verificar se houveram danos na retina ou sinais de hemorragia. Os animais que apresentaram estes problemas foram removidos do estudo e não foram incluídos nos resultados.

5.5.3 Avaliação histopatológica

Os ratos foram sacrificados com dose letal de pentobarbital (100 mg/kg) 2 semanas após a implantação, e os olhos foram imediatamente enucleados e fixados com solução de para-formaldeído 4% e glutaraldeído 0,5% em PBS por 2 horas. Os bulbos oculares fixados foram lavados com PBS por 2 horas, e desidratados com etanol 70% e 95% por 2 horas cada concentração. Em seguida, realizou-se uma incisão próxima à junção córnea-

esclera, incubaram-se os bulbos em uma mistura de etanol 95% e meio de infiltração historesina (1:1) por 2 horas. Finalmente, incubaram-se os bulbos em meio de infiltração historesina por 12 horas à temperatura de 4 °C. Ao término do tempo previsto, os bulbos foram inseridos no meio de inclusão historesina, que por sua vez, estava presente num molde plástico. Aguardou-se a polimerização do meio de inclusão historesina, e então, colocou-se a tampa sobre o molde plástico. Esta tampa apresentava um orifício central que possibilitou a introdução de pequena quantidade de meio de inclusão historesina. Aguardou-se novamente a polimerização do meio de inclusão recém acrescentado. Transferiu-se o molde plástico com tampa para banho de gelo, por 30 minutos, e em seguida, transferiu-se para estufa a 37 °C por 24 horas. As seções semifinas de 5 µm de espessura foram coradas com azul de toluidina para análise por microscopia de luz (microscópio Olympus IX70 acoplado à câmara digital).

Preparou-se o meio de infiltração historesina conforme instrução do fabricante (Leica): acrescentou-se 0,5 g de peróxido de dibenzofila (Activator) em 50 mL de 2-(hidroxietil)-metacrilato (Basic Resin), sob agitação. O meio de infiltração historesina foi conservado a 4 °C e ao abrigo da luz.

Os procedimentos acima descritos para realização do *Estudo de bicompatibilidade in vitro dos poliuretanos* (exceto a Microscopia Eletrônica de Varredura) e do *Estudo de bicompatibilidade in vivo dos poliuretanos* foram fornecidos pelo Laboratório de Histopatologia de Doenças Oculares e Inovações Terapêuticas pertencente ao Instituto Nacional de Saúde e Pesquisa Médica (INSERM) e localizado no Instituto de Cordelier – Paris.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento e caracterização dos implantes à base de poliuretanos biodegradáveis e acetato de dexametasona

Na Figura 12 estão representados os espectros FTIR para PUD5 puro (Figura 12-a), ACT puro (Figura 12-b), PUD5 contendo ACT (Figura 12-c) e o resultado da subtração espectral entre PUD5 contendo ACT e PUD5 puro (Figura 12-d). Absorções típicas de poliuretanos foram detectadas no espectro das Figuras 12-a e 12-c, tais como (JEAN et al., 2007): 3297 cm^{-1} - estiramento de amins primárias que participam de ligações de hidrogênio; $2921\text{-}2851\text{ cm}^{-1}$ - estiramento dos grupos -CH_2 assimétrico e simétrico; $\sim 1450\text{ cm}^{-1}$ - deformação do grupo -CH_3 ; 1730 cm^{-1} - estiramento dos grupos carbonila presentes no uretano, uréia e éster. Não foram detectadas bandas em aproximadamente 3500 cm^{-1} que corresponderiam às amins livres, significando que todas as amins formaram ligações de hidrogênio com grupos polares, tais como as carbonilas dos grupos uretano, uréia e éster. O espectro equivalente à subtração espectral entre PUD5 contendo ACT e PUD5 puro (Figura 12-d) evidenciou as bandas de absorção referentes ao ACT, que também foram observadas no espectro correspondente ao ACT puro (Figura 12-b). Absorções típicas do ACT foram detectadas, tais como: $1650\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ - estiramento dos grupos carbonila presentes no éster e cetona; $\sim 882\text{ cm}^{-1}$ - deformação do grupo C-F.

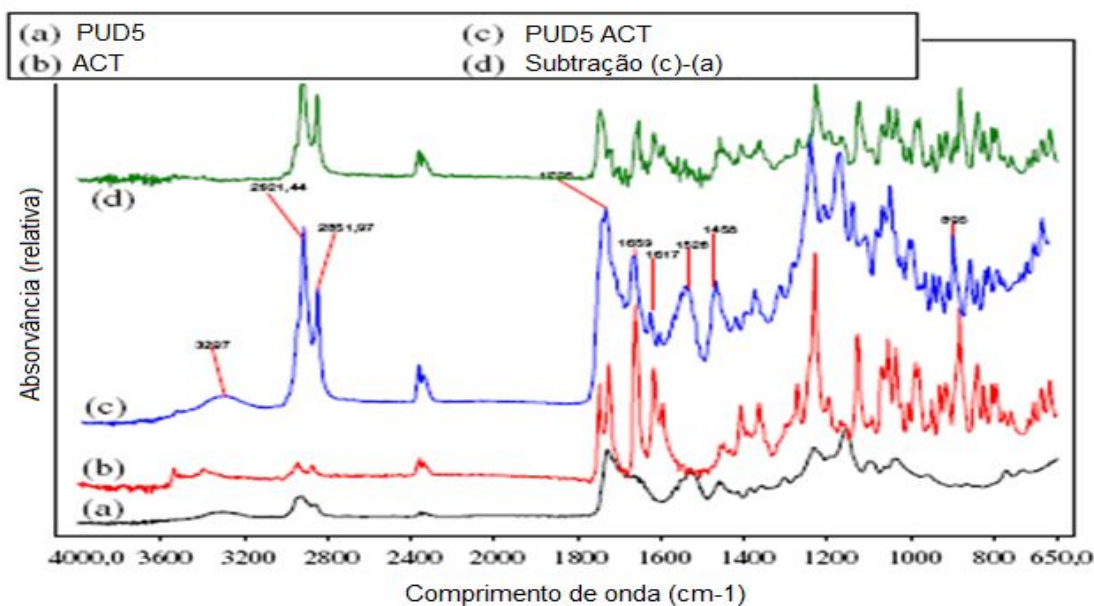


Figura 12 – Espectros FTIR do PUD5 puro (12-a), ACT puro (12-b), PUD5 contendo ACT (12-c) e subtração espectral entre PUD5 contendo ACT e PUD5 puro (12-d).

Na Figura 13 estão representados os espectros FTIR para PUD6 puro (Figura 13-a), ACT puro (Figura 13-b), PUD6 contendo ACT (Figura 13-c). Absorções típicas de poliuretanos foram detectadas no espectro das Figuras 13-a e 13-c, tais como: 3329 cm^{-1} - estiramento de amins primárias que participam de ligações de hidrogênio; $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ - estiramento dos grupos -CH_2 assimétrico e simétrico; $\sim 1460\text{ cm}^{-1}$ - deformação do grupo -CH_3 ; 1730 cm^{-1} - estiramento dos grupos carbonila presentes no uretano, uréia, éster e éter. Uma banda pouco intensa foi detectada em aproximadamente 3500 cm^{-1} que corresponde às amins livres, ou seja, que não participaram de ligações de hidrogênio com grupos polares. Observou-se também uma banda intensa em 1101 cm^{-1} , característica de deformação axial assimétrica da ligação C-O-C de éteres alifáticos, que ocorre entre 1150 e 1085 cm^{-1} (SILVERSTEIN, 2000). Absorções típicas do ACT foram detectadas no espectro da Figura 13-c, semelhantes aquelas presentes no espectro da Figura 13-b, a saber: $1650\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ - estiramento dos grupos carbonila presentes no éster e cetona e $\sim 893\text{ cm}^{-1}$ - deformação do grupo C-F.

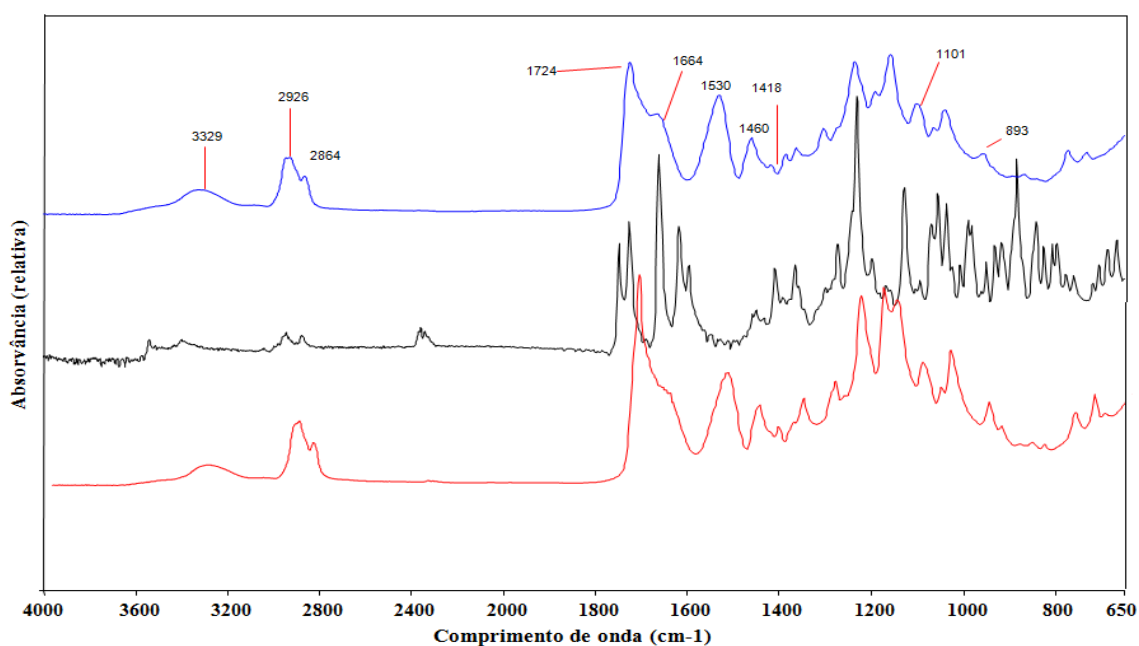


Figura 13 - Espectros FTIR do PUD6 puro (13-a), ACT puro (13-b), PUD6 contendo ACT (13-c).

Os resultados obtidos a partir da análise dos espectros FTIR indicaram que as absorções típicas dos grupos funcionais do ACT foram preservadas após incorporação aos sistemas poliméricos, sugerindo que a integridade química do fármaco foi mantida. Além disso, estes resultados também demonstraram o sucesso do método de incorporação do ACT nos sistemas poliméricos.

Na Figura 14 está representado o padrão de difração de raios-X (XRD) para PUD6 puro (Figura 14-a). Bandas de difração amplas foram observadas em $2\theta = 20^\circ$ e $2\theta = 40^\circ$, demonstrando a natureza amorfa deste polímero segmentado. A detecção da natureza amorfa do PUD6 deveu-se à presença da poli(ϵ -caprolactona) de baixa massa molecular (MM = 1,000 e 2,000 g/mol), incapaz de cristalizar como poli(ϵ -caprolactonas) de alta massa molecular. Na Figura 14, os padrões XRD de PUD6 contendo ACT (Figura 14-b) e ACT puro (Figura 14-c) também estão representados. Os picos de difração do ACT não puderam ser visualizados no padrão XRD do PUD6 ACT (Figure 14-b), sugerindo a inexistência de aglomerados cristalinos do fármaco dentro da estrutura polimérica, e indicando também que o ACT se encontrava disperso e dissolvido na matriz. O mesmo tipo de resultado foi obtido para PUD5 puro e PUD5 contendo ACT.

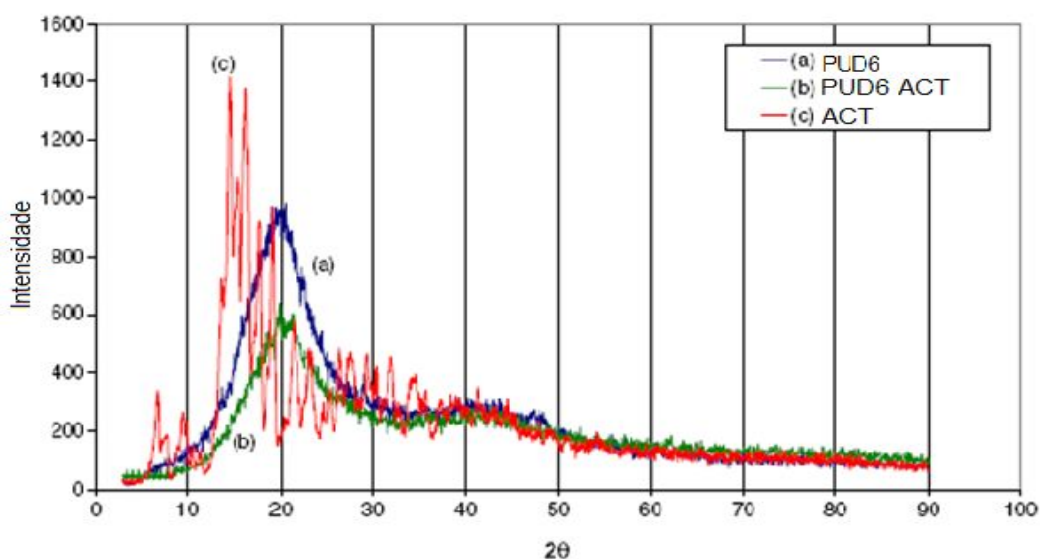


Figura 14 – Padrões XRD para PUD6 puro (14-a), PUD6 contendo ACT (14-b) e ACT puro (14-c).

O espalhamento de raios-X em baixo ângulo (SAXS) é uma técnica de caracterização amplamente utilizada para avaliar a morfologia de nanocompósitos poliméricos, copolímeros em bloco e polímeros segmentados (ORÉFICE et al., 2005; CHU et al., 2001). SAXS aplicado a poliuretanos, por exemplo, fornece uma série de informações relacionadas à síntese dos polímeros e as mudanças na morfologia das fases em função da composição química dos sistemas (AYRES, 2006).

Uma segunda fase de dimensões coloidais em uma matriz de densidade eletrônica constante apresenta espalhamento de raios-X em baixo ângulo se existir diferenças de densidades eletrônicas entre as fases. Para sistemas bifásicos, como sistemas poliméricos constituídos de microfases separadas, a invariante Q descreve a variação de densidade eletrônica em todo o polímero e fornece uma boa estimativa do grau de separação das fases (LI et al., 2002). A invariante Q pode ser obtida pela integração $q^2 I(q)$ dos ângulos de espalhamento. A invariante Q pode ser definida pela equação (6).

$$Q = \int_0^{\infty} I(q) q^2 dq = 2\pi^2 V (\Delta\eta)^2 \varphi(1 - \varphi), \quad (6)$$

em que:

$I(q)$ = intensidade do feixe de espalhamento

$q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$, sendo θ o ângulo de espalhamento, λ o comprimento de onda do feixe de raios-X.

$\Delta\eta$ = média do contraste de densidade eletrônica

Φ = volume da fração de fase dispersa

V = volume de irradiação

Neste trabalho, SAXS foi utilizado para fornecer informações a respeito do efeito da arquitetura macromolecular dos poliuretanos na morfologia dos polímeros e no fenômeno de separação de microfases. SAXS foi também utilizado para estudar como a incorporação de ACT nos sistemas poliméricos afetou a morfologia. Além disso, SAXS foi aplicada para analisar a estrutura de nanodomínios criada pela separação de microfases derivada da baixa compatibilidade entre os segmentos macio e rígido das cadeias dos poliuretanos e como estes domínios foram modificados pela incorporação do fármaco.

Os dados de espalhamento de raios-X de baixo ângulo em função do vetor de espalhamento (q) para os sistemas PUD5 e PUD6 são apresentados na Figura 15. As curvas de espalhamento para o PUD5 puro (Figura 15-a) apresentou um pico de espalhamento pouco intenso e amplo em valores de q próximos a $0,72 \text{ nm}^{-1}$. O valor de q

na altura máxima do pico (q_{\max}) pode ser convertido na distância entre fases (L) por meio da equação de Bragg ($L = 2\pi/q_{\max}$, $L \sim 8,7$ nm para PUD5). Este pico de espalhamento está relacionado com a separação de fase típica de poliuretanos, na qual os domínios rígidos, baseados em ligações uretano, não foram compatíveis com os domínios macios, baseados em unidades polióis. O formato da curva de espalhamento para PUD5 foi alterada após a incorporação do ACT (Figura 15-b). O pico de espalhamento, gerado devido ao processo de separação de fases nos poliuretanos, se tornou menos perceptível para PUD5 contendo ACT. Além disso, as intensidades de espalhamento em valores baixos de q aumentaram quando o ACT foi incorporado ao PUD5. Estes fatos podem ser associados com a presença de novas regiões de espalhamento e estruturas menos definidas com diferentes tamanhos, uma vez que o ACT provavelmente interagiu com os segmentos macios e rígidos do PUD5, alterando o curso do processo de separação de microfases, levando à estabilização da nova nanoestrutura do sistema. A fim de revelar com mais detalhes os picos de espalhamento escondidos pelo background, um procedimento matemático foi usado para filtrar os dados de espalhamento relacionados com a difração de Bragg dentro de um background devido ao espalhamento do tipo Guinier (KOO et al., 2002). Este procedimento matemático envolve ajustar, à curva experimental, uma combinação de fatores ligados a um decaimento exponencial (espalhamento de Guinier) e uma função Gaussiana (capaz de identificar os picos de difração de Bragg). Na Figura 16 está demonstrada a utilidade deste procedimento matemático em aumentar a resolução dos picos de espalhamento para os sistemas PUD5 e PUD6. Observou-se que o pico de espalhamento principal do PUD5 se deslocou para valores menores de q após a incorporação do ACT. Este deslocamento para q menor pode significar que as moléculas do ACT podem ter interagido com os segmentos do poliuretano, levando à densificação dos domínios rígidos hidrofílicos, e conseqüentemente, ao estiramento das cadeias dos domínios macios (VELANKAR et al., 2000).

Na Figura 15 também estão representadas as curvas de espalhamento para PUD6 (Figura 15-c) e PUD6 contendo ACT (Figura 15-d). Observou-se que a introdução de ACT não alterou significativamente o perfil de espalhamento do sistema PUD6, sugerindo que a morfologia deste poliuretano não apresentou modificações detectáveis após a introdução do fármaco. Estes dados de espalhamento associados com PUD6 e PUD6 ACT também

foram convertidos matematicamente a fim de permitir a identificação de picos de espalhamento fracos, tais como o pico em $0,28 \text{ nm}^{-1}$ ($L = 22 \text{ nm}$) (Figura 16).

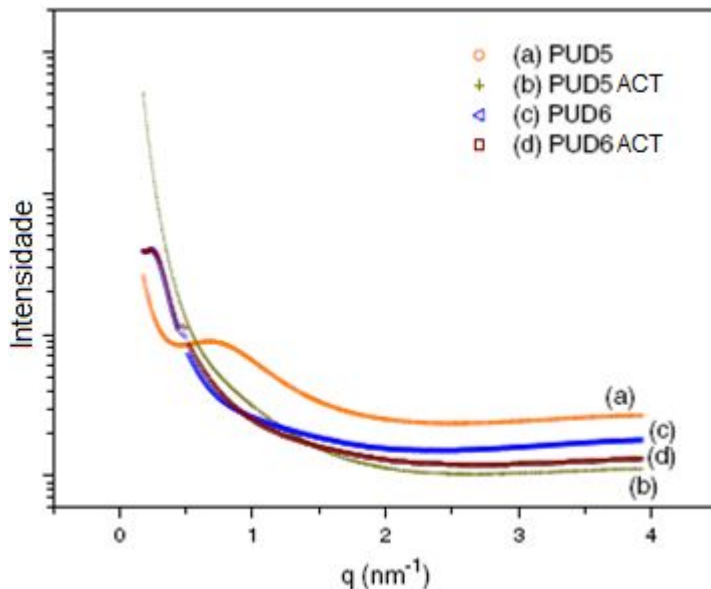


Figura 15 – Curvas SAXS para PUD5 puro (15-a), PUD5 contendo ACT (15-b), PUD6 puro (15-c) e PUD6 contendo ACT (15-d).

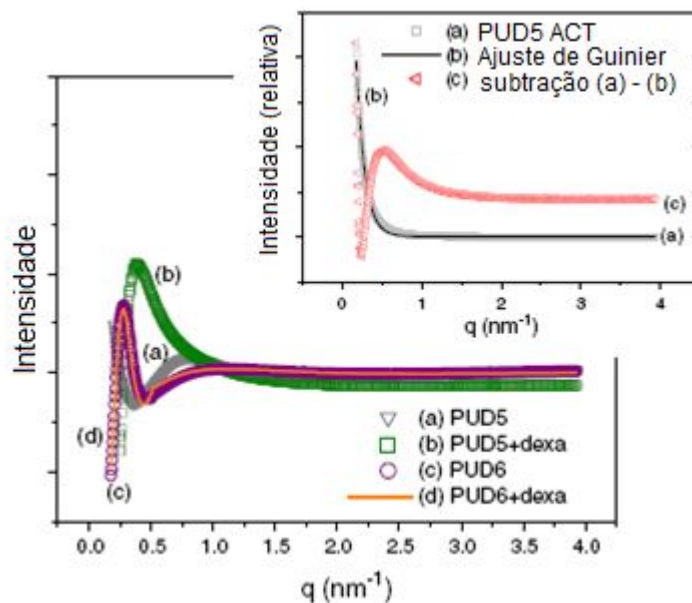


Figura 16 – Dados SAXS processados por tratamento matemático para aumentar a resolução dos picos de espalhamento pequenos. No topo da figura: exemplo de como os dados SAXS foram explorados neste trabalho para aumentar a resolução de picos de espalhamento pequenos: (16-a) dados SAXS originais; (16-b) ajuste de Guinier dos dados originais; (16-c) resultado da subtração entre os dados originais e ajuste Guinier.

O grau de separação de microfases em poliuretanos pode ser estudado mais eficientemente pelo cálculo da invariante Q (equação 6). Na Figura 17 estão representados os resultados deste tipo de cálculo em função do vetor de espalhamento q para os sistemas PUD5 e PUD6. Valores mais altos da invariante Q foram obtidos para o poliuretano PUD5 contendo ACT, indicando que esta amostra possui fases com densidades eletrônicas mais bem definidas e que espalhou significativamente raios-X. Estes resultados também sugeriram que a incorporação de ACT no PUD5 conduziu a um rearranjo das fases, nas quais as moléculas do fármaco poderiam estar preferencialmente próximas dos domínios rígidos hidrofílicos, e, portanto, aumentaram a diferença de densidade eletrônica, enquanto que a presença de ACT em PUD6 não provocou mudança na separação de fases do PUD6 puro, possivelmente porque as moléculas do ACT foram distribuídas ao longo dos segmentos macios e rígidos.

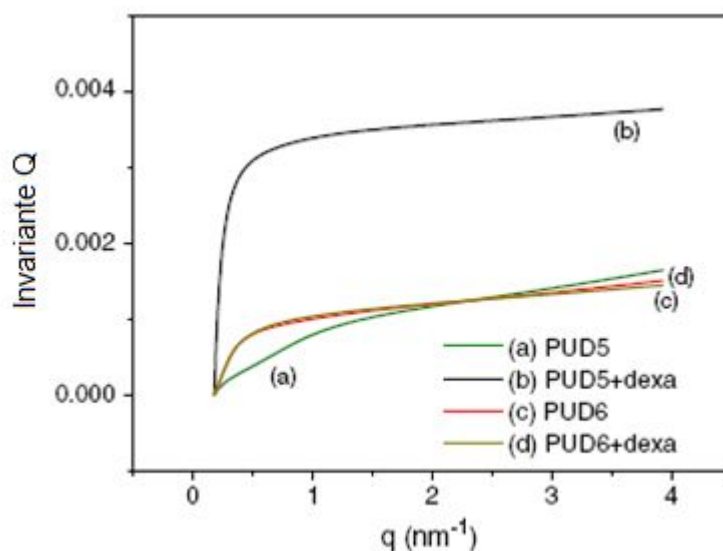


Figura 17 – Invariante Q extraída dos dados de espalhamento SAXS para PUD5 e PUD6 contendo ACT.

Conclui-se, portanto, que foi possível incorporar o ACT nos poliuretanos biodegradáveis. As dispersões aquosas de poliuretanos permitiram a incorporação do princípio ativo por simples mistura, a temperatura ambiente, sem a necessidade de uso de solventes. Esta característica é considerada extremamente interessante, pois pode ser aplicada a outros princípios ativos termolábeis ou frágeis. Os resultados FTIR sugeriram que o fármaco introduzido às matrizes poliméricas não apresentou modificações químicas detectáveis. Os resultados SAXS possibilitaram a identificação dos efeitos da incorporação do ACT na morfologia dos polímeros. A incorporação do fármaco no

PUD5 (sistema que contém apenas PCL no segmento macio) conduziu a uma nova morfologia do sistema, enquanto que alterações significativas não foram detectadas na nanoestrutura do PUD6 (sistema que contém PCL e PEG no segmento macio).

6.2 Estudo de degradação *in vitro* dos poliuretanos

Na Figura 18 estão representados os padrões de difração de raios-X (XRD) para o PUD5 não submetido ao processo de degradação e para o PUD5 após 4 meses de biodegradação. É possível observar que o PUD5 apresentava uma natureza basicamente amorfa e se tornou parcialmente cristalina após incubação. Uma explicação para este fato é que provavelmente a hidrólise das ligações químicas da PCL resultou na quebra de cadeias poliméricas, permitindo o empacotamento mais eficiente destas cadeias e a formação dos cristalitos. Na Figura 18 também está representado o padrão XRD para a PCL pura. Este padrão foi incluído para demonstrar que a fase cristalina gerada a partir da hidrólise do poliuretano pode estar associada com uma fase cristalina da PCL.

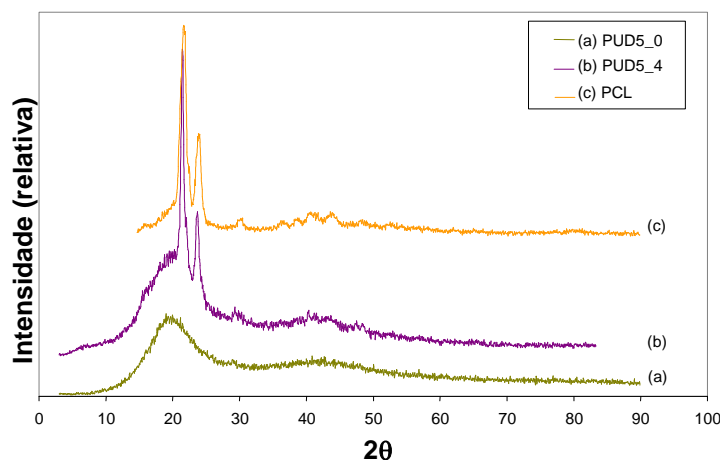


Figura 18 - Padrões XRD para PUD5 não degradado (PUD5_0) (18-a), PUD5 submetido à biodegradação por 4 meses (18-b) (PUD5_4). O padrão XRD para a PCL pura (18-c) foi incluído como referência.

Na Figura 19 estão representados os padrões XRD para o PUD6 não submetido ao processo de degradação e para o PUD6 após 4 meses de biodegradação. Como observado para o PUD5, os segmentos macios do PUD6 provavelmente se cristalizaram devido à hidrólise das ligações éster da PCL. A quebra destas ligações permitiu maior mobilidade e liberdade das cadeias de pequena massa molecular, levando ao seu empacotamento numa estrutura cristalina.

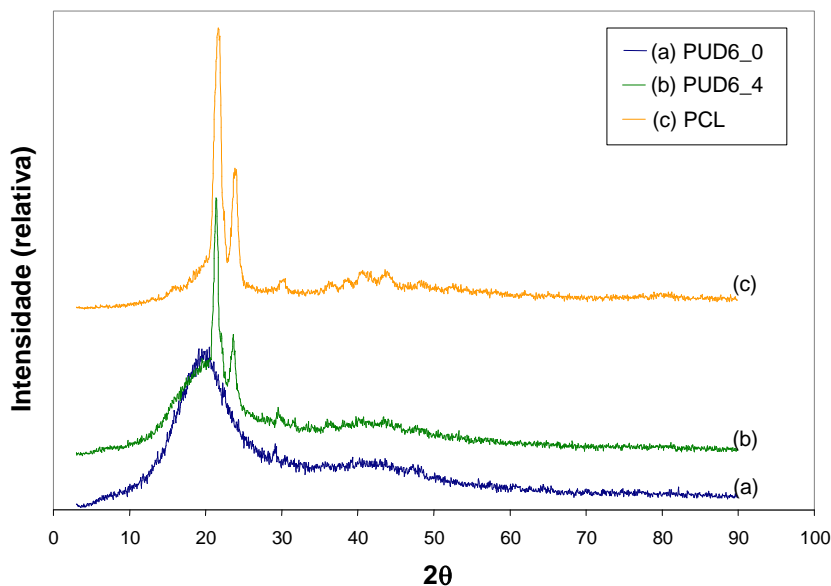


Figura 19 - Padrões XRD para PUD6 não degradado (PUD6_0) (19-a), PUD6 submetido à biodegradação por 4 meses (19-b) (PUD6_4). O padrão XRD para a PCL pura (19-c) foi incluído como referência.

Na Figura 20, o espectro de espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS) para o sistema PUD5 não degradado apresentou um pico de espalhamento amplo em $q = 0,52 \text{ nm}^{-1}$. Após 4 meses de biodegradação, este pico de espalhamento não pode ser claramente visualizado. Por outro lado, a intensidade do espalhamento foi aumentada particularmente em baixos valores de q , indicando que provavelmente as lamelas cristalinas presentes no segmento macio atuaram como sítios de espalhamento de raios-X. A presença das lamelas cristalinas mudou a estrutura do material de um sistema de duas fases (PUD5 não degradado) para um sistema de três fases. Esta estrutura mais complexa contendo múltiplos sítios de espalhamento foi responsável pelo aumento do espalhamento dos raios-X e a restrição da estrutura de microfase típica dos poliuretanos.

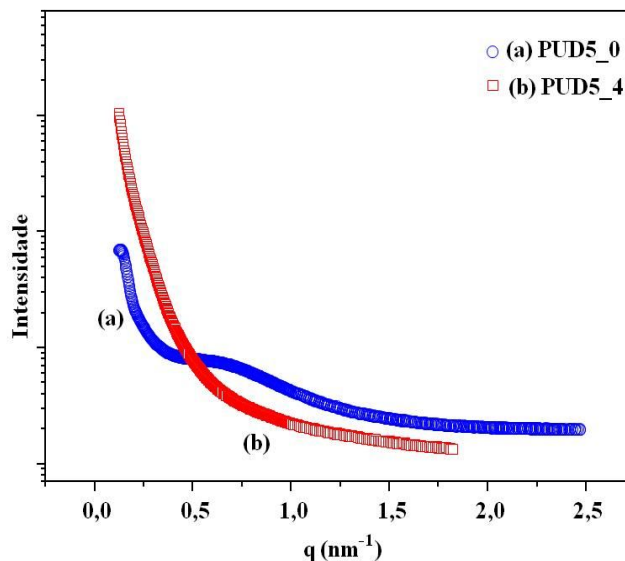


Figura 20 - Curvas SAXS para PUD5 não degradado (PUD5_0) (20-a) e PUD5 submetido a 4 meses de biodegradação (PUD5_4) (20-b).

A curva SAXS para o PUD6 não degradado, apresentada na Figura 21, mostrou que a incorporação de PEG no segmento macio provocou a modificação significativa da nanoestrutura típica destes poliuretanos, uma vez que o principal pico de espalhamento de raios-X foi deslocado para valores de q menores (quando comparado ao PUD5), o que indica que a distância entre os domínios rígidos foi aumentada como consequência do alto grau de mistura de fases. A presença de lamelas cristalinas formadas durante a biodegradação do PUD6 resultou na formação de uma nanoestrutura mais complexa, e consequentemente, na presença de múltiplos picos de espalhamento que se sobrepuseram, levando a um perfil de espalhamento com picos não definidos.

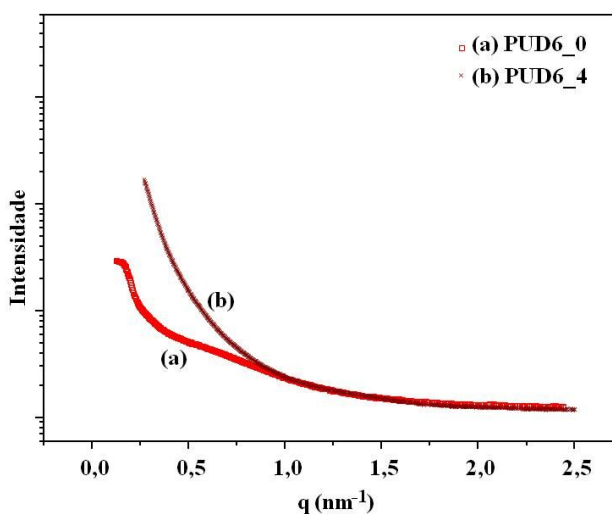


Figura 21 - Curvas SAXS para PUD6 não degradado (PUD6_0) (21-a) e PUD6 submetido a 4 meses de biodegradação (PUD6_4) (21-b).

A biodegradação *in vitro* do PUD5 e PUD6 foi demonstrada pela perda de massa dos filmes, imersos em tampão fosfato pH 7,4 mantido à temperatura de 37 °C e agitação a 30 rpm. Estas condições foram utilizadas para tentar simular o ambiente encontrado no vítreo. Como apresentado na Figura 22, o PUD6 apresentou perda de massa maior que aquela exibida pelo PUD5 ao longo de 38 semanas de realização do experimento. A maior taxa de biodegradação do PUD6 pode ser associada à sua maior hidrofiliicidade, devido à presença do PEG no segmento macio. O PEG favoreceu a penetração e difusão da água na matriz polimérica, o que aumentou a taxa de hidrólise dos grupos éster presentes no PCL, assim como a formação de produtos de degradação de baixa massa molecular. Adicionalmente, os segmentos contendo PEG hidrofílico possivelmente interagiram com os segmentos rígidos polares, conduzindo a maior mistura de fases no PUD6 (como detectado pelo SAXS), o que poderia aumentar a permeabilidade à água, e consequentemente, aumentar a degradação hidrolítica deste polímero. Ao contrário do PUD6, o poliuretano PUD5 apresenta uma estrutura mais hidrofóbica, o que provavelmente diminuiu a penetração e difusão da água nas cadeias do polímero, resultando numa menor taxa de degradação hidrolítica. Estes resultados são similares àqueles descritos por Zhang et al. (2007), que descreveram que poliuretanos contendo maior proporção de PEG no segmento macio exibiram maior absorção de água, maior taxa de degradação *in vitro*, e ainda menor resistência mecânica no estado hidratado.

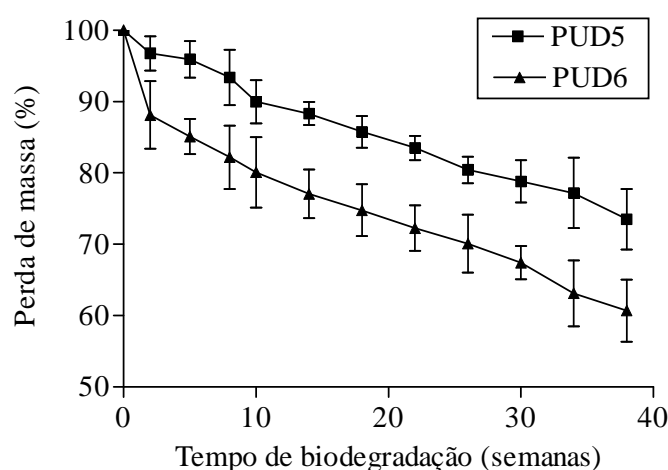


Figura 22 – Porcentagem de perda de massa do PUD5 e PUD6 em condições fisiológicas simuladas (tampão fosfato pH 7,4, temperatura de 37 °C e agitação de 30 rpm). Os dados obtidos representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$ para cada poliuretano).

Os espectros FTIR para o PUD5 e PUD6 antes e após 4 meses de biodegradação estão representados nas Figuras 23 e 24, respectivamente. As bandas FTIR típicas dos poliuretanos podem ser visualizadas nestes espectros e estão descritas na Tabela 2. A presença de PEG no PUD6 não introduziu uma banda de absorção nova no espectro do PUD6 quando comparado com o espectro do PUD5, simplesmente porque os grupos químicos presentes no PEG estão também presentes nos outros componentes do poliuretano.

Tabela 2. Atribuições das bandas FTIR para PUD5 e PUD6.

Banda	Origem	Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
1	N-H O-H	~3300	Vibração N-H com ligação de hidrogênio e do O-H
2	-CH ₂	~2900	Modos de vibração de estiramento assimétricos do metileno
	-CH ₂	~2800	Modos de vibração de estiramento simétricos do metileno
3	C=O	~1630	Vibração de estiramento do C=O da uréia com ligação de hidrogênio
		~1660	Vibração de estiramento do C=O da uréia livre
		~1700	Vibração de estiramento do C=O do uretano com ligação de hidrogênio
		~1720	Vibração de estiramento do C=O do uretano livre
		1750-1725	Modos de vibração de estiramento do C=O do éster
4	>N-H	1640-1540	Modos de vibração de amida secundária
5	-CH ₂	1470-1430	Modos de vibração de deformação assimétrica do metileno
6	C-N	1292-1226	Modos de vibração de estiramento de amida terciária
7	C-O-C	1192	Vibração de estiramento do éter
		1150	Vibração de estiramento do éter

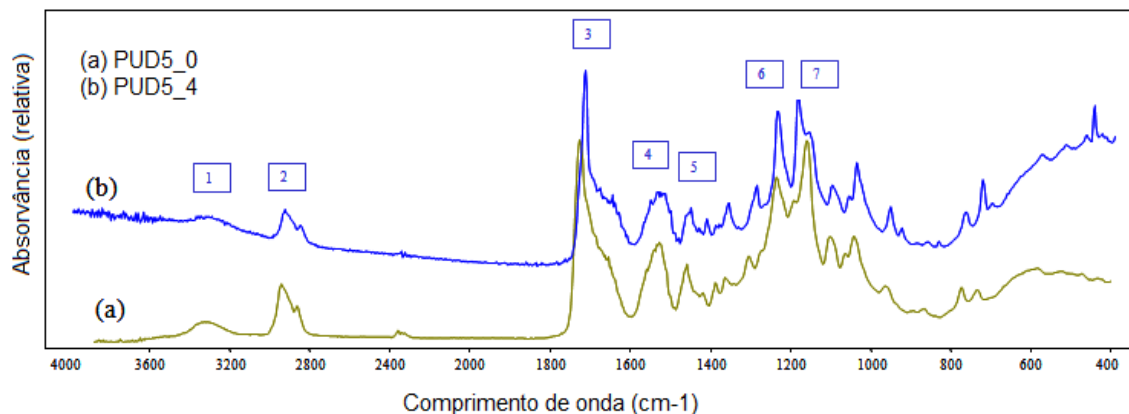


Figura 23 - Espectros FTIR do PUD5 não degradado (PUD5_0) (22-a) e do PUD5 submetido à biodegradação por 4 meses (PUD5_4) (22-b).

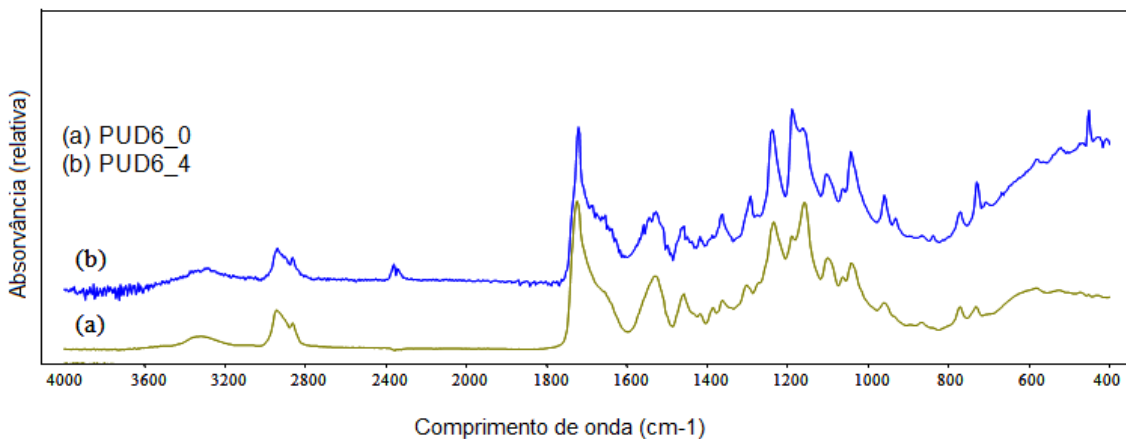


Figura 24 - Espectros FTIR do PUD6 não degradado (PUD6_0) (23-a) e do PUD6 submetido à biodegradação por 4 meses (PUD6_4) (23-b).

Na Figura 25 está indicado que as principais bandas de absorção associadas com os poliuretanos estão presentes em todos os sistemas e que a frequência de cada banda não foi significativamente deslocada devido ao teste de biodegradação realizado com os materiais. Por outro lado, observou-se que a absorvância de algumas bandas FTIR foi dependente de alguns fatores, tais como a biodegradação e a morfologia.

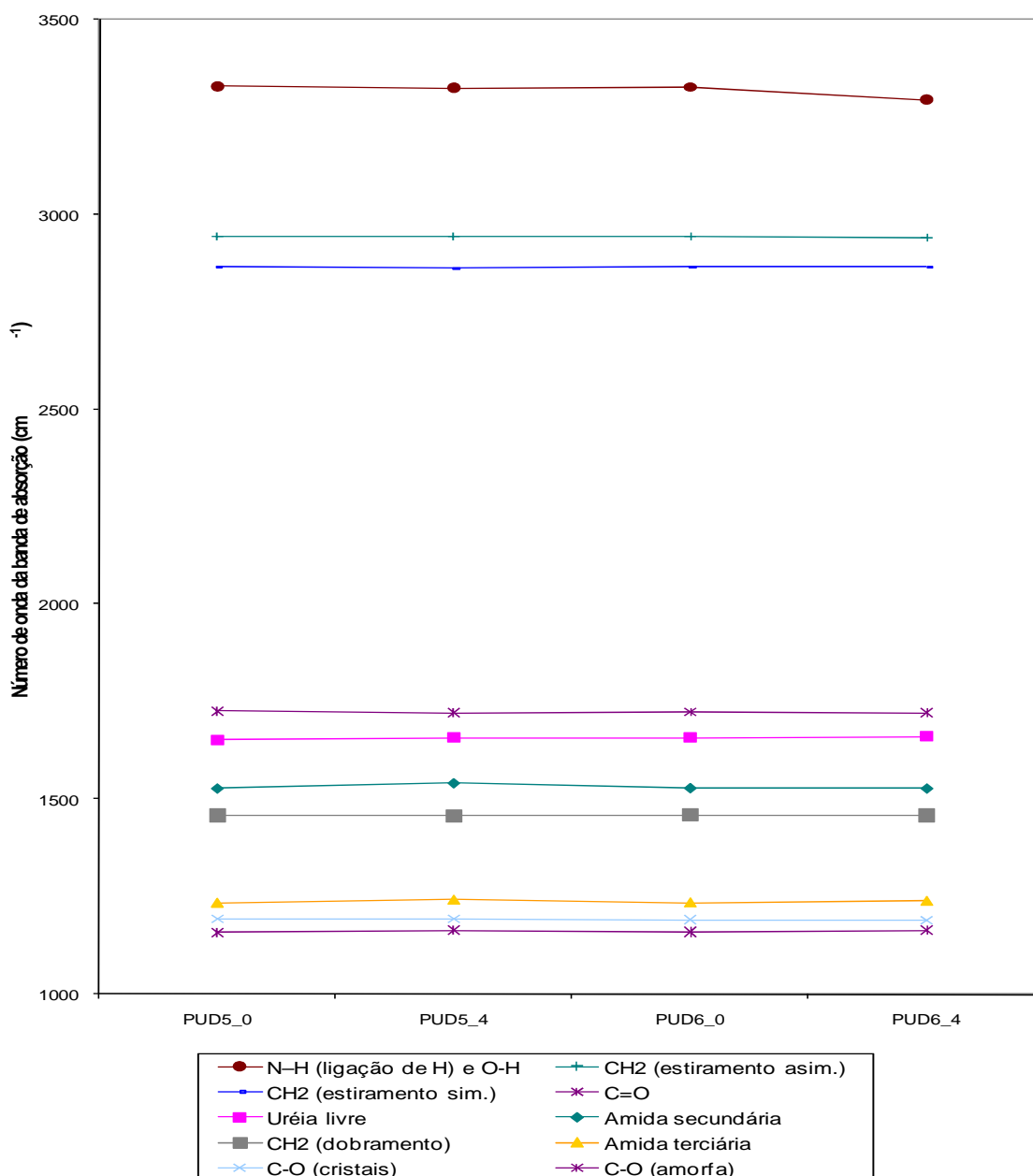


Figura 25 – Principais bandas de absorção FTIR observadas para os poliuretanos (PUD5_0 e PUD6_0) não degradados e submetidos à biodegradação (PUD5_4 e PUD6_4).

Na Figura 26 estão indicados os valores de absorvância das principais bandas de absorção dos sistemas de poliuretanos. A fim de se obter maiores informações sobre os grupos carbonila em diferentes ligações e expostos a diferentes ambientes químicos, um procedimento de deconvolução matemática foi realizado numa ampla região de absorção do C=O (entre 1750 e 1600 cm^{-1}), para demonstrar frequências de absorção mais específicas e descritas na Tabela 2. Por exemplo, na Figura 27 encontra-se representado o procedimento de deconvolução aplicado para o PUD5 antes e após o teste de

biodegradação. Os resultados obtidos pela deconvolução foram normalizados dividindo-se o valor da banda de absorção pela soma deste valor adicionado ao valor de absorção da banda presente em 1460 cm^{-1} (referência – vibração de deformação do CH_2). Os valores de absorvância normalizados estão indicados na Figura 26, e estes revelaram informações importantes, a saber:

(1) a absorvância normalizada da carbonila da uréia e do uretano com ou sem ligação de hidrogênio aumentou para os dois polímeros após o período de biodegradação. Uma vez que a técnica de FTIR com Reflexão Total Atenuada monitora a superfície das amostras em até $3\ \mu\text{m}$, o resultado observado pode significar que as cadeias pequenas contendo $\text{C}=\text{O}$ produzidas pela hidrólise das ligações éster da PCL teriam mobilidade suficiente e estariam mais livres para movimentar para a superfície. Adicionalmente, um aumento na concentração das carbonilas livres é usualmente associado com um aumento na mistura de fases; ou seja, a hidrólise das ligações éster aumentou a natureza hidrofílica dos domínios macios, aumentando sua compatibilidade em relação ao domínio polar rígido e conduzindo a maiores níveis de mistura de fase.

(2) Diferenças significantes na absorvância de amidas secundárias (presentes nos segmentos rígidos) não puderam ser notadas, o que seria uma indicação de que os segmentos rígidos foram preservados durante a biodegradação.

(3) O modo de vibração de estiramento das ligações $\text{C}-\text{O}$ das cadeias de poli(éster) nos cristalitos foi observado em comprimento de onda próximo a 1192 cm^{-1} . Entretanto, as conformações da cadeia de poli(éster) que não apresentavam os níveis de simetria e organização da fase cristalina, tiveram vibrações de estiramento das ligações próximas a 1160 cm^{-1} . Como pode ser visualizada na Figura 26 (e na Figura 28), a biodegradação conduziu ao aumento na absorvância normalizada correspondente a 1192 cm^{-1} para os dois poliuretanos. Este resultado está de acordo com aqueles obtidos por difração de raios-X, que demonstraram que o teste de biodegradação provocou a cristalização dos segmentos macios. Adicionalmente, considerando que não foram observadas modificações na banda correspondente a 1160 cm^{-1} e que houve aumento da absorvância em 1192 cm^{-1} , sugeriu-se que a concentração das ligações $\text{C}-\text{O}$ aumentou devido a degradação hidrolítica das ligações éster e também aconteceu a migração dos segmentos macios livres para a superfície. Na Figura 28 está indicado como as bandas $\text{C}-\text{O}$ cristalinas e amorfas estavam dispostas no espectro do PUD5 antes e após a biodegradação.

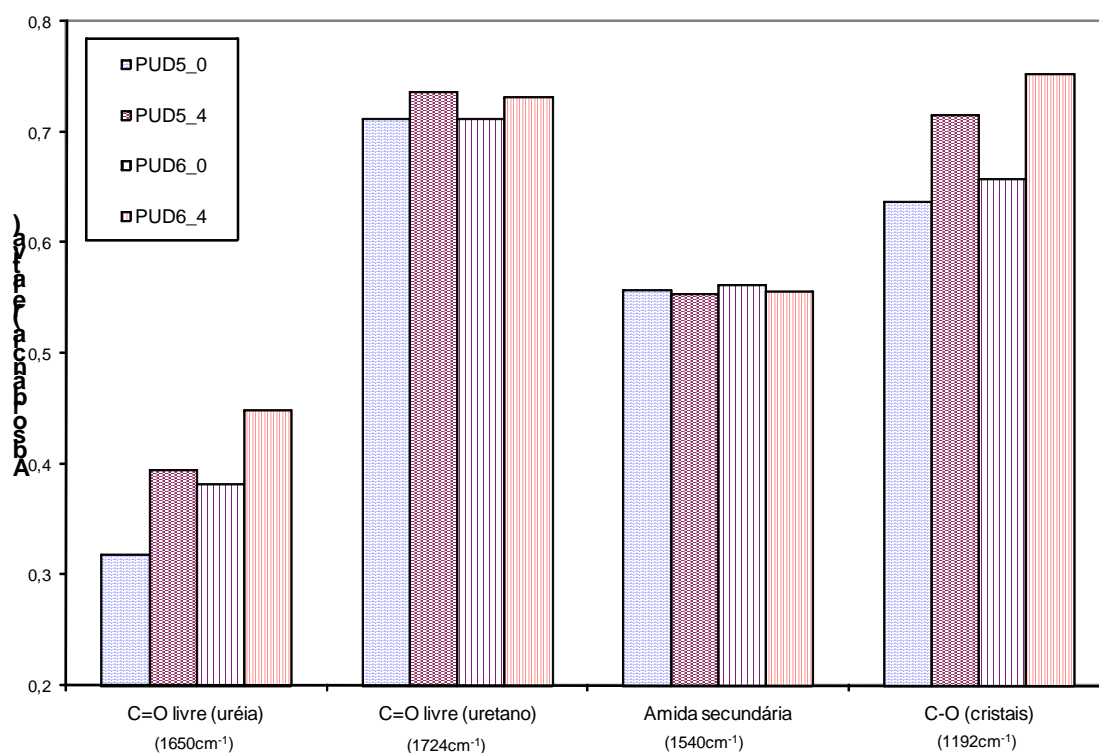


Figura 26 – Absorvâncias normalizadas das principais bandas de absorção FTIR do PUD5 e PUD6 antes (PUD5_0 e PUD6_0) e após a biodegradação (PUD5_4 e PUD6_4)

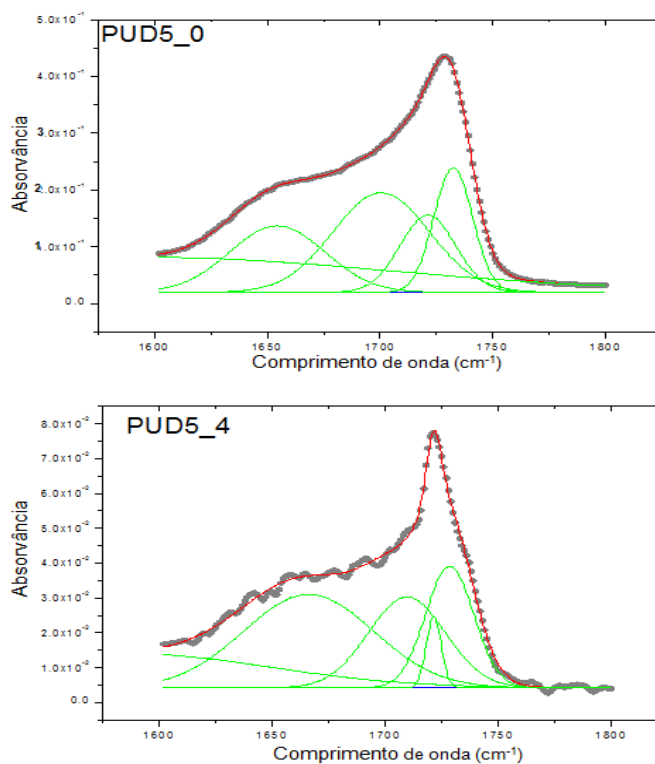


Figura 27 – Deconvolução da região espectral da carbonila (C=O): PUD5_0 (antes da biodegradação) e PUD5_4 (após biodegradação).

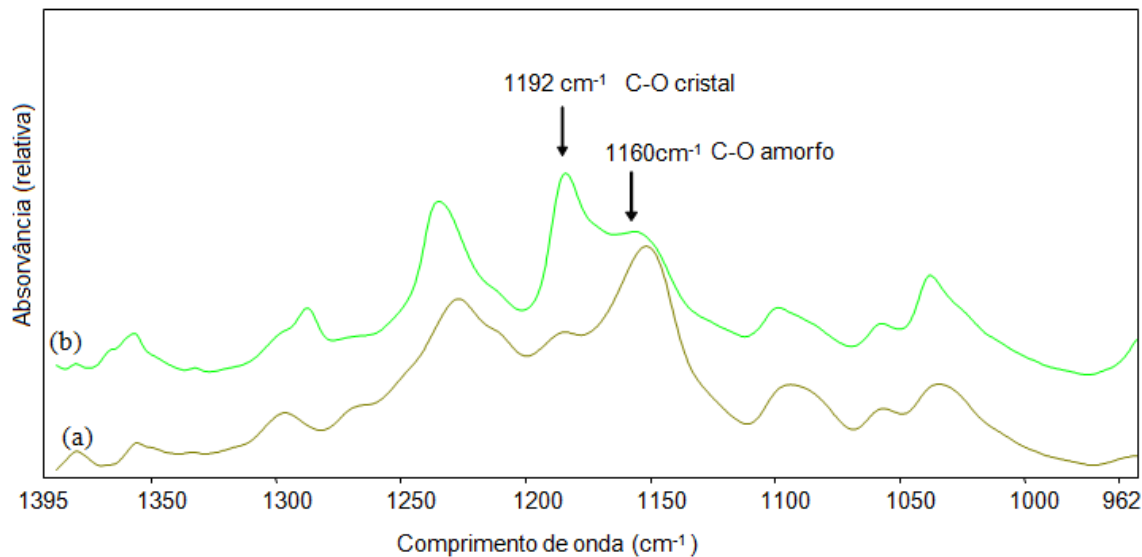


Figura 28 – Região espectral C-O.

Neste estudo, os reagentes usados como precursores dos poliuretanos foram cuidadosamente selecionados, de modo que o processo de degradação hidrolítica fosse favorável, e que os possíveis produtos de degradação não fossem tóxicos e solúveis em água. A fim de verificar a não citotoxicidade dos produtos de degradação destes poliuretanos, as células do epitélio pigmentar da retina (ARPE-19) foram cultivadas em contato direto com estes produtos de degradação, e a viabilidade celular foi avaliada por meio do teste de conversão mitocondrial do sal de tetrazólio (MTT).

As células ARPE-19 foram incubadas, por 48 horas, em uma mistura de solução contendo os produtos de degradação dos poliuretanos, coletada após 4 meses de biodegradação *in vitro* dos polímeros, e meio de cultura, nas proporções 1:10 e 3:10. Na Figura 29 está representada a porcentagem de células viáveis (aquelas que estiveram em contato direto com os produtos de degradação do PUD5 e PUD6) em relação ao controle (células que não estiveram em contato com os produtos de degradação). Na proporção 1:10, a viabilidade das células submetidas aos produtos de degradação do PUD5 e PUD6 foi similar à viabilidade das células do controle ($99,46\% \pm 3,86$ e $95,88\% \pm 2,10$, respectivamente). Na proporção 3:10, a viabilidade das células incubadas com os produtos de degradação do PUD5 e PUD6 diminuiu ligeiramente ($94,67 \pm 2,00$ and $92,37 \pm 3,39$, respectivamente). Entretanto, a análise estatística (ANOVA) demonstrou que não existe diferença estatisticamente significativa entre a viabilidade das células ARPE-19 cultivadas em meio de cultura adicionado de solução de produtos de degradação dos

poliuretanos e cultivadas em meio de cultura simples (controle), em ambas as proporções avaliadas ($p > 0,05$). De acordo com os resultados obtidos, sugeriu-se que os produtos de degradação dos poliuretanos PUD5 e PUD6 apresentaram um efeito citotóxico não significativo, e que diferenças consistentes em citotoxicidade dos produtos de degradação de cada poliuretano não foram visualizadas. Entretanto, considerou-se que existe uma limitação neste teste de citotoxicidade *in vitro*: a concentração dos produtos de degradação dos poliuretanos pode não ser representativa daquela que poderia existir *in vivo*, uma vez que, a taxa de biodegradação *in vivo* de biomateriais pode ser mais elevada que a taxa de biodegradação em condições fisiológicas simuladas.

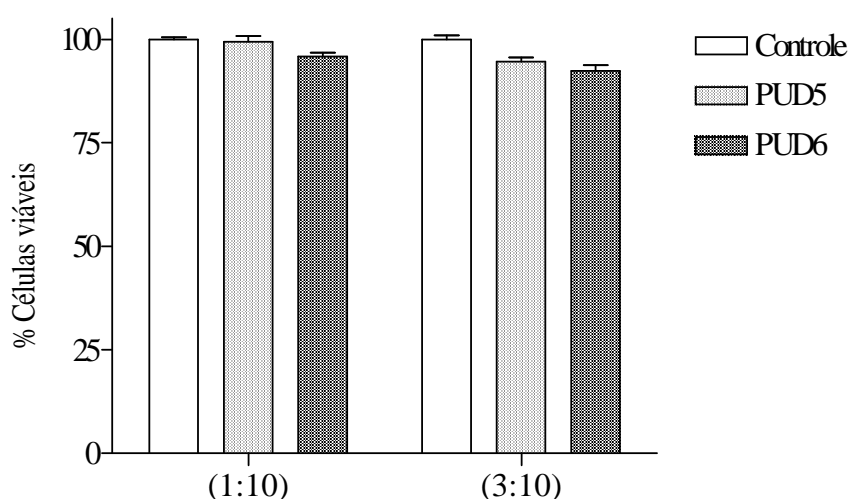


Figura 29 – Porcentagem de células ARPE-19 viáveis incubadas numa mistura de solução de produtos de degradação dos poliuretanos PUD5 e PUD6, coletada após 4 meses de degradação dos polímeros, e meio de cultura, nas proporções de 1:10 e 3:10 ($n = 5$ para cada PUD e controle, para cada proporção). A viabilidade das células incubadas no meio de cultura contendo os produtos de degradação foi expressa em relação à viabilidade das células incubadas no meio de cultura sem os produtos de degradação (controle), fixada em 100%.

Concluiu-se, portanto, que estes polímeros apresentaram perda de massa progressiva ao longo de 38 semanas em condições fisiológicas simuladas. As ligações éster da PCL no segmento macio foram preferencialmente hidrolisadas, e esta degradação provavelmente favoreceu a mobilidade das cadeias de baixa massa molecular, levando à formação de uma estrutura cristalina. Sugeriu-se também que a hidrólise das ligações éster da PCL aumentou a natureza hidrofílica dos domínios macios, aumentando a sua interação com os domínios rígidos polares e mudando a estrutura de separação de fases típica dos poliuretanos. As células ARPE-19 incubadas em meio de cultura contendo os produtos

de degradação dos poliuretanos nas proporções de 1:10 e 3:10 apresentaram viabilidade, indicando que os mesmos não apresentam efeitos citotóxicos significantes.

6.3 Estudo de liberação in vitro do acetato de dexametasona a partir dos implantes

Na Figura 30 estão representados os perfis de liberação acumulada *in vitro* do ACT a partir de PUD5 e PUD6. Os sistemas poliméricos propiciaram a liberação controlada do fármaco que, por sua vez, pôde ser dividida em três estágios diferentes. Durante as primeiras 10 semanas, cerca de 12% e 18% do ACT foi lentamente liberado a partir do PUD5 e PUD6, respectivamente. Neste primeiro estágio, considera-se que a liberação do fármaco foi controlada por um processo de difusão através de poros e canais recém-formados ou pré-existentes. No segundo estágio, que aconteceu entre 10 e 30 semanas de teste, cerca de 70% e 80% do ACT foi liberado a partir de PUD5 e PUD6, respectivamente. Neste segundo estágio, as rápidas dissolução e difusão do fármaco foram atribuídas ao aumento da permeabilidade aquosa das matrizes poliméricas, devido à degradação hidrolítica das ligações éster presentes no PCL do segmento macio. Esta degradação resulta na formação de novos canais aquosos que passaram a conectar a superfície ao interior das matrizes. No terceiro estágio, a menor taxa de liberação do ACT pôde ser observada novamente para ambos os polímeros, como consequência da redução da concentração de ACT dentro dos materiais. Em 46 semanas, quase 100% do fármaco foi liberado dos sistemas. Sugere-se que o ACT, presente no interior dos polímeros, tenha sido liberado por difusão através dos canais de água. Neste momento, a água pôde mover-se livremente no interior do ambiente, e a degradação do polímero ocorreu de maneira homogênea (KUNOU et al., 2000). Por esta razão, não se observou um pico de liberação do ACT, o que representou uma vantagem destes sistemas. Se ocorresse uma degradação intensa, a espessura da matriz polimérica poderia alterar o perfil de liberação do ACT, e em casos extremos, uma dose excessiva de fármaco poderia ser liberada.

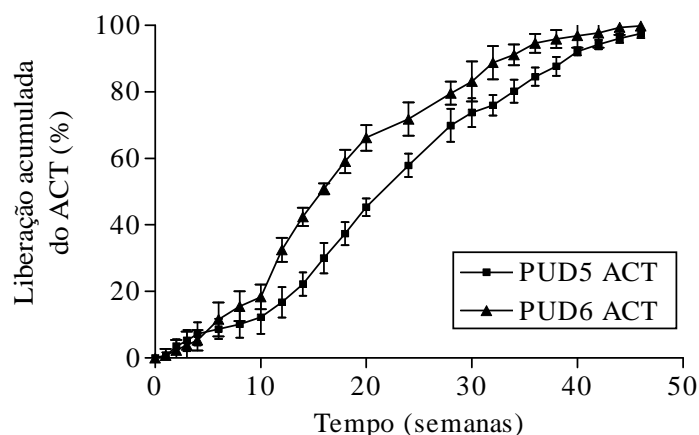


Figura 30 – Perfis de liberação acumulada *in vitro* do acetato de dexametasona (ACT) a partir de PUD5 e PUD6. Os dados representam média \pm desvio padrão ($n = 4$ para cada poliuretano).

A síntese de poliuretanos biodegradáveis baseados em PCL e PEG tem sido reportada por diversos autores (GUAN et al., 2005; GUAN et al., 2004; MAHKAM et al., 2003), e estes demonstraram que existe uma relação entre a estrutura química destes poliuretanos e a biodegradação. Sugeriu-se que o PCL aumenta a cristalinidade dos poliuretanos, enquanto que o PEG aumenta a hidrofiliabilidade e absorção aquosa. Neste trabalho, considerou-se que a inserção de cadeias hidrofílicas (PEG) na estrutura macromolecular do poliuretano biodegradável PUD6 favoreceu a penetração da água na matriz polimérica, e conseqüentemente, favoreceu o aumento da taxa hidrolítica das ligações éster dos segmentos contendo PCL, permitindo a maior difusão do fármaco para o meio e provocando um ligeiro aumento na taxa de liberação do ACT em relação à taxa de liberação deste fármaco pelo PUD5. Entretanto, a análise estatística, utilizando o teste t de Student não pareado, revelou que os perfis de liberação *in vitro* do ACT a partir de PUD5 e PUD6 não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), sugerindo que a introdução de apenas 3% de PEG no segmento macio do PUD6 não foi suficientemente grande para provocar uma modificação significativa nos perfis de liberação do ACT.

6.4 Estudo de biocompatibilidade *in vitro* dos poliuretanos

A adesão das células ARPE-19 nas superfícies do PUD5, PUD6 e controle foi expressa como sendo a média dos núcleos por campo de visão (%) \pm desvio padrão, após 8 horas

de incubação (Figura 31). Observou-se que a taxa de adesão celular na superfície de PUD5 ($86,57 \pm 6,33\%$) foi superior à taxa de adesão celular na superfície de PUD6 ($81,59 \pm 7,54\%$). Entretanto, as porcentagens de células aderidas em ambos os polímeros não apresentaram diferença estatisticamente significativa (teste t-Student, $p < 0,05$) após 8 horas de cultura. Por outro lado, a análise de variância (ANOVA) demonstrou que existe diferença estatisticamente significativa entre as taxas de adesão celular sobre os poliuretanos e controle ($p < 0,05$) em 8 horas de incubação.

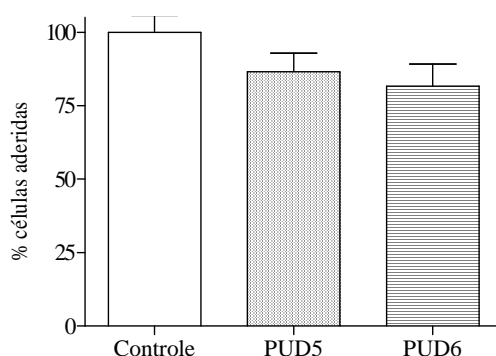


Figura 31 – Adesão das células ARPE-19 nas superfícies PUD5 e PUD6 após 8 horas em cultura. Os dados foram expressos como sendo a porcentagem de células aderidas em relação ao controle ($n = 15$ para cada poliuretano e para o controle). As porcentagens de células aderidas sobre os poliuretanos não apresentaram diferença estatística significativa (teste t de Student - $p < 0,05$) após 8 horas em cultura. As porcentagens de células aderidas sobre o controle e poliuretanos apresentaram diferença estatística significativa (ANOVA - $p < 0,05$) após 8 horas de incubação.

A taxa de proliferação das células ARPE-19 nas superfícies do PUD5, PUD6 e controle foi expressa como sendo a média dos núcleos por campo de visão \pm desvio padrão, em 1, 2, 7 e 15 dias de incubação (Figura 32). Em 2 dias, a densidade celular foi similar nas superfícies do controle, PUD5 e PUD6 ($205 \pm 7,54$, $200 \pm 10,43$ e $195 \pm 9,58$, respectivamente). Em 7 dias, o número de núcleos aumentou significativamente sobre as superfícies do controle, PUD5 e PUD6 ($290 \pm 10,71$, $242 \pm 5,41$ e $221 \pm 1,31$, respectivamente). Em 15 dias, a densidade celular sobre PUD5 e PUD6 ($402 \pm 5,81$ e $371 \pm 9,85$, respectivamente) foi cerca de três vezes maior do que a densidade celular obtida no primeiro dia de incubação, demonstrando que houve proliferação celular intensa em ambos os substratos. Em relação ao controle, a densidade celular foi de aproximadamente quatro vezes maior ($525 \pm 7,01$). Observou-se, portanto, a seguinte ordem de proliferação celular sobre os substratos: controle > PUD5 > PUD6. A análise estatística (ANOVA) demonstrou que existe diferença estatisticamente significativa

entre as taxas de proliferação celular sobre os poliuretanos e controle ($p < 0,05$) em todos os dias de incubação. Por outro lado, a média do número de núcleos contados sobre as superfícies de PUD5 e PUD6 em 1, 2, 7 e 15 dias de incubação não apresentou diferença estatisticamente significativa (teste t-Student, $p < 0,05$).

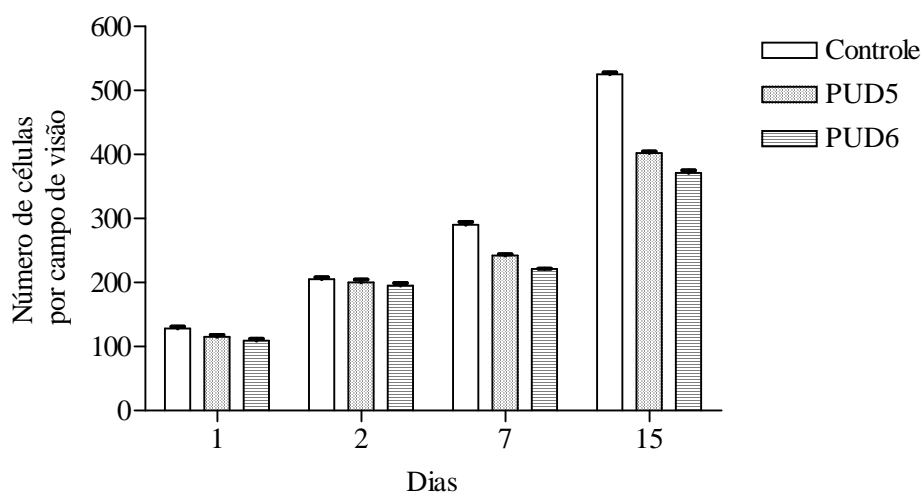


Figura 32 – Cinética de proliferação das células ARPE-19 nas superfícies controle, PUD5 e PUD6. Os dados foram expressos como sendo a média dos núcleos \pm desvio padrão em cada tempo ($n = 15$ para cada poliuretano e controle, para cada dia) ($p < 0,05$).

Neste estudo, os poliuretanos biodegradáveis foram usados como substratos para a adesão e proliferação das células ARPE-19. Sabe-se que PUD5 e PUD6 apresentam uma estrutura complexa que consiste em domínios hidrofóbicos e hidrofílicos criados pela micro separação de fases derivada da baixa compatibilidade entre os segmentos macios e rígidos. PUD5 apresenta uma separação de fases mais bem definida, enquanto que o PUD6 exibe maior grau de mistura de fases possivelmente porque existem interações entre os segmentos rígidos polares e o PEG hidrofílico presente nos segmentos macios, o que conduz a uma estrutura menos heterogênea (da SILVA et al., 2009). As diferenças nas estruturas macromoleculares destes poliuretanos poderiam promover modificações nos perfis de adsorção de proteínas do soro, e conseqüentemente, modificações nas interações entre as células e os substratos. De acordo com Zhang et al. 2007, as cadeias de PEG podem se deslocar para as superfícies dos polímeros, em contato com o ambiente aquoso, provocando repulsão de proteínas e prevenindo a aproximação das células. Entretanto, os perfis de adesão e proliferação das células ARPE-19 nas superfícies dos polímeros PUD5 e PUD6 não apresentaram diferença estatisticamente significativa (teste

t de Student, $p < 0,05$), sugerindo que a introdução de apenas 3% de PEG no segmento macio do PUD6 não foi suficientemente grande para prevenir a adsorção de proteínas do soro. Portanto, sugere-se que a adsorção de proteínas nas superfícies poliméricas aconteceu devido às diversas interações hidrofóbicas e hidrofílicas estabelecidas entre os grupos funcionais das proteínas e os domínios dos poliuretanos, culminando na adesão e proliferação celular.

Adicionalmente, a carga eletrostática presente na superfície dos biomateriais representa outro fator importante que poderia influenciar a adsorção de proteínas do soro. PUD5 e PUD6 apresentam superfícies carregadas negativamente devido à presença dos grupos carboxílicos (COO^-) provenientes do ácido dimetilol propiônico (DMPA), inseridos nos segmentos rígidos durante o processo de síntese. Estas cargas negativas distribuídas nas superfícies destes polímeros provavelmente promoveram interações eletrostáticas com as proteínas do soro, resultando na sua adsorção, que foi auxiliar na ancoragem das células ARPE-19.

Sugere-se, portanto, que o fenômeno de adsorção de proteínas nas superfícies PUD5 e PUD6 se deveu aos diferentes tipos de interações estabelecidas entre elas, incluindo hidrofílicas, hidrofóbicas e eletrostáticas, que por sua vez, foram essenciais para o estabelecimento das interações entre as células e os substratos.

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar a morfologia das células ARPE-19 aderidas nas superfícies de PUD5 e PUD6 após 1 dia em cultura. A descrição da morfologia celular é similar para ambos os polímeros. Parte das células apresentava forma arredondada e estavam em processo de adesão sobre os substratos (Figura 33.A,B,C). Estas células foram visualizadas em áreas de maior densidade celular. A outra parte das células exibiu forma alongada e achatada, e apresentava projeções (Figura 33.D,E). Estas células de forma irregular foram observadas em áreas de baixa densidade celular, sugerindo que as mesmas apresentavam mobilidade sobre os substratos e, portanto, não estavam extensivamente conectadas às superfícies poliméricas.

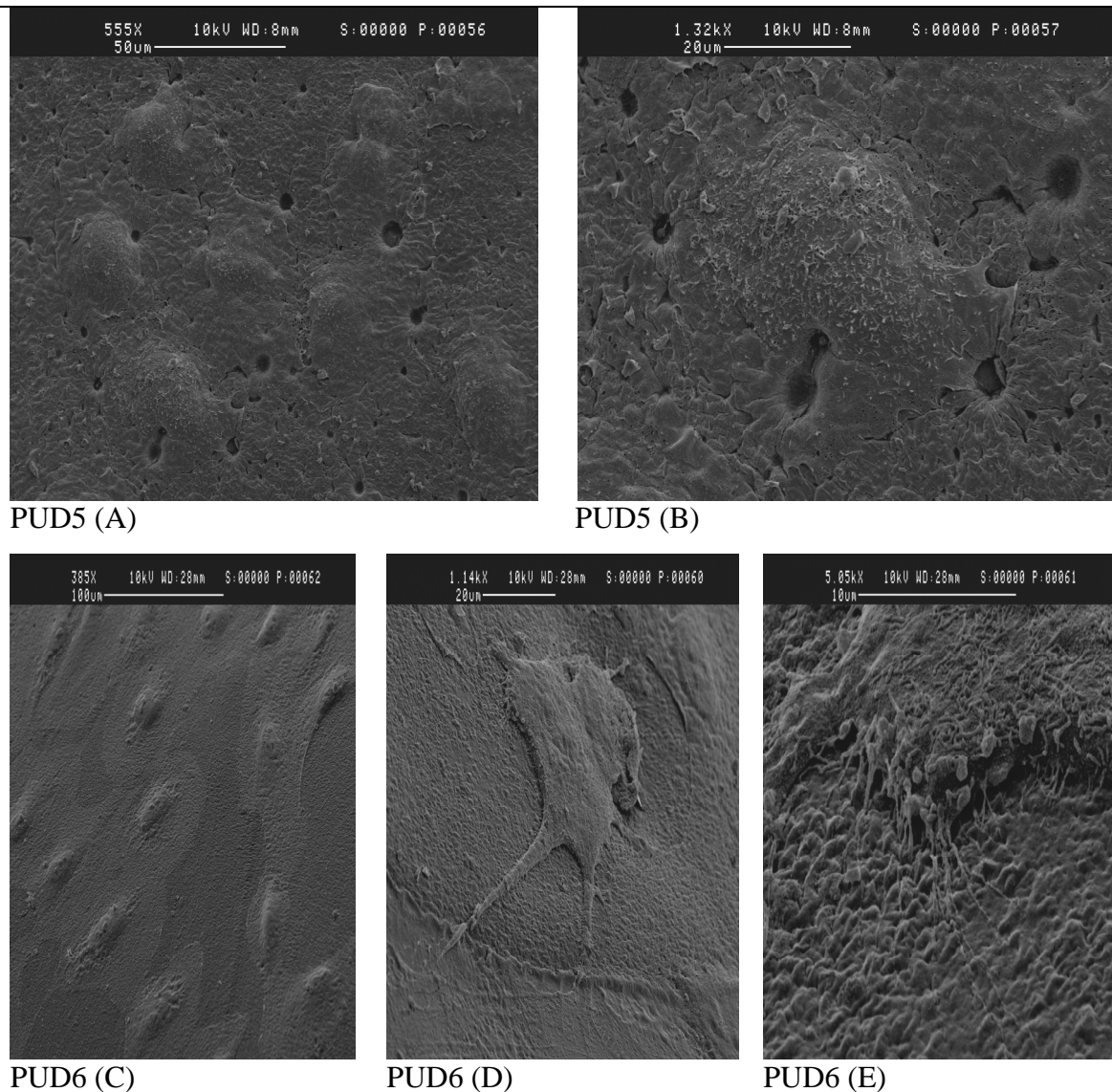


Figura 33 – Microscopia eletrônica de varredura de pequenos aglomerados de células ARPE-19 arredondadas sobre as superfícies de PUD5 (A) e PUD6 (C), após 1 dia em cultura. Ampliação das micrografias: células com microvilosidades apicais sobre PUD5 (B), e células alongadas sobre PUD6 (D) com projeções PUD6 (E).

Após 7 dias em cultura, as células ARPE-19 alcançaram confluência sobre PUD5 e PUD6, e cobriram toda a superfície polimérica como uma monocamada organizada. A marcação com faloidina revelou fibras de actina intensamente concentradas ao redor de todo o perímetro das células, sendo auxiliares na adesão das células aos substratos (KORTE et al., 1995). A actina se apresentou também na forma de grandes filamentos distribuídos em paralelo, na parte superior do citoplasma celular, e inseridos na membrana intercelular de células adjacentes, propiciando conexão entre elas. A marcação com iodeto de propídeo demonstrou que os núcleos ocupavam a região central das células, e que não estavam sobrepostos, sugerindo a formação da monocamada celular.

Células binucleadas foram observadas, o que representou a divisão celular. Esta descrição morfológica das células ARPE-19 confluentes sobre as superfícies de PUD5, PUD6 e controle está ilustrada na Figura 34. As áreas são representativas de toda a população celular presente nos polímeros.

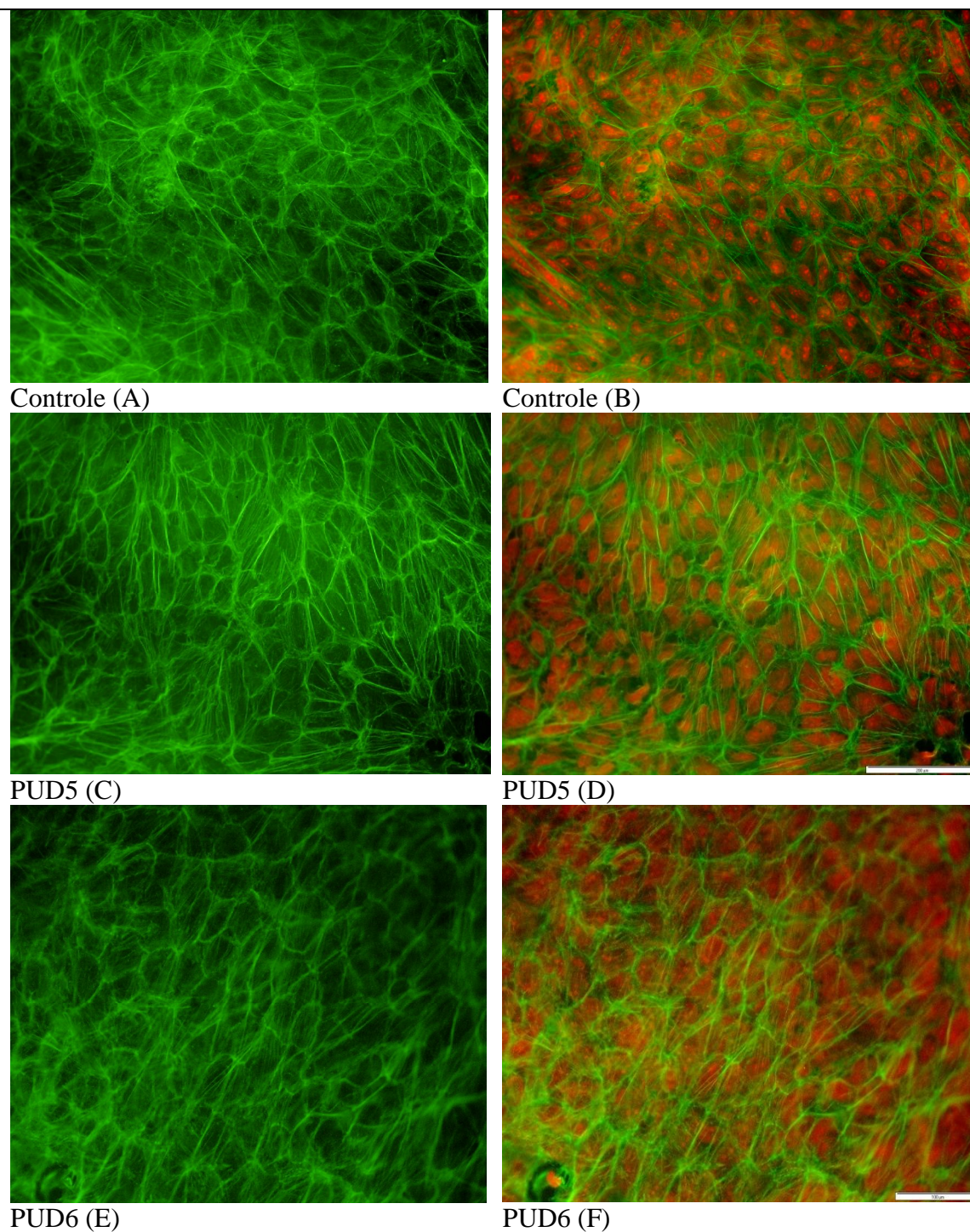


Figura 34 – Micrografias das células ARPE-19 nas superfícies do controle (A), PUD5 (C) e PUD6 (E) demonstrando a marcação das fibras de actina com faloidina FITC após 7 em cultura. Micrografias (B), (D) e (F) representam a fusão das fibras de actina e dos núcleos, marcados com iodeto de propídeo. Barra - 100 µm.

Observou-se que à medida que o número de células aumentou nos substratos, o tamanho das células regrediu gradativamente, e elas adquiriram a forma poligonal. Portanto, pode-se afirmar que a forma celular foi influenciada diretamente pela densidade celular (HADLOCK et al., 1999; CASTERLLARIN et al., 1998). Sugere-se ainda que a forma das células epiteliais tornou-se mais homogêneo devido ao estabelecimento de interações dos filamentos de actina em duas regiões diferentes: (1) com a membrana intercelular de células adjacentes (um local de adesão célula-célula); (2) em todo o perímetro das células, representando largas superfícies de adesão (um local de adesão célula-substrato). Embora as células endoteliais sobre os polímeros tenham alcançado um nível de organização adequado, sua forma não foi tão uniforme quando aquela vista em células epiteliais no próprio tecido. Este fato pode ser atribuído às diferenças existentes entre os sistemas de cultura artificiais e o ambiente natural (BURKE et al., 1996).

A zônula de oclusão é formada por moléculas adesivas transmembrana, tais como a ocludina. Elas atuam como uma barreira à difusão dos solutos para o espaço intracelular (TSUKITA et al., 1991). Neste estudo, as células ARPE-19 sobre PUD5 e PUD6 apresentaram a habilidade de expressarem ocludina. Este fato representa não só a funcionalidade das células epiteliais, mas também o estabelecimento de interações entre as células (Figure 35).

Conclui-se, portanto, que PUD5 e PUD6 foram citocompatíveis, uma vez que possibilitaram o estabelecimento de importantes interações com as células ARPE-19, permitindo sua adesão, migração, proliferação e manutenção sobre os substratos, as quais são essenciais para a formação de uma monocamada epitelial. A marcação dos filamentos de actina revelou uma rede complexa que estava conectada com a membrana intercelular e também compuseram as fibras de estresse. A identificação da expressão de ocludina demonstrou a funcionalidade das células epiteliais nas superfícies de PUD5 e PUD6.

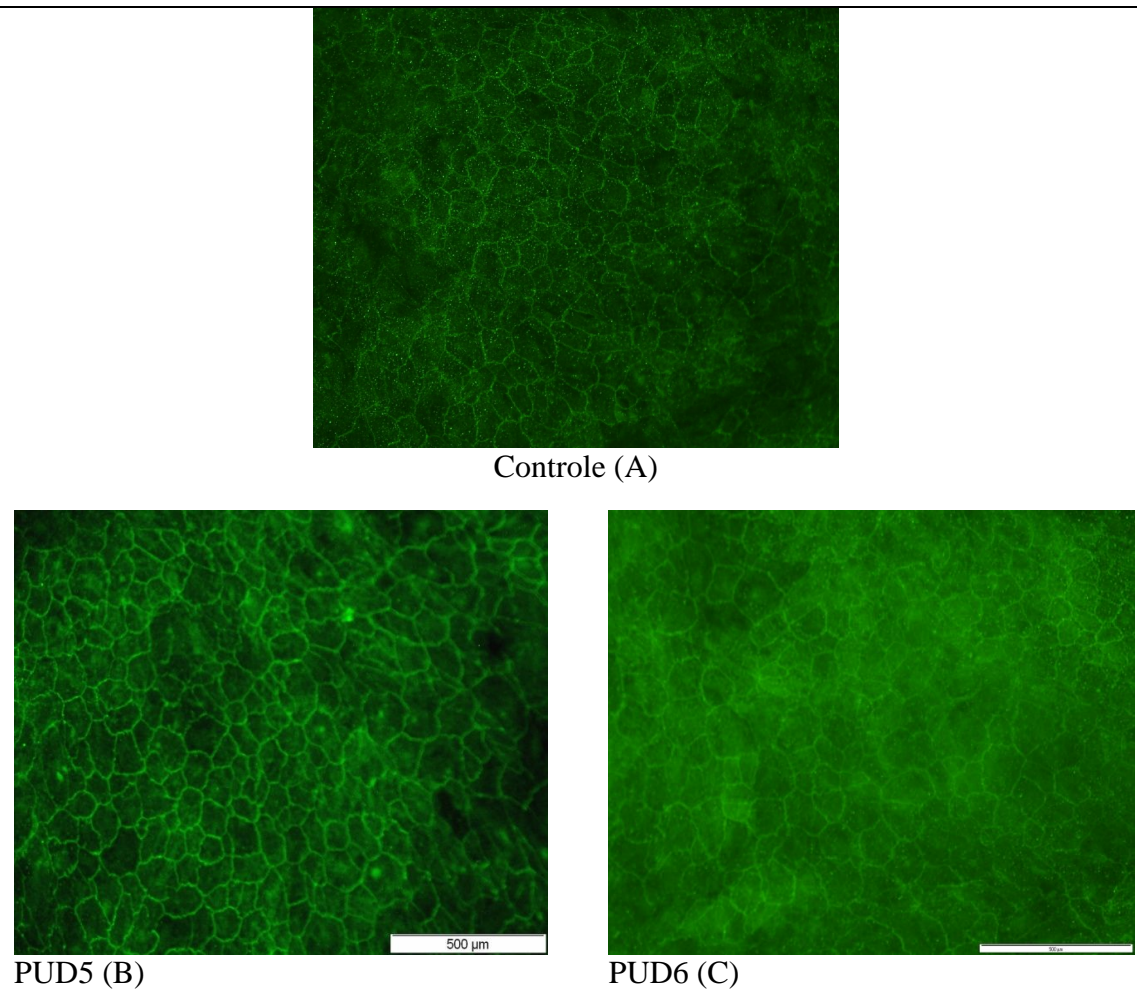


Figura 35 – Zônulas de oclusão formadas entre as células ARPE-19 adjacentes nas superfícies do controle (A), PUD5 (B) e PUD6 (C) após 15 dias em cultura. As zônulas de oclusão foram reveladas devido à marcação da ocludina (cor verde). Barra - 500 μm .

6.5 Estudo de biocompatibilidade in vivo dos poliuretanos

Os poliuretanos PUD5 e PUD6 foram inseridos no espaço subretiniano de olhos de ratos, e a avaliação histológica foi realizada 15 dias após a implantação (Figura 36). Hemorragia coroidal ou subretiniana não foi observada após a implantação dos polímeros. Além disso, os sistemas poliméricos foram bem tolerados, uma vez que sinais de inflamação não foram visualizados. Os tecidos oculares, que não estiveram em contato direto com os polímeros, não apresentaram anormalidades. A retina sobre os polímeros apresentou arquitetura preservada, mas foram observadas pequenas áreas de descontinuidade das camadas que compõem a retina. A desorganização destas camadas celulares foi atribuída à espessura dos polímeros implantados (100 μm), que era suficientemente grande para comprometer a integridade destas células. Para evitar a

descontinuidade das camadas da retina, deve-se simplesmente diminuir a espessura dos poliuretanos a serem implantados.

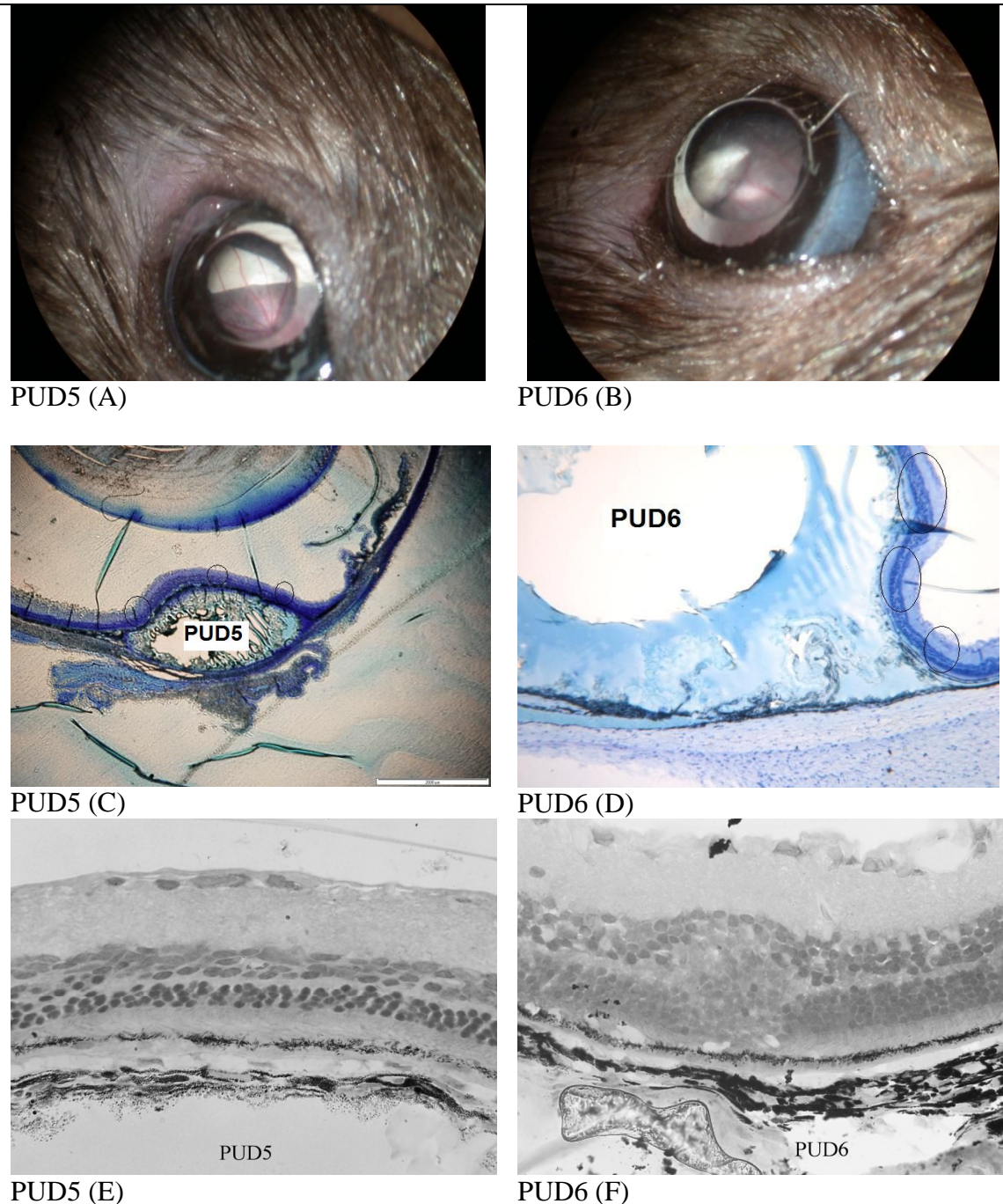


Figura 36 – Observação macroscópica do PUD5 (A) e PUD6 (B) implantados por 15 dias no espaço subretiniano de olhos de ratos. Os filmes de poliuretanos se apresentam na forma triangular e cor branca. Corte histológico do olho mostrando que PUD5 (C) (4 X) e PUD6 (D) (20 X) se encontram no espaço subretiniano: os poliuretanos se encontram degradados no espaço subretiniano (a degradação ocorreu durante o processo de fixação dos bulbos oculares); os círculos (O) indicam as camadas da retina sobre os poliuretanos. Cortes histológicos da retina localizada sobre os poliuretanos PUD5 (E) e PUD6 (F) (60 X). A arquitetura da retina foi bem preservada, mas observaram-se pequenas áreas de descontinuidade das camadas celulares da retina [PUD6 (F)].

Os poliuretanos PUD5 e PUD6 foram também inseridos no corpo vítreo dos olhos de ratos, e a avaliação histológica foi realizada 15 dias após a implantação. Os sistemas poliméricos foram bem tolerados, uma vez que sinais da inflamação não foram observados nos olhos dos animais. A cavidade vítrea manteve-se íntegra, e não foram visualizadas células inflamatórias neste tecido. Outros tecidos que compõem o olho, tais como, córnea, íris, corpo ciliar, coróide, esclera, nervo óptico não apresentaram anormalidades. As camadas da retina também foram especialmente analisadas e constatou-se que a arquitetura da neuroretina e das células epiteliais pigmentares da retina estava completamente preservada (Figura 37).

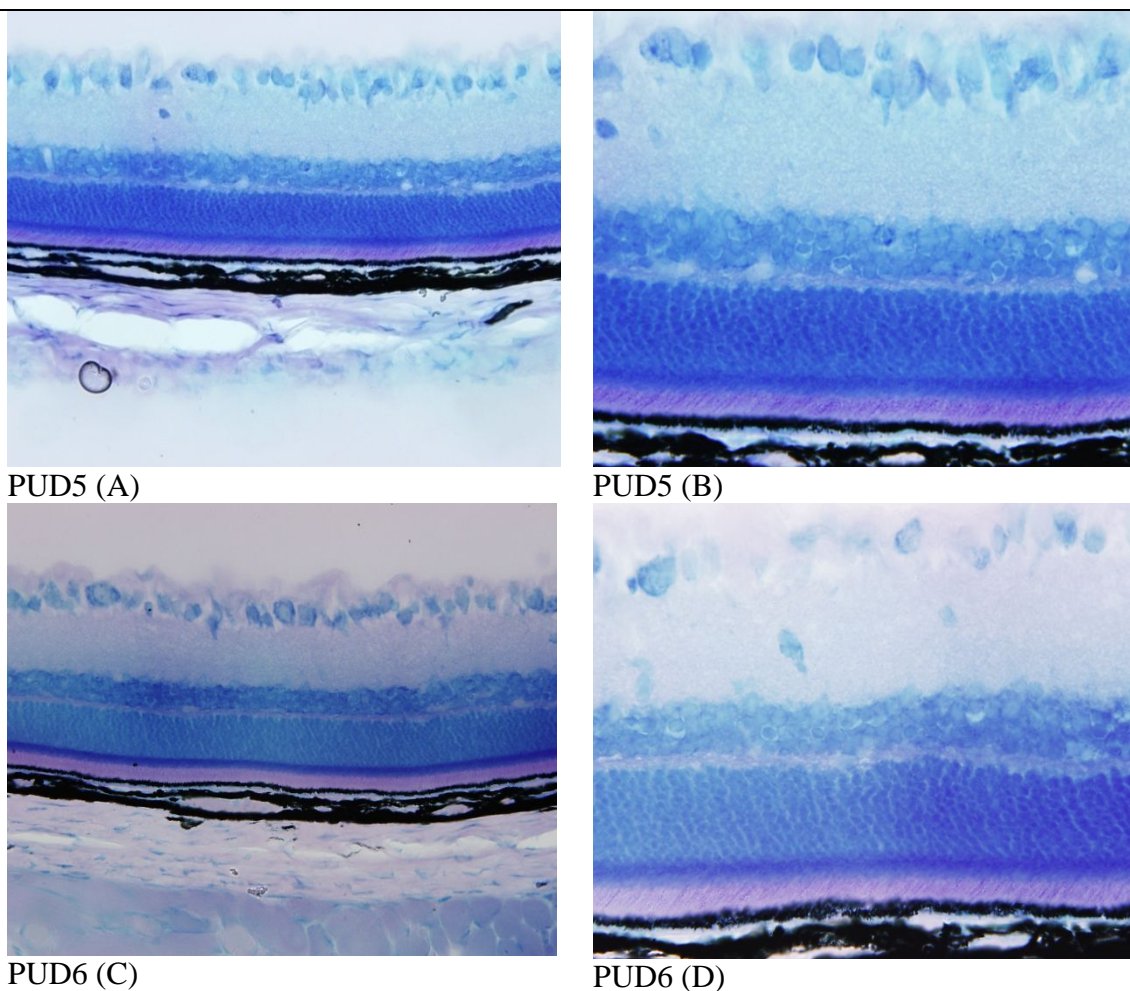


Figura 37 – Cortes histológicos das camadas da retina após a implantação do PUD5 (A) e PUD6 (C) na cavidade vítrea de olhos de ratos (40 X) e ampliação dos mesmos: PUD5 (B) e PUD6 (D) (80 X). Os cortes histológicos foram obtidos 15 dias após a introdução dos poliuretanos e demonstram a integridade da arquitetura das camadas da retina.

A biocompatibilidade intraocular deve ser avaliada em todos os tecidos do olho onde os materiais estarão em contato. Considerando que os polímeros biodegradáveis PUD5 e PUD6 serão aplicados como sistema de liberação controlada de acetato de dexametasona

destinado ao tratamento de doenças inflamatórias do segmento posterior do olho, fez-se necessária a implantação destes polímeros puros em dois sítios oculares frequentemente envolvidos como via de acesso aos dispositivos intraoculares (espaço subretiniano e corpo vítreo), para posterior investigação da biocompatibilidade *in vivo* nos diversos tecidos do olho. Além disso, os produtos de degradação destes polímeros também estarão em contato direto com as estruturas oculares e estarão sujeitos ao transporte e aos sistemas difusionais de eliminação, que podem ser através da retina (EINMAHL et al., 2000) para os sistemas biodegradáveis implantados no corpo vítreo. Portanto; faz-se necessário novamente o acesso da biocompatibilidade *in vivo* em várias partes do olho.

PUD5 e PUD6 foram altamente tolerados pelos tecidos oculares, uma vez que estes se apresentavam totalmente íntegros após 15 dias de implantação dos poliuretanos. A arquitetura da retina mostrou-se preservada na presença dos polímeros. Células envolvidas no processo inflamatório, tais como leucócitos, neutrófilos, macrófagos ou células gigantes, não foram observadas no espaço subretiniano; nas camadas da retina ou no vítreo. Além disso, os polímeros implantados no espaço subretiniano não foram envolvidos por cápsula fibrótica perceptível e não se observou necrose dos tecidos adjacentes ao sítio de implantação. Estes resultados são melhores do que aqueles apresentados por Foulds et al. (1988), após implantação supracoroidal de um poliuretano hidrofílico. Neste estudo foram observadas: (1) resposta macrofágica mononuclear contra o polímero; (2) fibrose da coróide adjacente ao sítio de implantação; (3) fusão coriorretinal. Em algumas espécies, a fibrose da coróide pode conduzir à atrofia completa da retina, enquanto que em outras, pode existir proliferação reacionária de células RPE atroficas (EINMAHL et al., 2002). Finalmente, os resultados obtidos após inserção dos poliuretanos no vítreo são interessantes como àqueles apresentados por Einmahl et al. (2000). Neste estudo, a biocompatibilidade intravitreal do POE foi avaliada e considerou-se que este polímero viscoso foi bem tolerado, como observado por oftalmoscopia indireta e avaliação histológica de todos os tecidos oculares, especialmente a retina.

Conclui-se, portanto, que os resultados obtidos neste estudo demonstraram a excelente biocompatibilidade *in vivo* dos poliuretanos PUD5 e PUD6 frente ao diversos tecidos oculares, especialmente a retina, e demonstraram também que estes polímeros são biomateriais promissores para aplicação intra-ocular.

7 CONCLUSÃO

Foi possível incorporar o ACT nos poliuretanos biodegradáveis. As dispersões aquosas de poliuretanos permitiram a incorporação do princípio ativo por simples mistura, a temperatura ambiente, sem a necessidade de uso de solventes. Os resultados FTIR demonstraram que o fármaco introduzido às matrizes poliméricas não apresentou modificações químicas detectáveis. Os resultados SAXS possibilitaram a identificação dos efeitos da incorporação do ACT na morfologia dos polímeros. A incorporação do fármaco no PUD5 conduziu a uma nova morfologia do sistema, enquanto que alterações significativas não foram detectadas na nanoestrutura do PUD6.

Os poliuretanos foram submetidos ao estudo de biodegradação *in vitro* por 4 meses em condições fisiológicas simuladas. Os resultados FTIR indicaram que os segmentos rígidos dos biomateriais foram preservados durante o teste de biodegradação, e que as ligações ésteres da PCL incorporada aos segmentos macios foram hidrolisadas. Os resultados XRD também indicaram que os grupos ésteres da PCL presentes nos segmentos macios hidrolisaram, levando à reorganização de uma fase amorfa, e conseqüente cristalização da fase. Como a biodegradação do PUD5 e PUD6 induziu a formação de lamelas cristalinas, uma nanoestrutura complexa se formou, resultando no aumento do espalhamento dos raios-X em baixo ângulo. Adicionalmente, os produtos de degradação destes poliuretanos não apresentaram citotoxicidade frente às células do epitélio pigmentar da retina.

Os sistemas poliméricos propiciaram a liberação controlada do ACT por 46 semanas. Observou-se que a inserção de cadeias hidrofílicas (PEG) na estrutura macromolecular do poliuretano biodegradável PUD6 favoreceu a penetração da água na matriz polimérica, e conseqüentemente, favoreceu o aumento da taxa hidrolítica das ligações éster dos segmentos contendo PCL, permitindo a maior difusão do fármaco para o meio e provocando um ligeiro aumento na taxa de liberação do ACT em relação à taxa de liberação deste fármaco pelo PUD5.

PUD5 e PUD6 foram citocompatíveis, uma vez que possibilitaram o estabelecimento de importantes interações com as células ARPE-19, permitindo sua adesão, migração e proliferação, as quais foram essenciais para a formação de uma monocamada epitelial funcional sobre os poliuretanos.

PUD5 e PUD6 apresentaram biocompatibilidade intraocular, uma vez que sinais de inflamação ou necrose dos tecidos oculares não foram observados após 15 dias de implantação dos poliuretanos no espaço subretiniano e vítreo de olhos de ratos. Além disso, os tecidos oculares que estiveram ou não em contato com os poliuretanos se apresentavam completamente preservados, e a arquitetura da retina se manteve íntegra, sem quaisquer anormalidades.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMO, E. M.; URTTI, A. Current and future ophthalmic drug delivery systems: A shift to the posterior segment. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 135-143, 2008.

ADHIKARI, R.; GUNATILLAKE, P. A.; GRIFFITHS, I.; TATAI, L.; WICKRAMARATNA, M.; HOUSHYAR, S.; MOORE, T.; MAYADUNNE, R. T. M.; FIELD, J.; MCGEE, M.; CARBONE, T. Biodegradable injectable polyurethanes: Synthesis and evaluation for orthopaedic applications. **Biomaterials**, v. 29(28), p. 3762-3770, 2008.

AKUTSU, Y.; NAKAJIMA-KAMBE, T.; NOMURA, N.; NAKAHARA, T. Purification and properties of a polyester polyurethane-degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 62-67, 1998.

ASHTON, P.; BROWN, J. D.; PEARSON, P. A.; BLANDFORD, D. L.; SMITH, T. J.; ANAND, R.; NIGHTINGALE, S. D.; SANBORN, G. E. Intravitreal ganciclovir pharmacokinetics in rabbits and man. **Journal of Ocular Pharmacology**, v. 8, p. 343-347, 1992.

ÁVILA, M. A Retina no Século XXI. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 719-730, 2003.

AYRES, E. **Poliuretanos e nanocompósitos biodegradáveis derivados de dispersões aquosas projetados para aplicações biomédicas**. 2006. 193f. (Tese de Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas) – Engenharia Metalúrgica e de Minas - Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, 2006.

BOURGES, J. L.; BLOQUEL, C.; THOMAS, A.; FROUSSART, F.; BOCHOT, A.; AZAN, F.; GURNY, R.; BENEZRA, D.; BEHAR-COHEN, F. Intraocular implants for extended drug delivery: Therapeutic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1182-1202, 2006.

BRON, A.; TRIPATH, R.; TRIPATH, B. Anatomy of the eye and orbit. 8th ed. Chapman and Hall Editors, London. 1997.

BURKE, J. M.; SKUMATZ, C. M. B.; IRIVING, P. E.; MCKALY, B. S. Phenotypic Heterogeneity of Retinal Pigment Epithelial Cells In Vitro and In Situ. **Experimental Eye Research**, v. 62, p. 63-73, 1996.

CASTERLLARIN, A. A.; SUGINO, I. K.; VARGAS, J. A.; PAROLINI, B.; LUI, G.; ZARBIN, M. A. In vitro Transplantation of Fetal Human Retinal Pigment Epithelial Cells onto Human Cadaver Bruch's Membrane. **Experimental Eye Research**, v. 66, p. 49-67, 1998.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHARLES, N. C.; STEINER, G. C. Ganciclovir intraocular implant. A clinicopathologic study, **Ophthalmology**, v. 103, p. 416-421, 1996.

CHATTOPADHYAY, D. K.; RAJU, K. V. S. N. Structural Engineering of Polyurethane Coatings for High Performance Applications. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 352-418, 2007.

CHENG, CHENG-KUO.; BERGER, A. S.; PEARSON, P. A.; ASHTON, P.; JAFFE, G. J. Intravitreal Sustained-Release Dexamethasone Device in the Treatment of Experimental Uveitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 36, n. 2, p. 442-453, 1995.

CHIA, S-L.; GORNA, K.; GOGOLEWSKI, S.; ALINI, M. Biodegradable Elastomeric Polyurethane Membranes as Chondrocyte Carriers for Cartilage Repair. **Tissue Engineering**, v. 12(7), p. 1945-1953, 2006.

CHU, B.; HSIAO, B. S. Small-angle X-ray scattering of polymers. **Chem. Rev.** v. 101, p. 1727-1761, 2001.

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

CRAWFORD, D. M.; BASS, R. G.; HAAS, T. W. Effects of strain in thermal transitions and mechanical properties of polyurethanes thermoplastics elastomers. **Thermochimica Acta**, v. 323, p. 53-63, 1998.

DA SILVA, G. R.; SILVA-CUNHA A. J.; AYRES, E.; ORÉFICE, R. L. Effect of the macromolecular architecture of biodegradable polyurethanes on the controlled delivered of ocular drugs. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, p. 481-487, 2009.

DASH, A. K.; CUDWORTH II, G. C. Therapeutic Application of Implantable Drug Delivery Systems. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 40, p. 1-12, 1998.

DEBRA, A. G.; DAVID, G. G.; ANTHONY, H.; DAVID, G. C.; GLENN, J. J.; PEARSON, P. A.; DALE, W. U.; TIMOTHY, L. C. Intraocular Pressure in Patients With Uveitis Treated With Fluocinolone Acetonide Implants. **Archives of Ophthalmology**, v. 125(11), p. 1478-1485, 2007.

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

EINMAHL, S.; BEHAN-COHEN, F.; TABATABAY, C.; D'HERMIES, F.; HELLER, J.; GURNY, R. A viscous bioerodible poly(ortho ester) as a new biomaterial for intraocular application, **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 50, p. 566-573, 2000.

EINMAHL, S.; PONSART, S.; BEJJANI, R. A.; D'HERMIES, F.; SAVOLDELLI, M.; HELLER, J.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; BEHAN-COHEN, F. Ocular

biocompatibility of a poly(ortho ester) characterized by autocatalyzed degradation. **Journal of Biomedical Material Research A**, v. 67, p. 44-53, 2003.

EINMAHL, S.; SAVOLDELLI, M.; D'HERMIES, F.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; BEHAN-COHEN, F. Evaluation of a Novel Biomaterial in the Suprachoroidal Space of the Rabbit Eye, **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 43(5), p. 1533-1539, 2002.

FIALHO, S. L.; BEHAN-COHEN, F.; SILVA-CUNHA A. J. Dexamethasone-loaded poly(ϵ -caprolactone) intravitreal implants: A pilot study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 637-646, 2008.

FIALHO, S. L.; REGO, M. G. B.; SIQUEIRA, R. C.; JORGE, R.; HADDAD, A.; RODRIGUES JR, A. L.; MAIA-FILHO, A.; SILVA-CUNHA A. J. Safety and Pharmacokinetics of an Intravitreal Biodegradable Implant of Dexamethasone Acetate in Rabbit Eyes, **Current Eye Research**, v. 31, p. 525-534, 2006.

FÉRNANDEZ, A. M.; ABRAHAM, G. A.; VALENTIN, J. L.; RÓMAN, J. S. Synthesis and characterization of biodegradable non-toxic poly(ester-urethane-urea)s based on poly(ϵ -caprolactone) and amino acid derivatives. **Polymer**, v. 47, p. 785-798, 2006.

FIALHO, S. L.; REGO, M. G. B.; CARDILLO, J. A.; SIQUEIRA, R. C.; JORGE, R.; SILVA-CUNHA A. J. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 891-896, 2003.

FOULDS, W. S.; AITKEN, D.; LEE, W. R. Experimental suprachoroidal plombage with a urethane based hydrophilic polymer. **British Journal of Ophthalmology**, v. 72, p. 278-283, 1988.

GARCIA, C. V.; BREIER, A. R.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; OPPE, T. P. Determination of dexamethasone acetate in cream by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, p. 597-600, 2003.

GRAD, S.; KUPCSIK, L.; GORNA, K.; GOGOLEWSKI, S.; ALINI, M. The use of biodegradable polyurethane scaffold for cartilage tissue engineering: potential and limitations. **Biomaterials**, v. 24, p. 5163-5171, 2003.

GOGOLEWSKI, S.; GORNA, K. Biodegradable polyurethane cancellous bone graft substitutes in the treatment of iliac crest defects. **Journal of Biomedical Material Research A**, v. 80, p. 94-101, 2007.

GUAN, J.; SACKS, M. S.; WAGNER, W. R. Biodegradable poly(ether ester urethane) elastomers based on poly(ether ester) triblock copolymers and putrescine: synthesis, characterization and cytocompatibility. **Biomaterials**, v. 25, p. 85-96, 2004.

GUAN, J.; WAGNER, W. R. Synthesis, characterization and cytocompatibility of polyurethaneurea elastomers with designed elastase sensitivity. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 2833-2842, 2005.

HADLOCK, T.; SINGH, S.; VACANTI, J. P.; MCLAUGHLIN, B. J. Ocular cell monolayer cultured on biodegradable substrates. **Tissue Engineering**, v. 5, p. 187-196, 1999.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (ED). **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003.

HERRERO-VANRELL, R.; REFOJO, M. F. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, p. 5-16, 2001.

HUGHES, P. M.; OLEJNIK, O.; CHANG-LIN, J.; WILSON, C. G. Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 2010-2032, 2005.

JAFFE, G. J.; YANG, C-S.; WANG, X-C.; COUSINS, S. W.; GALLEMORE, R. P.; ASHTON, P. Intravitreal Sustained-release Cyclosporine in the Treatment of Experimental Uveitis. **Ophthalmology**, v. 105, p. 46-56, 1998.

JAFFE, G. J.; MARTIN, D.; CALLANAN, D.; PEARSON, P. A.; LEVY, B.; COMSTOCK, T. Fluocinolone acetonide implant (Retisert) for noninfectious posterior uveitis: thirty-four-week results of a multicenter randomized clinical study. **Ophthalmology**, v. 113, p. 1020–1027, 2006.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2475-2490, 2000.

JIANG, X.; LI, J.; DING, M.; TAN, H.; LING, Q.; ZHONG, Y.; FU, Q. Synthesis and degradation of nontoxic biodegradable waterborne polyurethanes elastomer with poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) as soft segment. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 838–1846, 2007.

KAPPEL, P. J.; CHARONIS, A. C.; HOLLAND, G. N.; NARAYANAN, R.; KULKARNI, A. D.; YU, F.; BOYER, D. S.; ENGSTROM, R. E.; KUPPERMANN, B. D. Outcomes Associated with Ganciclovir Implants in Patients with AIDS-Related Cytomegalovirus Retinitis. **Ophthalmology**, v. 113(4), p. 673-683, 2006.

KERSHNER, R. M.. Management of the small pupil for clear corneal cataract surgery. **Journal of Cataract Refractory Surgery**, v. 28, p. 1826–1831, 2002.

KIM, Y-M.; LIM, J-O.; KIM, H-K.; KIM, S-L.; SHIN, J-P. A novel design of one-side coated biodegradable intrascleral implant for the sustained release of triamcinolone acetonide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, p. 179–186, 2008.

KIMURA, H.; OGURA, Y. Biodegradable polymers for ocular drugs delivery. **Ophthalmologia**, v. 215, p. 143-155, 2001.

KOO, C. M.; HAM, H. T.; KIM, S. O.; CHUNG, I. J. Morphology Evolution and Anisotropic Phase Formation of the Maleated Polyethylene-Layered Silicate Nanocomposites. **Macromolecules**, v. 35, p. 5116-5122, 2002.

KORTE, G. E.; MROWIEC, E.; LANDZBERG, K. S.; YOUSSEFI, A. Reorganization of Actin Microfilaments and Microtubules in Regenerating Retinal Pigment Epithelium. **Experimental Eye Research**, v. 61, p. 189-203, 1995.

KROL, P. Synthesis methods, chemical structures and phase structures of linear polyurethanes. Properties and applications of linear polyurethanes in polyurethane elastomers, copolymers and ionomers. **Progress in materials science**, v. 52(6), p. 915-1015, 2007.

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

KUNOU, N.; OGURA, Y.; YASUKAWA, T.; KIMURA, H.; MIYAMOTO, H.; HONDA, Y.; IKADA, Y. Long-term sustained release of ganciclovir from biodegradable scleral implant for the treatment of cytomegalovirus retinitis. **Journal of Controlled Release**, v. 68(2), p. 263-271, 2000.

KUPPERMANN, B. D.; BLUMENKRANZ, M. S.; HALLER, J. A.; WILLIAMS, G. A.; WEINBERG, D. V.; CHOU, C.; WHITCUP, S. M. Randomized Controlled Study of an Intravitreal Dexamethasone Drug Delivery System in Patients With Persistent Macular Edema. **Archives of Ophthalmology**, v. 125, p. 309-317, 2007.

LABOW, R. S.; TANG, Y.; MCCLOSKEY, C.B.; SANTERRE, J.P. The effect of oxidation on the enzyme-catalyzed hydrolytic biodegradation of poly(urethane)s. **J Biomater Sci Polym**, v. 13, p. 651-665, 2002.

LEE, S. I.; YU, S. C.; LEE, Y. S. Degradable polyurethanes containing poly (butylene succinate) and poly (ethylene glycol). **Polymer Degradation and Stability**, v. 72, p. 81-87, 2001.

LEE J.H.; WEE, W.R.; CHUNG, E.S.; KIM, H.Y.; PARK, S.H.; KIM, Y.H. Development of a newly designed double-fixed Seoul-type keratoprosthesis. **Archives of Ophthalmology**, v. 118(12), p. 1673-1678, 2000.

LI, W.; RYAN, A. J.; MEIER, I. K. Morphology development via reaction-induced phase separation in flexible polyurethane foam. **Macromolecules**, v. 35, p. 5034-5042, 2002.

LLOYD, A. W.; FARAGHER, R. G. A.; DENYER, S. P. Ocular biomaterials and implants. **Biomaterials**, Guilford, v. 22, p. 769-785, 2001.

MAHKAM, M.; SANJANI, M. S. Preparation of new biodegradable polyurethanes as a therapeutic agent. **Polymer Degradation and Stability**, v. 80, p. 199-202, 2003.

MANNERMAA, E.; VELLONEN, K-S.; URTTI, A. Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: Emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 1648-1708, 2006.

MARQUES, A. M. P. Biofunctionality and immunocompatibility of starch-based biomaterials. 2004. 242f. (Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – Engenharia de Polímeros - Universidade do Minho. Portugal, 2004.

MARTIN, D. F.; PARKS, D. J.; MELLOW, S. D.; FERRIS, F. L.; WALTON, R. C.; REMALEY, N. A.; CHEW, E. Y.; ASHTON, P.; DAVIS, M. D.; NUSSENBLATT, R. B. Treatment of cytomegalovirus retinitis with an intraocular sustained-release ganciclovir implant. A randomized controlled clinical trial, **Archives of Ophthalmology** v.112, p. 1531–1539, 1994.

MAURUS, P. B.; KAEDING, C. C. Bioabsorbable implant material review. **Operative Techniques in Sports Medicine**, v. 12(3), p. 158-160, 2004.

MCDONALD, I. M.; SAUVÉ, Y.; SIEVING, P. A. Preventing blindness in retinal disease: ciliary neurotrophic factor intraocular implants. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 42, p. 399-402, 2007.

MOTTA, M. M. S.; COBLENTZ, J.; MELO, L. G. N. Aspectos atuais na fisiopatologia do edema macular diabético. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 67(1), p. 45-49, 2008.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 762–798, 2007.

NUYTS, R.M.; KOOIJMAN-DEGROOT, M.J.; PRINS, M.; PELS, E. Use of a polyurethane patch for temporary closure of a sterile corneal perforation. **Archives of Ophthalmology**, v. 117(10), p. 1427-1429, 1999.

OGURA, Y. Drug delivery to the posterior segments of the eye. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, p. 1-3, 2001.

OKABE, J.; KIMURA, H.; KUNOU, N.; OKABE, K.; KATO, A.; OGURA, Y. Biodegradable intrascleral implant for sustained intraocular delivery of betamethasone phosphate. **Investigative ophthalmology and visual science**, v. 44, p. 740-744, 2003.

ORÉFICE, R. L.; AYRES, E.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. Using the nanostructure of segmented polyurethanes as a template in the fabrication of nanocomposites. **Macromolecules**, v. 38, p. 4058-4060, 2005.

PEYMAN, G. A.; GANIBAN, G. J. Delivery systems for intraocular routes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 107-123, 1996.

PIAO, L.; DAI, Z.; DENG, M.; CHEN, X.; JING, X. Synthesis and characterization of PCL/PEG/PCL triblock copolymers by using calcium catalyst. **Polymer**, v. 44, p. 2025–2031, 2003.

POUSSARD, L.; BUREL, F.; COUVERCELLE, J. P.; MERHI, Y.; TABRIZIAN, M.; BRUNEL, C. Hemocompatibility of new ionic polyurethanes: influence of carboxylic group insertion modes. **Biomaterials**, v. 25, p. 3473-3483, 2004.

RODIECK, R. La vision. 1st ed. De Boeck Editeurs. Paris 2003.

RUBSAMEN, P. E.; DAVIS, P. A.; HERNANDEZ, E.; O'GRADY, G. E.; COUSINS, S. W. Prevention of experimental proliferative vitreoretinopathy with a biodegradable intravitreal implant for the sustained release of fluorouracil. **Archives of Ophthalmology**, v. 112(3), p. 407-413, 1994.

SANBORN, G. E.; ANAND, R.; TORTI, R. E.; NIGHTINGALE, S. D.; CAL, S. X.; YATES, B.; ASHTON, P.; SMITH, T. Sustained-release ganciclovir therapy for treatment of cytomegalovirus retinitis. Use of an intravitreal device, **Archives of Ophthalmology**, v. 110, p. 188–195, 1992.

SANTERRE, J. P.; WOODHOUSE, K.; LAROCHE, G.; LABOW, R. S. Understanding the biodegradation of polyurethanes. From classical implants to tissue engineering material. **Biomaterials**, v. 26, p. 7457-7470, 2005.

SEAH, S. K. L.; HUSAIN, R.; GAZZARD, G.; LIM, M. C. C.; HOH, S-T.; OEN, F. T. S.; AUNG, T. Use of surodex in phacotrabeculectomy surgery. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, p. 927–928, 2005.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. LTC: Rio de Janeiro, 2000.

SMITH, T. J.; PEARSON, P. A.; BLANDFORD, D. L.; BROWN, J. D.; GOINS, K. A.; HOLLINS, E. T.; SCHMEISSER, E. T.; GLAVINOS, P.; BALDWIN, L. B.; ASHTON, P. Intravitreal sustained-release ganciclovir. **Archives of Ophthalmology**, v. 110, p. 255-258, 1992.

SNELL, R. S.; LEMP, M. A. The eyeball. In: SNELL, R. S.; LEMP, M. A. **Clinical anatomy of the eye**. 2 ed. Oxford: Blackwell Science, 1998. Cap. 6, p. 132-213.

STRAUSS, O. The retinal pigment epithelium in visual function. **Physiological reviews**, v. 85(3), p. 845-881, 2005.

TAN, D. T. H.; CHEE, S.; LIM, L.; LIM, A. S. Randomized clinical trial of a new dexamethasone delivery system (surodex) for treatment of postcataract surgery inflammation. **Ophthalmology**, v. 106(2), p. 223-231, 1999.

TATAI, L.; MOORE, T. G.; ADHIKARI, R.; MALHERBE, F.; JAYASEKARA, R.; GRIFFITHS, I.; GUNATILLAKE, A. P. Thermoplastic biodegradable polyurethanes: The effect of chain extender structure on properties and in-vitro degradation. **Biomaterials**, v. 28, p. 5407–5417, 2007.

TSUKITA, S.; OISHI, K.; AKIYAMA, T.; YAMANASHI, Y.; YAMAMOTO, T. Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. **The Journal of Cell Biology**, v. 133, p. 867-879, 1991.

UMARE, S. S.; CHANDURE, A. S. Synthesis, characterization and biodegradation studies of poly(ester urethane)s. **Chemical Engineering Journal**, v. 142, p. 65–77, 2008.

VELANKAR, S.; COOPER, S. L. Microphase Separation and Rheological Properties of Polyurethanes. II. Effect of Block Incompatibility on the Microstructure. **Macromolecules**, v. 33, p. 382-394, 2000.

VALAMANESH, F.; TORRIGLIA, A.; SAVOLDELLIM M.; GANDOLPHE, C.; JEANNY, J-C.; BENERZA, D.; BEHAR-COHEN, F. Glucocorticoids induce retinal toxicity through mechanisms mainly associated with paraptosis. **Molecular Vision**, v. 13, p. 1746-1757, 2007.

VRABEC, T.R. Posterior segment manifestations of HIV/AIDS. **Survey of Ophthalmology**, v. 49, p. 131–57, 2004.

WADOOD, A. C.; ARMBRECHT, A. M.; ASPINALL, P. A.; DHILLON, B. Safety and efficacy of a dexamethasone anterior segment drug delivery system in patients after phacoemulsification. **Journal of cataract and refractive surgery**, v. 30(4), p.761-768, 2004.

WANG, G.B.; LABOW, R.S.; SANTERRE, J.P. Biodegradation of a poly(ester)-urea-urethane by cholesterol esterase: isolation and identification of principal biodegradation products. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 36, p. 407–17, 1997.

WATSON, P. G.; YOUNG, R. D. Scleral structure, organisation and disease. A review. **Experimental Eye Research**, v. 78, p. 609–623, 2004.

WILLIAMS, R.L.; KRISHNA, Y.; DIXON, S.; HARIDAS, A.; GRIERSON, I.; SHERIDAN, C. Polyurethanes as potential substrates for sub-retinal retinal pigment epithelial cell transplantation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16(12), p. 1087-1092, 2005.

YASUKAWA, T.; KIMURA, H.; TABATA, Y.; MIYAMOTO, H.; HONDA, Y.; OGURA, Y. Sustained release of cis-hydroxyproline in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy in rabbits. **Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology**, v. 240(8), p. 672-678, 2002.

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

YASUKAWA, T.; OGURA, Y.; TABATA, Y.; KIMURA, H.; WIEDEMANN, P.; HONDA, Y. Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 23, p. 253–281, 2004.

YASUKAWA, T.; OGURA, Y.; SAKURAI, E.; TABATA, Y.; KIMURA, H. Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 2033-2046, 2005.

YEGANEH, H.; LAKOURAJ, M. M.; JAMSHIDI, S. Synthesis and properties of biodegradable elastomeric epoxy modified polyurethanes based on poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol). **European Polymer Journal**, v. 41, p. 2370-2379, 2005.

ZHANG, C.; ZHANG, N.; WEN, X. Synthesis and characterization of biocompatible, degradable, light-curable, polyurethane-based elastic hydrogels. **Journal of Biomedical Material Research A**, p. 637-650, 2007.

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

Artigos científicos publicados

da Silva, G. R.; Silva-Cunha A. Jr.; Ayres, E.; Oréfice, R. L. Effect of the macromolecular architecture of biodegradable polyurethanes on the controlled delivered of ocular drugs. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, p. 481-487, 2009.

da Silva, G. R.; Ayres, E.; Moura, S. A. L.; Cara, D. C.; R. L. Oréfice; Silva-Cunha A. Jr. Controlled release of dexamethasone acetate from biodegradable and biocompatible polyurethane and polyurethane nanocomposite. **Journal of Drug Targeting**, v. 17(5), p. 374-383, 2009.

Artigos científicos submetidos para publicação

da Silva, G. R.; Silva-Cunha A. Jr.; Behar-Cohen, F.; Ayres, E.; Oréfice, R. L. Biodegradation of polyurethanes and nanocomposites to non-cytotoxic degradation products. **Acta Biomaterialia**.

da Silva, G. R.; Silva-Cunha A. Jr.; Behar-Cohen, F.; Ayres, E.; Oréfice, R. L. *In vitro* ocular drug release from biodegradable polyurethane nanocomposites. **Journal of Biomedical Materials**.

da Silva, G. R.; Siqueira, R. C.; Jorge, R.; Silva-Cunha A. Jr. Controlled drug delivery systems for the treatment of diseases of the posterior segment of the eye. **Revista da Associação Médica Brasileira**.

Trabalhos apresentados em congresso

1) Release of dexamethasone from biodegradable polyurethane nanocomposites.

Gisele Rodrigues da Silva, Armando da Silva Cunha Junior, Eliane Ayres, Rodrigo Lambert Oréfice.

8th World Biomaterials Congress – 2008

2) Incorporação e cinética de liberação de sais de dexametasona à partir de poliuretano biodegradável contendo nanopartícula de argila.

Gisele Rodrigues da Silva, Armando da Silva Cunha Junior, Eliane Ayres, Rodrigo Lambert Oréfice.

9^o Congresso Brasileiro de Polímeros - 2007

3) Controlled release of dexamethasone salts incorporated in biodegradable polyurethanes and polyurethanes containing clay nanoparticles

Gisele Rodrigues da Silva, Eliane Ayres, Rodrigo Lambert Oréfice, Armando da Silva Cunha Junior.

6th International Congress of Pharmaceutical Science - 2007