

**RICARDO MARTINS DUARTE BYRRO**

**SISTEMAS BIODEGRADÁVEIS DE ADMINISTRAÇÃO  
PERIOCLAR DE ACETATO DE PREDNISOLONA  
PARA TRATAMENTO DE ORBITOPATIAS**

Belo Horizonte

Faculdade de Farmácia da UFMG

2008

RICARDO MARTINS DUARTE BYRRO

SISTEMAS BIODEGRADÁVEIS DE ADMINISTRAÇÃO PERIOcular DE  
ACETATO DE PREDNISOLONA PARA TRATAMENTO DE ORBITOPATIAS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

ALUNO: RICARDO MARTINS DUARTE BYRRO

ORIENTADOR: PROF. DR. ARMANDO DA SILVA CUNHA JÚNIOR

Belo Horizonte  
Faculdade de Farmácia da UFMG  
2008

Dedico este trabalho a todas as pessoas que sofrem ou já sofreram com a oftalmopatia de Graves ou uma outra orbitopatia auto-imune, que tenham amigos ou pessoas próximas com este problema, aos profissionais e autoridades que estão envolvidos com esta doença de alguma maneira, e que este trabalho possa, de alguma forma, contribuir para a melhoria da morbidade da doença e da condição de vida dos pacientes.

## AGRADECIMENTOS

Durante o desenvolvimento deste trabalho, muitas dúvidas e momentos difíceis que pareciam acabar em becos sem saída apareceram, mas com o apoio de muita gente, os esclarecimentos e as soluções sempre surgiram e muitas vezes em mais de uma forma. São a todas estas pessoas, algumas mesmo de forma indireta, que ajudaram a concluir este trabalho, que faço meus agradecimentos.

De uma forma especial, o principal agradecimento é ao professor Armando, meu orientador, que topou participar desta caminhada comigo. Agradeço a ele pela dedicação, confiança em meu trabalho, conhecimentos proporcionados e sobretudo à amizade, esta última de especial importância, pois nas reuniões o assunto sempre mudava para coisas da vida, futebol e outros, o que fugia um pouco da conversa entre aluno e orientador e tomava um ar mais amigável, facilitando o trabalho, porém, na hora de falar de trabalho, sua seriedade, serenidade e competência resolviam os problemas quase que em um minuto.

À professora Maria Irene Yoshida, por permitir a realização das análises calorimétricas em seu laboratório, sempre com disposição e tempo para ajudar.

À Juliana Saliba, que além de amiga, ajudou muito em todas as etapas deste trabalho.

À Laurinha e ao Diego, pela paciência e sobretudo inquestionável dedicação e competência na ajuda na parte experimental.

A todos os colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, por tudo mesmo... companheirismo, carinho, dicas, sugestões, empréstimos de equipamentos e reagentes, paciência e outros.

À nutrição experimental, sobretudo ao Wagner e ao professor Tasso, pelo suporte.

Ao Laboratório de Química Farmacêutica, pelo espaço cedido em uma etapa do desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade pela amizade e companheirismo, em especial para o Fernando Henrique, que além de amigo, foi de essencial importância na etapa da validação da metodologia analítica.

Ao pessoal da Engenharia, pelo apoio na análise de microscopia eletrônica de varredura.

Aos meus amigos particulares, pela amizade e compreensão nos momentos em que tive que ser ausente, em especial ao Renato (espírito de Pós-Graduação).

A todos os professores do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica.

A toda minha família, em especial meus pais e meu irmão, pela paciência durante este trabalho e, sobretudo, ao carinho e confiança depositados em mim.

E a Deus.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	8
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT .....	13
INTRODUÇÃO .....	14
1 A região ocular .....	15
1.2 O segmento posterior do bulbo ocular .....	15
1.3 A região periocular .....	17
1.4 A doença de Graves.....	17
1.5 Doenças oculares.....	20
1.5.1 A oftalmopatia de Graves .....	20
1.5.2 Esquemas de tratamento da oftalmopatia de Graves.....	22
1.6 A via periocular.....	25
1.7 Sistemas periorculares de liberação de fármacos composto pelo polímero poli $\epsilon$ -caprolactona (PCL) .....	26
1.8 Propriedades dos polímeros.....	27
1.9 Polímero biodegradável poli $\epsilon$ -caprolactona (PCL) .....	28
1.10 Sistemas de liberação de fármacos particulados .....	30
OBJETIVOS .....	31
1 Objetivo Geral .....	32
1.1 Objetivos específicos.....	32
MATERIAIS E METODOS.....	33
1 Validação da metodologia analítica.....	34
1.1 Materiais .....	34
1.2 Métodos .....	34
2 Desenvolvimento dos sistemas biodegradáveis de administração periocular contendo acetato de prednisolona .....	39
2.1 Materiais .....	39
2.2 Métodos.....	40

3 Caracterização das microesferas biodegradáveis desenvolvidas .....	41
3.1 Estudo da morfologia de superfície dos sistemas biodegradáveis para administração periocular. ....	41
3.1.1 Materiais e Métodos.....	41
3.2 Calorimetria diferencial exploratória .....	43
3.2.1 Materiais e Métodos.....	43
3.3 Teor de encapsulação .....	44
3.4 Estudo de liberação <i>in vitro</i> .....	44
3.4.1 Materiais .....	45
3.4.2 Métodos .....	45
3.5 Estudo de adsorção/encapsulação do acetato de prednisolona na superfície das microesferas.....	45
3.5.1 Materiais .....	46
3.5.2 Métodos .....	46
3.6 Estudo <i>in vivo</i> preliminar .....	46
3.6.1 Materiais .....	46
3.6.2 Métodos .....	47
3.6.3 Estudo de biocompatibilidade (análise histopatológica).....	49
3.6.4 Estudo preliminar de liberação <i>in vivo</i> .....	49
RESULTADOS E DISCUÇÃO .....	51
1 Validação da metodologia analítica.....	52
2 Preparação dos sistemas de administração periocular de acetato de prednisolona .....	57
3 Microscopia eletrônica de varredura .....	58
4 Calorimetria diferencial exploratória .....	61
5 Teor de encapsulação.....	64
6 Estudo de liberação <i>in vitro</i> .....	64
6.1 Estudo de adsorção/encapsulação do acetato de prednisolona na superfície das microesferas. ....	67
7 Estudo preliminar de liberação <i>in vivo</i> .....	68
7.1 Estudo de biocompatibilidade (análise histopatológica) .....	70
CONCLUSÃO.....	71
RERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tratamentos de primeira escolha do hipertireoidismo. Porcentagem da Doença de Graves .....	19
Tabela 2 - Condições cromatográficas de análise.....	35
Tabela 3 - Composição do tampão fosfato balanceado .....	36
Tabela 4 – Diluições para construção das curvas analíticas para quantificação do acetato de prednisolona. ....	37
Tabela 5 - Tratamento recebido pelos diferentes grupos de microesferas para análise de MEV. ....	42
Tabela 6 - Dados da construção da curva de calibração .....	52
Tabela 7 - Análise estatística intracorrida (Repetibilidade) .....	55
Tabela 8 - Análise estatística intercorridas (Intermediária) .....	55
Tabela 9 – Porcentagem de recuperação do AP adicionado às microesferas para a avaliação da exatidão do método.....	56
Tabela 10 – Peso e diâmetro dos implantes biodegradáveis perioculares.....	57
Tabela 11 – Ponto de fusão do polímero e do fármaco nas amostras estudadas na DSC.....	62



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Esquema das principais estruturas dos segmentos oculares.....	16
<b>Figura 2</b> – A região periocular e bulbo do olho.....	17
<b>Figura 3</b> - Injeção peribulbar inferior de microesferas, via transconjuntival.....	48
<b>Figura 4</b> – Exposição de músculo reto inferior (a). Retirada de fragmento de gordura orbitária (b).....	48
<b>Figura 5</b> - Exenteração ocular via transpalpebral.....	48
<b>Figura 6</b> - Curva analítica do acetato de prednisolona.....	52
<b>Figura 7</b> - Eluições da amostra em tampão fosfato/metanol 1:1.....	53
<b>Figura 8</b> - Cromatogramas obtidos para os testes de seletividade do estudo preliminar <i>in vivo</i> . (a) Eluição do fármaco com amostra do tecido adiposo. (b) Eluição do fármaco com amostra do tecido muscular. (c) Eluição do fármaco com amostra de vítreo.....	54
<b>Figura 9</b> – Cromatograma representativo de uma solução de acetato de prednisolona na concentração de 0,05 µg/mL.....	56
<b>Figura 10</b> – Fotomicroscopias da superfície das microesferas liofilizadas: (a) aumento de 2000 X e (b) aumento de 5000 X.....	58
<b>Figura 11</b> - Fotomicroscopias da superfície das microesferas liofilizadas que foram encubadas com PBS em tempos diferentes: (a) e (b) tempo de incubação de um mês com aumentos de 5000 X e 15000 X respectivamente. (c) e (d) tempo de encubação de dois meses com aumentos de 7000 X e 15000 X respectivamente e (e) e (f) com tempo de incubação de três meses e aumentos de 6000 X e 15000 X respectivamente.....	60
<b>Figura 12</b> – Termogramas de DSC: (a) das microesferas contendo fármaco, (b) do polímero, (c) do fármaco e (d) das microesferas sem fármaco.....	62
<b>Figura 13</b> – Liberação acumulada do acetato de prednisolona a partir das microesferas de PCL produzidas. (Os valores são representados como média ± desvio padrão, n= 6, p < 0,05).....	65
<b>Figura 14</b> – Liberação do acetato de prednisolona adsorvida na superfície das microesferas de PCL (os valores são apresentados como média ± desvio padrão, n = 3).....	67

<b>Figura 15</b> – Liberação do acetato de prednisolona a partir das microesferas de PCL nos tecidos adiposo da órbita, músculo reto inferior e vítreo (os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, n = 3).....	68
<b>Figura 16</b> - Corte histológico de exenteração ocular, sem evidências de toxicidade. ....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AP	Acetato de prednisolona
ARVO	Association for Research in Vision and Ophthalmology
ASTM	American Society Testing Materials
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DG	Doença de Graves
DSC	Differential Scanning Calorimetry
FAT	Drogas antitireoidianas
FDA	Food and Drug Administration
GAGs	Glicosaminoglicanas
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OG	Oftalmopatia de Graves
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCL	Poli- $\epsilon$ -caprolactona
PLA	Ácido poli(DL-lactico)
PLGA	Ácido poli lático-glicólico
TA	Termic Analysis
T <sub>c</sub>	Temperatura de recristalização
T <sub>g</sub>	Transição vítrea
TG	Termogravimetria
TRAb	Receptores de anticorpos de TSH
TSI	Imunoglobulinas tireoestimulantes
TSH	Hormônio estimulante da tireóide

## RESUMO

A oftalmopatia de Graves (OG) é a manifestação extra tireoidiana mais comum da doença de Graves (DG). Ela é caracterizada por inflamação nos tecidos da órbita e músculos extras oculares, levando a proptose do olho, o que causa desconforto, baixa qualidade de vida, e em alguns casos, cegueira. A OG não possui um tratamento específico e atualmente o mais comum é a injeção local (periocular) ou sistêmica de corticosteróides. Entretanto, esse tratamento não é bem tolerado devido ao desconforto causado pelas freqüentes injeções e efeitos colaterais causados pelas altas doses de corticosteróides. Uma alternativa para esta conduta é a cirurgia de descompressão, mas esta é muito agressiva e não elimina a doença. O alvo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar um sistema biodegradável de liberação prolongada de fármacos, destinados à administração periocular de acetato de prednisolona (AP) para o tratamento de OG e outras orbitopatias auto-imunes. É pretendida uma redução da incidência dos efeitos colaterais causados por este fármaco além de tornar o tratamento mais fácil e específico, reduzindo o número de injeções e a dose do fármaco quando comparado ao tratamento sistêmico. O sistema desenvolvido consistiu em microesferas de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) e o acetato de prednisolona, obtidas pelo método de evaporação de solvente. A caracterização do sistema por DSC não mostrou interação entre o fármaco e o polímero. A análise morfológica por MEV mostrou o sucesso da obtenção das microesferas e a degradação da matriz polimérica em diferentes tempos durante a liberação do fármaco. A avaliação do perfil de liberação *in vitro* mostrou a capacidade do sistema de liberar o fármaco em pequenas doses e por um período de tempo prolongado. O estudo *in vivo* preliminar mostrou a viabilidade do sistema pela ausência de toxicidade local e a confirmação do perfil de liberação prolongada. Concluiu-se que, o sistema de liberação avaliado apresenta potencial para ser empregado no tratamento OG e outras doenças oftálmicas auto-imunes.

Palavras chaves:

Sistema de liberação de fármacos; Via Periocular; Acetato de Prednisolona; Polímero biodegradável; Tratamento de oftalmopatia de Graves.

## ABSTRACT

The Graves ophthalmopathy (GO) is the most common extra thyroidian manifestation of the Graves disease. It is characterized by inflammation on orbitary tissues and extra-oculars muscles, leading to eye proptosis, which causes low quality of life and, in some cases, blindness. The GO doesn't have a specific treatment and actually the most common is the corticoid therapy by local (periocular) or systemic shoots. However, this treatment is not well tolerated because of the discomfort caused by the frequent shoots and of some side effects caused by the high corticoid doses. An alternative is the decompression surgery, but it is very aggressive and do not eliminate the disease. The aim of this work was to develop, characterize and evaluate a biodegradable drug delivery prolonged-release, destined to periocular administration of prednisolone acetate for the treatment of GO and others autoimmune orbitopathies. It is intended to reduce the incidence of side effects caused by this drug and to make the treatment easier and specific, reducing the number of administrations when compared to the systemic treatment. The developed systems consists in poli- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) and prednisolone acetate microspheres, obtained by de solvent evaporation method. The system characterization by DSC has shown the absence of some detectable physical and chemical interaction between drug and polymer. The morphological analysis by MEV showed the successful obtention of the microspheres and their polymeric matrix degradation in different times during the drug liberation. The *in vitro* preliminary release profile showed the prolonged-release characteristics of th developed system. The preliminary *in vivo* study did not detect any local toxicity. In summary, the delivery systems evaluated in the present work can be applied, in the future, for the treatment of GO and other auto immune ophthalmic diseases.

Keywords:

Drug delivery system; Via Periocular; Prednisolone acetate; Biodegradable polymer; Graves ophthalmopathy treatment.

## INTRODUÇÃO

## **1 A região ocular**

A região ocular é uma área situada na face dos animais que compreende o bulbo ocular e seus anexos (NETTER, 2000).

O bulbo ocular encontra-se situado em uma cavidade óssea, a órbita, cuja principal função é a sua proteção (SNELL e LEMP, 1998). Ele é dividido anatomicamente em dois segmentos principais, sendo eles o anterior e o posterior. O segmento anterior é composto pela córnea, esclera, câmaras posterior e anterior, íris, corpo ciliar e lente. O segmento posterior é formado pelo corpo vítreo, retina, coróide, nervo óptico e também pela esclera (OGURA, 2001; YASUKAWA et al., 2004).

Os anexos do bulbo ocular são constituídos pelas pálpebras, conjuntiva e sistema lacrimal (SNELL e LEMP, 1998). Porém, nem estas estruturas nem as que formam o segmento anterior do olho serão consideradas neste trabalho.

### **1.2 O segmento posterior do bulbo ocular**

A esclera, também presente no segmento anterior do olho, forma juntamente com a córnea, a camada protetora e fibrosa do olho, e é a porção mais externa do segmento posterior. As fibras do nervo óptico atravessam a esclera, através de uma área posterior desta estrutura denominada lâmina cribrosa (SNELL e LEMP, 1998).

A retina, camada mais interna do bulbo do olho, é uma membrana fina e transparente. Posteriormente, ela se estende anteriormente em direção ao epitélio do corpo ciliar e à íris. A sua superfície externa se encontra em contato com a lâmina basilar da coróide e a interna está em contato com o corpo vítreo. É a estrutura ocular responsável pela captação dos estímulos luminosos, para a qual utiliza os fotorreceptores nela presentes, que são os cones e bastonetes. Essas células são as responsáveis por transformar em impulsos elétricos a energia química produzida por eles quando são expostos à luz (SNELL e LEMP, 1998).

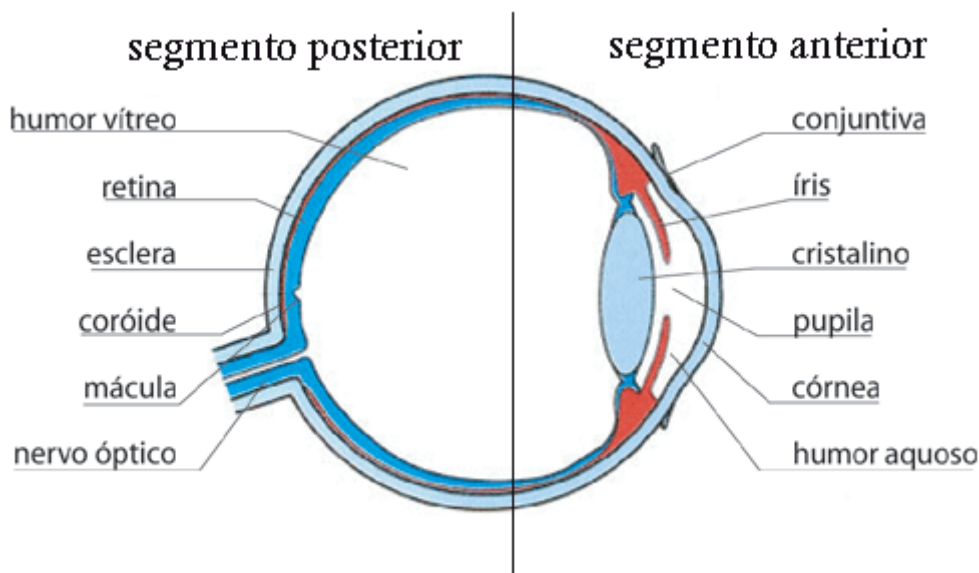
O corpo vítreo é uma estrutura gelatinosa, transparente e incolor. Ele se localiza na câmara vítrea, ocupando cerca de 60 a 80% do bulbo ocular na região posterior à lente. Ele sustenta lateralmente o corpo ciliar e a retina (WOLFF'S, 1993).

Quimicamente, o vítreo é constituído por 98% de água, ácido hialurônico, aminoácidos, proteínas solúveis, sais e ácido ascórbico (SNELL e LEMP, 1998).

Do ponto de vista de distribuição de fármacos, o corpo vítreo pode ser visto como um líquido estático, onde pequenas substâncias ou solutos são transportados principalmente por difusão (RITTENHOUSE e POLLACK, 2000).

A coróide é uma camada localizada entre a esclera e a retina, ricamente vascularizada e a principal responsável pela nutrição da retina.

A Figura 1 apresenta as principais estruturas do bulbo ocular, dividindo em segmento anterior e posterior.

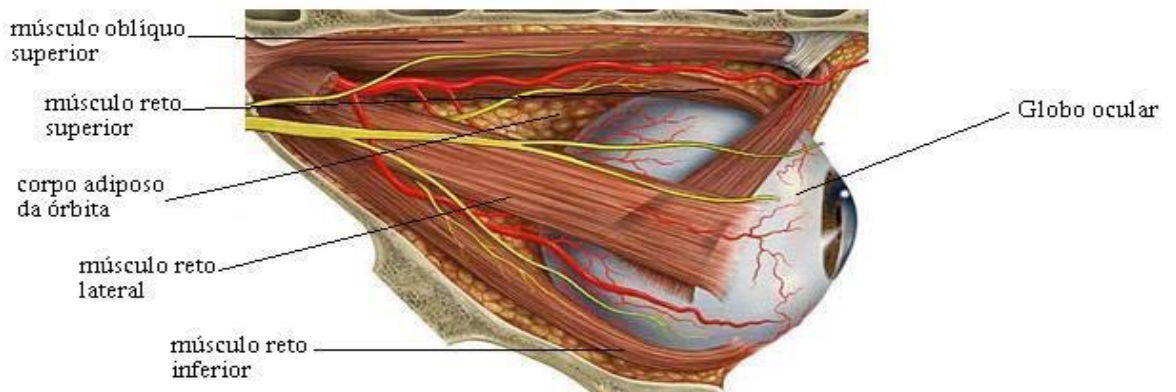


**Figura 1** – Esquema das principais estruturas dos segmentos oculares.



### 1.3 A região periocular

A região periocular é constituída pelos músculos responsáveis pela movimentação do bulbo (reto superior, reto lateral, reto inferior, reto medial, oblíquo inferior e oblíquo superior) e pelo corpo adiposo da órbita, que sustenta e protege o bulbo ocular. Também conhecida como perioftálmica ou peribulbar, pode ser definida como toda a região ocular com exceção do bulbo ocular, limitada pelasão a membrana periorbital, que envolve por completo todos os ossos da órbita, e pela cápsula de Tenon, que é uma estrutura de tecido conjuntivo que circunda todo o bulbo ocular (Figura 2).



**Figura 2** – A região periocular e bulbo do olho.

### 1.4 A doença de Graves

A doença de Graves (DG), também denominada doença de Basedow ou de Parry, caracteriza-se por produção e secreção excessivas de hormônio tireóidiano e bócio difuso. Esta doença é mais provavelmente um distúrbio auto-imune em que os linfócitos B produzem imunoglobulinas, algumas das quais se ligam ao receptor de TSH e o ativam, estimulando o aumento de volume da tireóide e a secreção de hormônio em excesso. O receptor de TSH parece representar o local antigênico para esses anticorpos que atuam como se fossem o próprio TSH, sendo denominadas imunoglobulinas tireoestimulantes (TSI) (BENNETT e CECIL, 1997).

O quadro do hipertireoidismo é decorrente do estímulo excessivo do sistema nervoso adrenérgico e dos níveis elevados de hormônios tireoidianos circulantes. (ROCHA, 1998) e é caracterizado imunologicamente por infiltração linfocitária da glândula tireóide e por ativação do sistema imune com elevação dos linfócitos T circulantes e aparecimento de auto-anticorpos que se ligam ao receptor do TSH (TRAb) e estimulam o crescimento e a função glandular. As razões do desencadeamento deste processo auto-imune ainda não estão completamente entendidas, mas estão possivelmente envolvidos fatores como susceptibilidade genética, fatores constitucionais (hormônios sexuais e alterações da função imunológica) e fatores ambientais (estresse, ingestão de iodo e a ação de agentes infecciosos) (ANDRADE et al., 2001).

Do ponto de vista clínico, o hipertireoidismo da DG caracteriza-se por aumento difuso e hiperatividade da glândula tireóide, associada ou não a oftalmopatia infiltrativa e, mais raramente, a mixedema localizado (DABON-ALMIRANTE et al., 1998).

A DG constitui a forma mais comum de hipertireoidismo (60%-80%), afetando principalmente as mulheres (5-10:1) entre 40-60 anos (JACOBSON et al., 1997). A maioria dos estudos relata taxas de incidência de 0,5/1000 indivíduos/ano e o risco calculado de mulheres e homens desenvolverem o hipertireoidismo em alguma fase de suas vidas é de 5 e 1% respectivamente (ANDRADE et al., 2001). Segundo Bennett e colaboradores (1997), o paciente típico com DG é uma mulher entre 25 e 30 anos de idade, apresentando início recente de nervosismo, dificuldade no controle das emoções e estado de cansaço agitado que se agravam devido aos distúrbios do sono, sensação de intolerância ao calor, intensa sudorese, palpitações, fraqueza muscular, hiperdefecação e perda de peso, a despeito do apetite.

Vários fatores podem influenciar na seleção do tratamento do hipertireoidismo da DG, como idade do paciente, tamanho da tireóide, gravidade do hipertireoidismo, preferência do paciente e do médico, recursos disponíveis e prática médica local. Três abordagens terapêuticas são atualmente utilizadas no tratamento do hipertireoidismo da DG: fármacos antitireoidianos (FAT), cirurgia e iodo radioativo.

Nenhuma delas é considerada ideal, visto que não atuam diretamente na etiologia / patogênese da doença (ANDRADE et al.,2001).

Tabela 1 – Tratamentos de primeira escolha do hipertireoidismo. Porcentagem da Doença de Graves

Tipo de terapia	Países			
	EUA	Europa	Japão	América Latina
Iodo Radioativo	69	22	11	26
Fármacos (FAT)	30	77	88	73
Cirurgia	1	1	1	1,3

Fonte – Adaptado de Andrade et al., 2001.

O excesso de hormônios tireoidianos pode levar ao desenvolvimento de complicações graves, como insuficiência cardíaca congestiva, cardiomiopatia e arritmias, principalmente fibrilação atrial (10-30%). Também está associado ao aumento da reabsorção óssea e elevação da excreção de cálcio e fósforo na urina e fezes, com conseqüente diminuição na densidade mineral óssea e risco de fraturas em mulheres idosas (ANDRADE et al.,2001).

Aumento de tamanho da tireóide, oftalmopatia infiltrativa, dermatopatia e acropaquia são mediados por processos auto-imunes, distinguindo, assim, a doença de Graves de outras causas de tireotoxicose, quando os tecidos do organismo ficam expostos a quantidades excessivas de hormônio tireóideo, resultando em alterações metabólicas específicas e alterações fisiopatológicas na função dos órgãos. Com freqüência a palpação revela aumento difuso e simétrico da tireóide (duas a três vezes o tamanho normal), mas usualmente a doença de Graves caracteriza-se pelo achado de oftalmopatia infiltrativa (BENNETT e CECIL, 1997).

## **1.5 Doenças oculares**

Na clínica médica destacam-se doenças que estão associadas à ocorrência de inflamações do olho, tais como a doença de Behçet, síndrome de Reiter, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada, toxoplasmose, sífilis, tuberculose, meningite, orbitopatas de Graves, neoplasias, hipertensão arterial, arteriosclerose, retinopatia diabética, lúpus eritematoso sistêmico e psoríase (BENNETT e CECIL, 1997).

As doenças oculares têm relação direta com a qualidade de vida das pessoas, e como estas doenças podem levar à cegueira se não tratadas, pode-se dizer que têm também influência direta na economia global.

De acordo com estimativas da prevalência de deficiências visuais e suas causas, divulgadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e considerando a população mundial de 2002, o número estimado de pessoas com deficiências visuais era de 161 milhões, sendo 37 milhões de indivíduos cegos e 124 milhões com baixa visão (RESNIKOFF et al., 2004).

### **1.5.1 A oftalmopatia de Graves**

A oftalmopatia de Graves (OG) é a manifestação extra-tireodiana mais comum da doença de Graves, representando a condição inflamatória mais freqüente dos tecidos orbitários e músculos extra-oculares. Além disso, é a causa mais comum de exoftalmia, sendo responsável por mais de 50% dos casos (MOURA et al., 2005). Embora ocorra mais freqüentemente em mulheres adultas entre 30 e 50 anos de idade, a oftalmopatia de Graves pode acometer pacientes de ambos os sexos de diferentes faixas etárias, incluindo neonatos, crianças e adultos acima de cinquenta anos de idade (BURCH et al., 1993).

A oftalmopatia de Graves é um processo auto-imune que afeta o tecido retrotubular e possui uma forte ligação com doenças relacionadas à tireóide. Os sintomas incluem uma visão borrada, visão anormal das cores, disfunção do músculo extra-ocular, inchamento da pálpebra, retração da pálpebra, vermelhidão da

conjuntiva, proptose (deslocamento anterior do bulbo ocular) e dor (OHTSUKA et al., 2003).

A principal característica da oftalmopatia de Graves é um aumento no volume dos músculos extra-oculares e de tecido adiposo retrobulbar. O edema dos tecidos retrotubulares é atribuído a secreção excessiva de glicosaminoglicanas (GAGs) pelos fibroblastos orbitais. GAGs, devido a suas cargas iônicas, atraem grandes quantidades de água, o que contribui para o edema. Com o edema, ocorre um aumento do conteúdo do orbital, que confinado na cavidade da órbita, causa um aumento da pressão, determinando as anormalidades visuais características desta doença (WILMAR et al., 2002). O contínuo aumento da pressão retrobulbar pode levar a uma compressão do nervo ótico conduzindo à cegueira (WAKELKAMP et al., 2005).

A infiltração de linfócitos indica a natureza auto-imune da doença. Essas células provavelmente produzem concentrações consideráveis de anticorpos dirigidos contra o receptor de TSH. Em pacientes com oftalmopatia da DG, o aumento do conteúdo retro-orbitário resulta em protusão dos glóbulos oculares. Os tecidos retro-orbitários exibem acentuada infiltração de linfócitos, mastócitos e plasmócitos, juntamente com quantidades aumentadas de mucopolissacarídeos, sobretudo ácido hialurônico. Os músculos extra-oculares apresentam edema, infiltrado celular e deposição de mucopolissacarídeos, resultando em fibrose muscular. Nos pacientes com mixedema pré-tibial, a pele exhibe infiltração proeminente por linfócitos e deposição de mucopolissacarídeos. (BENNETT e CECIL, 1997).

Um questionário realizado relacionando saúde à qualidade de vida mostrou que pacientes que sofrem da oftalmopatia de Graves possuem uma qualidade de vida menor que pacientes que possuem *diabetes mellitus* ou doenças intestinais inflamatórias crônicas. Visto este fato, muitos estudos têm sido realizados buscando desenvolver terapias mais eficazes para o tratamento desta enfermidade (GREDING et al., 1997).

### **1.5.2 Esquemas de tratamento da oftalmopatia de Graves**

Os sítios de ação da maioria dos fármacos utilizados em oftalmologia estão localizados no interior do olho, mais especificamente na córnea, câmaras anterior e posterior e seus tecidos, e câmara vítrea (DING, 1998; DAVIES, 2000). Porém, no caso específico das orbitopatias, os principais alvos estão localizados na região periocular, onde estão os tecidos orbitários e músculos extra-oculares. A via sistêmica pode ser utilizada com essa finalidade, mas para que se obtenha uma concentração do fármaco dentro da faixa terapêutica é necessária a administração de concentrações elevadas durante um período prolongado, podendo ocasionar sérios efeitos adversos (PEYMAN e GANIBAN, 1995).

As formas de tratamento mais usuais da oftalmopatia de Graves são cirurgias de decompressão, terapia usando cortocosteróides (mais comumente prednisolona e metilprednisolona) e radioterapia. Outros tratamentos, incluindo fármacos imunossupressores, imunoglobulinas e octreotide, têm sido sugeridos, mas ainda precisam ser melhor avaliados. (BARTALENA et al., 1997).

O tratamento com cortocosteróides tem seu lugar estabelecido no tratamento da oftalmopatia de Graves devido às suas ações antiinflamatórias e imunossupressoras. O tratamento por via oral tem se mostrado eficaz na redução da inflamação de casos menos complicados da doença. Entretanto, o tratamento por esta via também possui a grande desvantagem de ser acompanhado pelos efeitos colaterais relacionados à administração de altas doses de cortocosteróides (BARTALENA et al., 1997).

Atualmente, estudos têm mostrado a eficácia da utilização de altas doses de cortocosteróides por via endovenosa para o tratamento da oftalmopatia de Graves, onde pacientes tratados por esta via tem tido uma melhora muito mais significativa do que os tratados com estes fármacos por via oral. Um dos principais inconvenientes do tratamento por via endovenosa, além daqueles semelhantes aos que ocorrem com a terapia por via oral, é o desconforto causado ao paciente pelas freqüentes injeções necessárias para o tratamento. Um esquema muito utilizado na terapia endovenosa é a administração de 1,0 g de metilprednisolona por dia,

durante três dias consecutivos, repetindo-se por pelo menos três semanas consecutivas (OHTUSKA et al., 2003).

A combinação de radioterapia com altas doses de cortocosteróides por via endovenosa tem sido utilizada para o tratamento da oftalmopatia de Graves afim de alcançar melhores resultados quando se comparado a qualquer uma destas terapias isoladas. Possivelmente a radioterapia provocaria melhoras a longo prazo e os cortocosteróides em curto prazo, entretanto o efeito da radioterapia ainda é controverso (OHTUSKA et al., 2003).

A radioterapia, após o tratamento com cortocosteróides por via endovenosa, não apresentou nenhum efeito terapêutico benéfico e nenhuma vantagem com relação aos efeitos indesejáveis provocados (OHTUSKA et al., 2003). O aparecimento de retinopatias e catarata têm sido reportados em pacientes tratados com radioterapia, sendo que a incidência destes efeitos indesejados é maior em pacientes tratados com radioterapia concomitante com cortocosteróides. (MILLER et al., 1991).

Segundo Wakelkamp e colaboradores (2005), a cirurgia de descompressão não deve ser escolhida como a primeira alternativa para o tratamento da oftalmopatia de Graves, mesmo quando severa. A cirurgia imediata não apresentou nenhuma vantagem em relação ao tratamento com metilprednisolona por via endovenosa e, baseado nos resultados deste estudo, a melhor escolha para o tratamento inicial seria uma terapia imunossupressora. Quando é insuficiente a melhora na acuidade visual, ou o quadro se agrava mesmo com doses elevadas de cortocosteróides, a cirurgia de descompressão para aliviar a pressão no nervo ótico é então recomendada. A cirurgia de descompressão também é indicada para reabilitação quando a doença se torna inativa (WILMAR et al., 2002).

Ações relevantes da patogenia da oftalmopatia de Graves incluem funções de células mediadoras, ativação de complemento, interferência nas funções das células T e B, diminuição da ação de neutrófilos, monócitos e macrófagos na área influenciada, inibição da função de células imunocompetentes no sítio da inflamação,

redução da síntese e secreção de citoquinina e diminuição na síntese e secreção de (BARTALENA et al., 1991).

Corticosteróides podem ser administrados por via oral, intravenosa ou local, sendo o glicocorticoide mais utilizado no tratamento da oftalmopatia de Graves a prednisolona. Por via oral, os glicocortocosteróides são usados em doses elevadas, (60-100 mg de prednisolona por dia como dose inicial, com diminuição gradativa por um período de cinco a seis meses) (BARTALENA et al., 1991). O maior problema da administração oral de glicocortocosteróides são os efeitos colaterais tais como diabetes, infecções, hipertireoidismo, osteoporose, úlcera péptica, catarata e supressão prolongada das funções adrenais. (BARTALENA et al., 1997).

Corticosteróides também são administrados por via intravenosa com a finalidade de diminuir a ocorrência de efeitos colaterais e, possivelmente, com uma diminuição da supressão do eixo adrenal-pituitario (BURCH e WARTOFSKY, 1993). Embora esta via diminua a incidência de efeitos adversos, o paciente deve estar ciente e disposto a receber freqüentes injeções do fármaco (BARTALENA et al., 1997).

A prednisolona é um fármaco da classe dos corticosteroides, que possui ações antiinflamatória (esteroidal) e imunossupressora . Entre as muitas indicações da prednisolona, como as dermatites e colites, ela também é indicada para o tratamento de infamações não reumáticas e inflamações agudas ou crônicas das vias oftálmicas (THOMSON MICROMEDEX 1974 - 2006).

Assim como outros corticosteróides, a prednisolona diminui ou impede a resposta tissular ao processo inflamatório por intermédio da redução do desenvolvimento dos sintomas da inflamação, sem afetar a causa principal da mesma. Os cortocosteróides inibem a acumulação de células inflamatórias, incluindo macrófagos e leucócitos, nos locais da inflamação. Eles também inibem a fagocitose, a liberação de enzimas lisosomais e a síntese ou liberação de alguns mediadores químicos da inflamação. Apesar dos mecanismos ainda não serem bem compreendidos, ações que podem contribuir para esses efeitos incluem o bloqueio da ação do fator de inibição do macrófago (MIF), levando à inibição da localização



dos macrófagos, redução da dilatação e permeabilidade dos capilares inflamados e redução da aderência dos leucócitos aos capilares endoteliais, determinando uma inibição tanto da migração dos leucócitos quanto da formação do edema. Os cortocosteróides também aumentam a síntese de lipomodulinas, que são inibidores da fosfolipase A2, um mediador da liberação do ácido araquidônico das membranas fosfolipídicas. Subseqüentemente, ocorre a inibição da síntese dos mediadores da inflamação que são derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) (THOMSON MICROMEDEX 1974 - 2006).

Apesar dos vários estudos realizados com a prednisolona em inflamações oculares, a sua utilização pela via periocular, veiculada em sistemas poliméricos, ainda precisa ser melhor investigada. As informações obtidas em um estudo desta natureza serão de grande importância para se obter, em curto prazo, um medicamento eficaz e seguro para o tratamento das oftalmopatias.

O uso da prednisolona, por meio de sistemas de liberação controlada e sistemas poliméricos na forma de implantes periorculares, com a finalidade de melhorar a biodisponibilidade do fármaco, pode vir a ser uma opção importante para o tratamento de orbitopatias auto-imunes.

## **1.6 A via periocular**

A via periocular, também conhecida como peribulbar, começou a ser difundida como uma via de administração de fármacos em 1986, primeiramente para administração de anestésicos locais. Para a administração através desta via, uma pequena agulha é utilizada, podendo-se injetar até 3 ml de solução na região da órbita, porém sem atingir o bulbo e os músculos oculares. Esta via é utilizada no tratamento de doenças do segmento posterior do olho por meio das injeções subconjuntival e, principalmente, subtenoniana (CARR, 2004).

A esclera constitui o tecido de acesso a esta via e algumas de suas características, tais como elevada área de superfície e fácil acesso, alto grau de hidratação e permeabilidade que não mostra declínio apreciável com a idade,

facilitam a administração de fármacos por meio de injeções perioculares (FOSTER et al., 1994; OLSEN et al., 1995, 1998; AMBATI et al., 2000).

Os principais riscos relacionados à via periorcular incluem a perfuração do bulbo do olho, a fibrose dos músculos extra-oculares e a possível ocorrência de endoftalmite (SMITH et al., 2002; GUPTA et al., 2003).

Visto que vários procedimentos têm sido adotados quanto ao tratamento medicamentoso, a administração de fármacos na região periorcular é uma nova alternativa da área clínica.

### **1.7 Sistemas perioculares de liberação de fármacos composto pelo polímero poli $\epsilon$ - caprolactona (PCL)**

Uma das principais alternativas em estudo atualmente para o tratamento de doenças que necessitam da administração de medicamentos por longos períodos, consiste no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos. Estes sistemas, constituídos de polímeros e preparados na forma de dispositivos implantáveis, podem ser capazes de proporcionar uma liberação de fármaco(s) por longos períodos (LEMMOUCHI et al., 1998).

Os sistemas de liberação de fármacos na forma de implante devem ser biocompatíveis com o organismo e, portanto, os componentes nele presentes devem ser não carcinogênicos, hipoalergênicos, mecanicamente estáveis e não causadores de resposta inflamatória no local de aplicação. Além disso, as características químicas e físicas do material não devem ser modificadas pelo tecido local (BOURGES et al., 2006).

Os polímeros biodegradáveis e não biodegradáveis são largamente utilizados no desenvolvimento de implantes oculares, sendo os biodegradáveis as poliamidas, poliaminoácidos, polialquilcianacrilatos, poliésteres, poliortoésteres, poliuretanos e poli(acrilamidas), e os não-biodegradáveis os derivados de celulose, silicones, polímeros acrílicos, polivinilpirrolidona e copolímeros dos óxidos de etileno e propileno (FIALHO, 2003).

Os polímeros biodegradáveis mais utilizados atualmente são os poliésteres, tais como a poli ( $\epsilon$ -caprolactona), o ácido poli (D,L-lático) (PLA) e os copolímeros derivados dos ácidos láticos e glicólico (PLGA). Esses materiais são biocompatíveis com o organismo, além de possuírem um perfil de degradação característico quando em contato com meios similares ao fisiológico ou em contato em fluidos biológicos (FIALHO, 2003).

Os sistemas compostos por polímeros não-biodegradáveis precisam ser removidos posteriormente por processos cirúrgicos e, muitas vezes, a operação de retirada é muito mais traumática do que a de inserção, causando extremo desconforto aos pacientes (SUN et al., 2006). Já os biodegradáveis são totalmente absorvidos pelo organismo, não necessitando a remoção e proporcionando uma maior adesão e aceitação do paciente ao tratamento (YASUKAWA et al., 2001).

Aproveitando estes estudos sobre polímeros e os recentes avanços nos sistemas de liberação prolongada de fármacos em oftalmologia, a elaboração de um sistema polimérico de administração periocular é uma idéia ainda em amadurecimento, mas que pode vir a ser útil para tratar oftalmopatias e outras inflamações locais.

## **1.8 Propriedades dos polímeros**

Polímeros são macroestruturas compostas por unidades de repetição ligadas por ligações covalentes e intramoleculares, formando uma cadeia polimérica, essas unidades chamam-se meros. A massa molecular define as propriedades físicas e varia enormemente de cadeia pra cadeia. Estes são classificados quanto à distribuição da massa molecular, comportamento térmico e mecânico dos polímeros (CANAVAROLO e SEBASTIÃO, 2002)

Os polímeros podem possuir cadeias lineares, com ramificações ou braços, copolímeros ou com ligações cruzadas ou em rede. A estrutura e ligação das cadeias é um dos fatores que define comportamentos físicos e mecânicos dos polímeros (CANAVAROLO e SEBASTIÃO, 2002; ORÉFICE et al., 2006).

O comportamento dos polímeros sob uma variação térmica pode ser definido como: termoplásticos, são amolecidos quando aquecidos os quais deformam sob a aplicação de uma pressão mediada por ligações fracas intermoleculares do tipo Van Der Waals; e termorrígidos, que não amolecem com o aumento da temperatura os quais são difíceis de serem processados possuindo ligações cruzadas entre cadeias (CANAVAROLO e SEBASTIÃO, 2002; ORÉFICE et al., 2006).

A solubilidade do polímero em determinado solvente é caracterizada pela capacidade do solvente em solvatar as cadeias e quebrar as ligações cadeia-cadeia formando ligações cadeia-solvente. Polímeros com massa molecular elevada, com ligações cruzadas e presença de cristais possuem menor solubilidade (CANAVAROLO e SEBASTIÃO, 2002; ORÉFICE et al., 2006).

Os polímeros podem apresentar suas características físico-químicas modificadas quando estes são associados a uma mistura polimérica ou a um fármaco. Entre essas principais características destacam-se a distribuição de proporções de monômero em copolímeros e a temperatura de transição vítrea ou de fusão, que podem influenciar no comportamento *in vivo* do mesmo (HAURBERGER et al., 1995).

Quando os polímeros fazem parte da constituição de um sistema de liberação de fármacos, características podem estar sendo acrescentadas ou alteradas, tais como área da superfície, densidade da amostra, morfologia da superfície, tamanho de partículas, perfil de degradação e de da liberação a partir do sistema (HAURBERGER et al., 1995).

### **1.9 Polímero biodegradável poli $\epsilon$ -caprolactona (PCL)**

A aplicabilidade de polímeros biodegradáveis na medicina vem sendo estudada desde a década de 60. São compostos biocompatíveis com o organismo, ou seja, atóxicos, não cancerígenos, hipoalergênicos e que não causam respostas inflamatórias no local da aplicação; além disso, possuem cinética previsível de degradação. São largamente utilizados como constituintes de fios de sutura e como

materiais fixadores de fraturas em lugar dos pinos metálicos (ATHANASIOU et al., 1996).

Na classe dos polímeros biodegradáveis, o poliéster alifático poli- $\epsilon$ -caprolactona ( $[-O-(CH_2)_5-CO-]_n-$ ), com ponto de fusão próximo a 60 C°, Tg ~ -66°C e densidade 1.145 (ALDRICH HANDBOOK OF FINE CHEMICALS AND LABORATORY EQUIPMENT 2000 – 2001), apresenta interesse particular na obtenção de sistemas de liberação de fármacos, principalmente por permitir uma boa modulação do tempo de liberação da substância veiculada. A liberação ocorre por erosão/clivagem, mecanismo pelo qual o polímero se transforma em pequenas moléculas solúveis e não tóxicas pela quebra de sua estrutura (BARBANTI et al., 2006.)

Exposto aos fluidos aquosos do corpo, inicialmente os materiais sofrem hidratação. Com a presença das moléculas de água, o processo de degradação se dá por meio da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros ou monômeros, solúveis e não tóxicos. A degradação prossegue então por processos biologicamente ativos (fagocitose) ou pela clivagem hidrolítica passiva (BARBANTI et al., 2006; BOURGES et al., 2006).

A utilização farmacêutica da poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) como sistema de liberação de fármacos, seja na forma de micro ou nano partículas, seja na forma de implantes sólidos, foi bastante explorada nestes últimos anos para a administração de fármacos nas diferentes vias de administração e visando o tratamento de diferentes doenças. Extensivos estudos *in vitro* e *in vivo* de eficácia e biocompatibilidade foram realizados, o que resultou na aprovação pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) de estudos clínicos de fase II em humanos para alguns dispositivos de liberação de fármacos compostos pela poli- $\epsilon$ -caprolactona (SUN et al., 2006).

A PCL é sintetizada em altas temperaturas por uma polimerização de abertura do anel monomérico  $\epsilon$ -caprolactona. A degradação do PCL por clivagem das

ligações ésteres produz pequenos fragmentos poliméricos que se difundem da matriz e passam por fagocitose (BARBANTI et al., 2006).

Embora os polímeros PLA e PLGA sejam mais empregados e estudados para dispositivos farmacêuticos de liberação prolongada de fármacos, o emprego do PCL neste estudo se deve a sua característica de liberação mais prolongada quando comparada a estes outros polímeros, particularidade esta, explicada por sua lenta taxa de degradação hidrolítica (ESTELLE´S et al., 2008; SUN et al., 2006).

### **1.10 Sistemas de liberação de fármacos particulados**

Sistemas de liberação de fármacos particulados incluem as nanopartículas e micropartículas, nanoesferas e microesferas e nanocápsulas e microcápsulas. O fármaco pode ser dissolvido ou encapsulado no material macromolecular constituinte das partículas, no caso, os polímeros biodegradáveis (BOURGES et al., 2006).

Microesferas são uma combinação polímero-fármaco onde o fármaco se encontra homogeneamente disperso na matriz polimérica (BOURGES et al., 2006). São capazes de modificar aumentando ou diminuindo a velocidade de degradação dos reservatórios poliméricos e, com isso, modificar a cinética de liberação do fármaco (MOSHFEGHI et al., 2005).

Sistemas particulados possuem algumas vantagens sobre os sistemas implantáveis sólidos. Devido a seu tamanho, podem ser injetados diretamente no local desejado, como em injeções intra-oculares. As microesferas agem como um reservatório após a injeção, e pode-se obter a liberação de fármacos de um reservatório polimérico construído com PCL por mais de 250 dias, com uma cinética de ordem zero (OGURA et al., 1995; BOURGES et al., 2006).

## **OBJETIVOS**

## 1 Objetivo Geral

Este trabalho objetivou desenvolver e avaliar sistemas obtidos a partir do polímero biodegradável poli- $\epsilon$ -caprolactona, destinados à administração periocular de acetato de prednisolona (AP) para o tratamento de oftalmopatias auto-imunes, em específico, a oftalmopatia de Graves.

### 1.1 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar a metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Desenvolver e caracterizar os sistemas à base do polímero poli- $\epsilon$ -caprolactona contendo AP;
- Avaliar a interação entre o AP e o polímero utilizado no desenvolvimento dos sistemas;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* dos sistemas obtidos;
- Avaliar, preliminarmente, o perfil de liberação *in vivo* dos sistemas obtidos;
- Comparar o perfil de liberação *in vitro* e *in vivo* dos sistemas desenvolvidos;
- Avaliar, preliminarmente, a toxicidade dos sistemas preparados após aplicação periocular por meio de exame clínico e histopatológico.



## **MATERIAIS E METODOS**

## **1 Validação da metodologia analítica**

### **1.1 Materiais**

Acetato de prednisolona (Galena), água destilada, deionizada e filtrada, acetonitrila grau CLAE (Merck KGaA, Alemanha). Os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

Cromatógrafo líquido Waters ® , equipado com bomba modelo 515, injetor automático modelo 717plus, detector de ultravioleta modelo 2487, programa Millennium ® versão 2.15.01 (Waters, EUA). Coluna C -18 de 4,6 mm de diâmetro, 25 cm de comprimento e tamanho de partículas de 5 µm (ACE® - 121-2546).

### **1.2 Métodos**

O método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi empregado para determinação da concentração do AP nos sistemas desenvolvidos (teor de encapsulação); para a determinação do AP na solução de tampão fosfato (phosphate buffered solution – PBS) meio de liberação empregado no estudo de liberação *in vitro* e para a determinação da concentração do AP no vítreo e nos tecidos muscular e adiposo no estudo de liberação *in vivo*.

Com o objetivo de definir as condições ideais para análise em CLAE, foram realizadas primeiramente tentativas de definição de parâmetros de análise. São estes: tipo de fase móvel, fluxo, comprimento de onda de detecção, pH da fase móvel, tipo de fase estacionária (coluna) e tempo de retenção (BRASIL, 2003). As condições de análise tiveram como fundamento trabalhos que utilizaram CLAE como método de quantificação do AP em variados tipos de estudos, sendo diversas as condições de análise por esse método.

As condições de análises foram variadas em constituição de fase móvel, pH da fase móvel, fluxo e volume de injeção (Adaptado de THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2000).

Os experimentos para validação do método foram realizados após a definição das melhores condições cromatográficas de análise que estão demonstrados na Tabela 2. Foram considerados os parâmetros preconizados pela Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária: seletividade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão (BRASIL, 2003).

Tabela 2 - Condições cromatográficas de análise

<b>Fase móvel</b>	<b>temperatura</b>	<b>Fluxo da Fase Móvel (mL/min)</b>	<b>Modo do Fluxo</b>	<b>Comprimento de onda no UV (nm)</b>	<b>Volume de injeção</b>
Água:acetonitrila (55:45)	Ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ )	1,2	isocrático	240	20 $\mu\text{L}$

Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI et al. 2004). O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida (determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos) (BRASIL, 2003).

De acordo com a Resolução RDC nº 899 de 29 de maio de 2003 do Ministério da Saúde, a especificidade ou seletividade é a capacidade de medir exatamente um composto na presença de outros componentes como impurezas e produtos de degradação.

Para a análise da seletividade, devem-se identificar substâncias indesejáveis que podem estar presentes no momento da quantificação e avaliar se ocorrem alterações e interferências na análise da substância de interesse.

Para a determinação da especificidade, foi analisado o tampão fosfato (tabela 3) que será utilizado no teste de liberação *in vitro*, os solventes utilizados para solubilização das amostras, o polímero poli- $\epsilon$ -caprolactona utilizado na fabricação

das microesferas além dos tecidos utilizados no teste de liberação *in vivo* (vítreo, muscular e adiposo).

Tabela 3 - Composição do tampão fosfato balanceado

Componentes	Concentração (% p/v)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,144g
NA <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,795g
NACL	9,0g
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p. 1000mL

Fonte: MARTINDALE (1989, p.1023) apud FIALHO (2003).

O estudo da linearidade permite verificar que as soluções amostras estão em uma faixa de concentração onde as respostas do analito são proporcionais à concentração.

Caso haja relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados deverão ser tratados por testes estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação (r), intercepto do eixo y, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. O critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação (r) deve ser 0,99 (BRASIL, 2003).

A linearidade do método foi avaliada com a construção de uma curva analítica com cinco níveis de concentração, nos intervalos de 0,5 µg/mL a 10 µg/mL.

Para a construção das curvas analíticas foram preparadas três soluções estoque de AP na concentração de 250 µg/mL: pesaram-se exatamente 25 mg AP e transferiu-se para um balão volumétrico de 100mL, dissolveu-se o AP com quantidade suficiente de metanol e completaou-se o volume com mistura metanol/PBS 1:1.

Por meio de subseqüentes diluições da solução estoque de AP, obteve-se as soluções nas concentrações teóricas para a construção da curva analítica. As diluições foram executadas conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Diluições para construção das curvas analíticas para quantificação do acetato de prednisolona.

<b>Solução</b>	<b>Alíquota da solução estoque de acetato de prednisolona 250µg/mL (mL)</b>	<b>Concentração teórica final (µg/mL)</b>
1	0,2	0,5
2	0,4	1,0
3	1,0	2,5
4	2,0	5,0
5	4,0	10,0

Após a obtenção das curvas analíticas, os dados estatísticos e as equações das retas foram obtidos a partir da regressão linear utilizando o software Microcal Origin® versão 3.54.

Quanto à precisão, deve-se obter nove determinações, por meio de determinações em triplicata de uma concentração baixa, média e alta. A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas, sendo a precisão intracorrída (repetibilidade) a concordância dos resultados dentro de um curto período de tempo com mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão intercorrídas (intermediária) é a concordância dos resultados no mesmo laboratório, mas em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

Os parâmetros determinam que se deve realizar o teste, no mínimo em dois dias diferentes e com analistas diferentes. A análise estatística envolve a determinação do coeficiente de variação (DPR), segundo a fórmula abaixo. Os valores devem ser inferiores a 5%.

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

**Onde**

**CMD = concentração média determinada**

**DP = desvio padrão**

**DPR: desvio padrão relativo**

**DPR < ou = a 5%**

Foram realizadas nove determinações, constituídas de três concentrações em triplicata, sendo as concentrações utilizadas de 1 µg/mL, 5µg/mL e 10µg/mL.

Quanto ao limite de detecção, este é determinado de decrescentes diluições de uma concentração conhecida. O limite de detecção é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser detectado pelo método que está sendo validado, porém não necessariamente quantificado. No caso de métodos instrumentais, como CLAE, a estimativa da detecção deve ser feita com base na relação de três vezes o ruído da linha de base (BRASIL, 2003).

O limite de quantificação é estabelecido por meio de decrescentes diluições realizadas a partir de uma concentração conhecida. O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis, sendo um parâmetro usado para determinação de impurezas, produtos de degradação expressos como concentração do analito em porcentagem. Para CLAE, pode ser determinado também por meio de ruído. O limite de detecção será aquele sinal em que a relação sinal-ruído seja 10:1 (BRASIL, 2003).

A exatidão avalia a proximidade dos resultados obtidos pela metodologia em estudo. O parâmetro engloba a análise do fármaco, da forma farmacêutica e de impurezas. Para análise de fármacos pode ser feito por comparação com uma substância de concentração conhecida (padrão de referência) ou por comparação de resultados obtidos por uma metodologia bem caracterizada, cuja exatidão já fora estabelecida (BRASIL, 2003).

A exatidão deve ser realizada após determinação da curva de linearidade com triplicata de determinações, em concentrações baixa, média e alta do analito. É expressa como:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}}$$

A exatidão foi determinada durante o teste de liberação *in vitro* ao incubar microesferas de PCL branco em um meio contendo PBS com concentrações conhecidas de AP.

As amostras utilizadas para a validação foram diluídas em tampão fosfato, pH 7,4 utilizando uma quantidade de metanol suficiente para solubilizar o AP, já que esta é praticamente insolúvel em meios hidrofílicos.

A escolha das diluições da amostra no tampão desenvolvido foi baseada em dois aspectos: a necessidade de quantificação durante o teste de liberação *in vitro* de aproximadamente 5 µg/mL e a baixa solubilidade do AP em meio aquoso.

## **2 Desenvolvimento dos sistemas biodegradáveis de administração periocular contendo acetato de prednisolona**

Foram preparados dois tipos de sistemas de administração distintos com as microesferas de PCL contendo AP:

- Sistema sólido: Implantes biodegradáveis a partir de duas formulações diferentes; mistura física liofilizada e microesferas.
- Sistema líquido: Suspensão injetável das microesferas.

### **2.1 Materiais**

Acetato de prednisolona (Galena), polímero poli-ε-caprolactona; MM ~14.000; densidade = 1,145 g/ml at 25°C (Sigma-Aldrich Co, EUA), álcool polivinílico (PVA) (Sigma-Aldrich Co, EUA), água destilada e deionizada e diclorometano (Synth).

Liofilizador (E-C MODULYO, E-C Apparatus Inc. EUA), dispersor tipo Ultra Turrax-T 25 (IKA), centrífuga Himac CR 21(Hitachi) e agitadores e barras magnéticas.

## 2.2 Métodos

As microesferas contendo AP foram obtidas a partir da adaptação do método da emulsão simples óleo em água (O/A) seguido da evaporação do solvente. Para o preparo, 90 mg de PCL e 10 mg de AP foram dissolvidos em 10,0 mL de diclorometano (fase orgânica) à temperatura ambiente. A fase orgânica foi emulsificada com a utilização de um dispersor, em 100,0 mL de solução de álcool polivinílico (PVA) 2,0% v/v (fase aquosa) a 1000 RPM durante três minutos. Após a completa evaporação do solvente sobre uma agitação magnética em seis horas à temperatura ambiente, as microesferas foram coletadas e lavadas com água destilada por centrifugação em três ciclos de 15000 rpm por 10 minutos. As microesferas foram então congeladas a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  e posteriormente liofilizadas.

A mistura física liofilizada foi obtida solubilizando o AP e o polímero PCL em diclorometano, obtendo uma solução numa relação entre AP e PCL de 1:9. O solvente foi evaporado em uma capela sob temperatura ambiente. A massa obtida foi congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 24 horas e posteriormente liofilizada para total remoção do solvente.

Os sistemas sólidos (implantes) foram obtidos pelo método de moldagem por compressão, que consiste em aplicar com a utilização de uma prensa hidráulica, uma pressão de oito toneladas em ambiente de vácuo sobre 100 mg das microesferas liofilizadas ou da mistura liofilizada, por um período de cinco minutos. Após este procedimento, foi obtida uma pastilha circular de aproximadamente 1 cm de diâmetro que foi então cortada para a obtenção dos implantes propriamente ditos. Cada implante fabricado possuía 4 mm de diâmetro, 0,4 mm de espessura e aproximadamente 10,0 mg de peso.

Os sistemas líquidos foram obtidos dispersando em ultra-turrax a 1000 RPM por três minutos, 65 mg de microesferas de PCL contendo prednisolona liofilizadas em 2 mL de uma solução aquosa de 0,5% de tween 80 e 10% de glicerina previamente preparada.



### **3 Caracterização das microesferas biodegradáveis desenvolvidas**

A caracterização dos implantes biodegradáveis perioculares baseia-se na análise físico-química dos seus constituintes, PCL e AP, e fornece informações úteis na tentativa de justificar o perfil de liberação e degradação das formulações desenvolvidas durante os testes de liberação *in vitro* e *in vivo*. A caracterização consiste em alterar em diferentes graus o estado do sistema por meio de perturbações com a finalidade de observar seu comportamento perante a estas condições.

Para a caracterização das microesferas foram utilizadas as técnicas de análise térmica (TA), incluindo calorimetria diferencial exploratória (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV), teor de encapsulação do AP nas microesferas, construção de um perfil de liberação *in vitro* e uma prévia de um estudo *in vivo* onde se verificou a liberação do AP em diferentes tecidos oculares (adiposo e muscular) e também no vítreo.

#### **3.1 Estudo da morfologia de superfície dos sistemas biodegradáveis para administração periocular.**

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um método de obtenção de uma imagem ampliada e tridimensional da amostra a partir da interação de um feixe de elétrons que colide com a amostra. Esta análise será importante para a caracterização morfológica das microesferas.

##### **3.1.1 Materiais e Métodos**

Foram utilizadas as microesferas liofilizadas de PCL contendo AP desenvolvidas neste trabalho. As microesferas escolhidas para serem analisadas foram selecionadas aleatoriamente e separadas em quatro grupos que foram submetidos a quatro tratamentos diferentes antes da obtenção das imagens por MEV (tabela 5). Depois dos tratamentos, as microesferas foram armazenadas em dessecador contendo sílica gel com indicador azul até o momento da análise,

quando foram então retiradas e montadas em suportes porta-amostra especiais de carbono para este tipo de análise (stubs).

Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV – marca JEOL Modelo 6360LV). As condições de operação foram: Tensão de 10 kv, corrente de 600 mA, imagem de \* SEI (imagem de elétrons secundários).

Inicialmente as amostras liofilizadas das microesferas foram separadas em quatro grupos denominados MIC, MEV1, MEV2 e MEV3 e então foram submetidas a um tratamento específico para cada diferente grupo conforme é mostrado na tabela 5. O objetivo destes tratamentos foi verificar o comportamento da matriz polimérica após diferentes períodos de incubação com meio de liberação. Depois do tratamento, as microesferas foram guardadas em um dessecador até o momento da análise, quando foram então retiradas do e coladas no porta-amostra de carbono com uma fita condutora de carbono de dupla-face.

Tabela 5 - Tratamento recebido pelos diferentes grupos de microesferas para análise de MEV.

<b>Grupos</b>	<b>Tipo de tratamento</b>
MIC	nenhum
MEV1	Incubada nas mesmas condições do estudo <i>in vitro</i> com 2mL de PBS durante 1 mês
MEV2	Incubada nas mesmas condições do estudo <i>in vitro</i> com 2mL de PBS durante 2 meses
MEV3	Incubada nas mesmas condições do estudo <i>in vitro</i> com 2mL de PBS durante 3 meses

Para a obtenção das imagens de MEV, as amostras montadas foram recobertas com uma camada condutora de ouro sob atmosfera de argônio durante um minuto (metalização), visando conferir condutividade à superfície das microesferas, que foram em seguida examinadas no microscópio eletrônico de varredura.

A superfície dos implantes foi visualizada em aumentos que variaram de 2000X a 15000X e transferidas para um computador, onde as imagens obtidas foram ajustadas utilizando os programas Adobe Photoshop versão 6.0 e Adobe Illustrator versão 9.01 (Adobe Systems Incorporated, 2000, EUA).

### **3.2 Calorimetria diferencial exploratória**

As diferenças de entalpia e de temperatura requerida para um material sofrer uma transição de fase de conformação podem ser quantificadas por técnicas de análise térmica, como a DSC. Quando uma substância sofre uma transformação em suas características físicas e químicas, observa-se uma variação na sua entalpia que é correspondente à variação da temperatura controlada. A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica capaz de detectar a variação de entalpia e de avaliar suas características.

Com a identificação da temperatura da transição vítrea ( $T_g$ ), da temperatura de fusão ou da temperatura de recristalinização ( $T_c$ ), é possível determinar se ocorre interação do polímero e a alteração da estrutura no sistema. Esses valores variam de acordo com diferentes pressões, temperaturas aplicadas e associação de polímeros com demais materiais.

A técnica consiste em submeter a amostra a um tratamento térmico num determinado intervalo de tempo. As normas vigentes para realização destes tratamentos térmicos são as da ASTM (American Society Testing Materials).

#### **3.2.1 Materiais e Métodos**

A análise do comportamento térmico foi feita utilizando o calorímetro modelo DSC50 (Shimadzu), de acordo com a norma ASTM D3418 que regulariza os procedimentos de análise por DSC. As amostras utilizadas foram: microesferas de PCL contendo AP, PCL pura e liofilizada, uma mistura liofilizada de PCL e AP 9:1 e o AP puro. Todas as amostras foram pesados separadamente e cada amostra foi colocada e selada em um cadinho de alumínio semi-hermético. Para a análise das

transições do polímero e do fármaco, as amostras foram submetidas a aquecimento, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 10°C.min<sup>-1</sup>, resfriadas até uma temperatura de -100°C e novamente aquecida a 10°C.min<sup>-1</sup> até 350°C.

### **3.3 Teor de encapsulação**

O teor de encapsulação pode ser definido como a quantidade real de fármaco que é transportada no sistema desenvolvida. Embora a concentração teórica da formulação seja de 10%, raros são os casos em que 100% do fármaco é efetivamente encapsulado durante a formação das microesferas poliméricas.

A eficiência da encapsulação do fármaco nas microesferas de PCL desenvolvidas foi determinada e quantificada depois da extração do AP encapsulado. O método de extração utilizado foi uma adaptação do método utilizado por Kompella et al., 2003 para a extração de budesonida de microesferas de PLA.

Inicialmente, 1,0 mg de microesferas de PCL e AP foram colocados em um frasco de vidro de 10,0 mL, e 7 mL de diclorometano foram adicionados. O frasco foi então hermeticamente fechado para evitar a evaporação do solvente. Procedeu-se então a agitação por meio de agitador e barra magnética por 16 horas em temperatura ambiente. A solução resultante foi então evaporada até completa *secura* com a utilização de um rotavapor e o resíduo seco foi reconstituído com 2 mL de metanol. Esta solução reconstituída foi agitada em vortex por um minuto e centrifugada 7000 RPM por cinco minutos. O sobrenadante da solução foi analisado por CLAE.

### **3.4 Estudo de liberação *in vitro***

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado em 2mL de PBS 0,1 M; pH 7,4, obedecendo as condições *sink*, que é um parâmetro seguido para o estudo de solubilidade de compostos pouco solúveis.

### 3.4.1 Materiais

Este estudo foi realizado na incubadora TE-424 (TECNAL, Brasil) equipada com agitador, onde a agitação e a temperatura foram mantidas constantes em 30 RPM ( $\pm 1$ ) e 37° C ( $\pm 0,2^\circ$  C) respectivamente. Este procedimento foi feito visando aproximar o estudo das condições encontradas *in vivo*.

Centrifuga de bancada Baby<sup>®</sup> I Centrifuge modelo 206 (FANEM, Brasil)

### 3.4.2 Métodos

Foram pesados em sextuplicata aproximadamente 10 mg de microesferas de PCL contendo AP. Estes foram colocadas em frascos especiais que continham dois compartimentos separados por um filtro lacrado, de modo que a única maneira dos compartimentos se comunicarem era com a retirada do lacre. As microesferas eram colocadas no compartimento superior onde então ficavam em contato com os 2 mL de PBS durante um período de sete dias até serem substituídos por um novo meio. No momento da troca do PBS, os frascos eram retirados da incubadora e o lacre do filtro removido. Os frascos eram então centrifugados a 3600 RPM por 10 minutos. Após a centrifugação, o PBS passava para o compartimento inferior do frasco e as microesferas continuavam no compartimento superior, retidas pelo filtro. O PBS então era recolhido para ser analisado por CLAE, enquanto o frasco tinha seu filtro novamente lacrado e era reabastecido com mais 2mL de PBS.

A quantidade de AP liberado no PBS foi medida por meio de CLAE utilizando o método desenvolvido e validado por este trabalho.

### 3.5 Estudo de adsorção/encapsulação do acetato de prednisolona na superfície das microesferas.

Para uma melhor compreensão do perfil de liberação observado para o sistema desenvolvido, no estudo de liberação *in vitro*, foi feito um teste para confirmar se nas primeiras semanas realmente ocorre uma liberação maior do

fármaco, o que é relatado na literatura como no estudo de Yasuawa e colaboradores (2001), como “burst” inicial de liberação.

### **3.5.1 Materiais**

Foram utilizados os mesmos materiais do estudo de liberação *in vitro* (ver item 3.4.1)

### **3.5.2 Métodos**

A metodologia foi a mesma utilizada para o estudo de liberação *in vitro* (ver item 3.5.2). A exceção foi que ao invés um período de sete dias o meio era recolhido e substituído por um novo a cada duas horas.

## **3.6 Estudo *in vivo* preliminar**

Nesta etapa do trabalho, os sistemas biodegradáveis de administração periocular contendo AP desenvolvidos, foram avaliados previamente quanto a seu comportamento *in vivo*.

Os sistemas foram avaliados quanto a sua segurança por meio de um estudo histopatológico, onde foram procuradas possíveis reações inflamatórias no local de aplicação, e também quanto a sua eficácia, por meio de um estudo prévio de liberação *in vivo*, visando observar se realmente ocorreu liberação prolongada do fármaco durante um intervalo de tempo de 28 dias.

### **3.6.1 Materiais**

Foram utilizados os sistemas líquidos (suspensão injetável) biodegradáveis de administração periocular contendo prednisolona desenvolvidos neste trabalho, produzidos conforme técnica descrita no item 2.2.

### 3.6.2 Métodos

Foram utilizados 12 coelhos do sexo feminino, raça Nova Zelândia, com peso médio de 2,0 a 2,5 Kg.

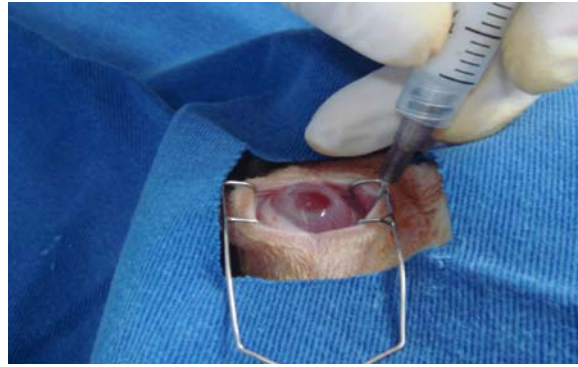
Todo o procedimento com os animais foi realizado pela equipe do Professor Dr. Antônio Augusto Velasco e Cruz na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araçatuba. Os coelhos foram alojados em biotério específico, com temperatura ambiente controlada, alimentação com ração específica e água *ad libitum*, seguindo os padrões estabelecidos pelo Statement for the use of animals in ophthalmic and visual research da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO).

O projeto já foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia e curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, campus de Araçatuba, sob protocolo 2007-002066.

Os 12 coelhos selecionados foram submetidos à injeção peribulbar de 2 mL contendo 65 mg de microesferas com aproximadamente 2,8 mg de AP.

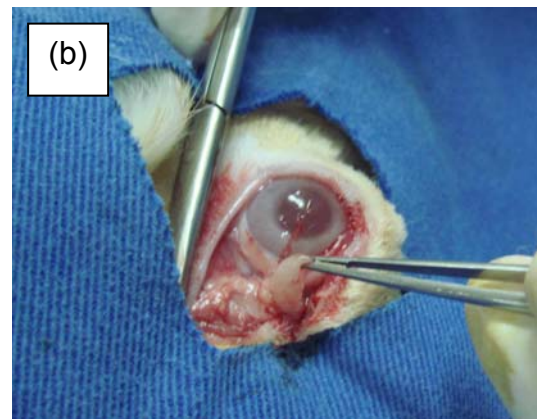
Para realização do procedimento, os coelhos foram previamente sedados com acepromazina intramuscular 0,2%, na dose de 1 mg/kg de peso, e, após 10 minutos, anestesiados com uma injeção intramuscular de cloridrato de ketamina 30 mg/kg, além de proximetacaína tópica (Anestalcon®), 1 gota.

Após a anestesia foi realizada a injeção peribulbar inferior via transconjuntival na órbita direita, com agulha 25 x 0,7 mm, contendo 2 mL de solução, na forma de suspensão ou na forma de microesferas (figura 3). O antibiótico tópico moxifloxacino 0,5% (Vigamox®), uma gota, foi instilado logo após o procedimento.



**Figura 3** - Injeção peribulbar inferior de microesferas, via transconjuntival.

Após um tempo de 7, 14 e 28 dias do procedimento, três animais eram submetidos à punção vítrea bilateral, retirada de fragmentos de músculo reto inferior e gordura orbitária em porção ínfero-medial (figura 4), e por fim, exenteração orbitária direita via transpalpebral (figura 5).



**Figura 4** – Exposição de músculo reto inferior (a). Retirada de fragmento de gordura orbitária (b).



**Figura 5** - Exenteração ocular via transpalpebral.



O procedimento de coleta dos materiais e exenteração foi realizado seguindo o padrão anestésico: acepromazina 0,2% (1 mg/kg) para sedação inicial, cloridrato de ketamina (30 mg/kg) e cloridrato de xylazina, 5 mg/kg, intramuscular após 10 minutos. Proximetacaína tópica, 1 gota bilateral. Tiopental sódico endovenoso em veia auricular, 20 mg/kg, para manutenção da analgesia durante a cirurgia e em superdosagem, 40 mg/kg, para sacrifício dos animais.

As amostras de vítreo, músculo e gordura recolhidas foram mantidas congeladas a temperatura de -80 ° C, para análise posterior.

### **3.6.3 Estudo de biocompatibilidade (análise histopatológica)**

Para a análise histopatológica, a bulbo ocular exenterado foi mantido em formol tamponado a 10 % e processado na forma convencional de coloração com hematoxilina-eosina.

### **3.6.4 Estudo preliminar de liberação *in vivo***

A quantidade de AP liberada pelos sistemas desenvolvidos nos tecidos da região periocular (corpo adiposo da órbita e músculo reto inferior) e no vítreo foi realizada pelo método de CLAE. A metodologia de CLAE desenvolvida também foi validada para evitar que possíveis interferentes dos tecidos atrapalhassem na quantificação do fármaco. Para isso, durante o teste de seletividade do método, realizado no item 1 deste trabalho, foram feitas corridas cromatográficas com amostras do vítreo, tecido adiposo e músculo reto inferior em branco, ou seja, que não continham o fármaco.

Para a realização da análise, as amostras dos tecidos e do vítreo retirados dos animais após os intervalos de tempo já citados de 7, 14 e 28 dias foram submetidos a um procedimento de extração do fármaco semelhante ao descrito por RONQUIST-NII et al., 2005.

As amostras de tecido adiposo, músculo reto e vítreo, congeladas a uma temperatura de  $-80^{\circ}$ , foram utilizadas para a determinação dos níveis de AP nos tecidos. Amostras congeladas de tecido muscular foram pesadas, descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas por um ultra-turrax (IKA, T-25) por cinco minutos e 12000 RPM com metanol grau analítico em uma solução 5 mL/100 mg de tecido. O tecido adiposo sofreu o mesmo procedimento, porém o solvente utilizado foi acetato de etila. Após este procedimento, as soluções foram centrifugadas e o sobrenadante recolhido, filtrado e evaporado à temperatura ambiente em capela de exaustão. Os resíduos obtidos foram reconstituídos com 1,0 mL de metanol grau HPLC, agitados por dois minutos e submetidos a análise por CLAE. O vítreo foi apenas descongelado, filtrado e submetido à análise por CLAE.

## **RESULTADOS E DISCUÇÃO**

## 1 Validação da metodologia analítica

Conforme já descrito, para a validação da metodologia foram utilizadas as condições cromatográficas descritas na tabela 2 e determinados os parâmetros de precisão, exatidão, linearidade sensibilidade e seletividade de acordo com as exigências do Ministério da Saúde e da ANVISA (BRASIL, 2003).

Para o início da validação, foi verificada a linearidade do método por meio da construção de uma curva analítica. Foram realizadas corridas de cinco concentrações diferentes do fármaco diluídas em metanol/água 1:1. As concentrações utilizadas foram 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1 µg/mL e 0,5 µg/mL. Esta análise foi feita em triplicata, partindo-se de três pesagens diferentes. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 6 e figura 6.

Tabela 6 - Dados da construção da curva de calibração

Curva analítica da prednisolona		
Concentração µg/mL	Média das Áreas ± DP	DPR (%)
10	553989,0±23572,6	4,25
5	269743,6±7742,2	2,87
2,5	138468,3±3502,23	2,53
1,0	58212,6±1210,2	2,08
0,5	30191,3±939,1	3,11

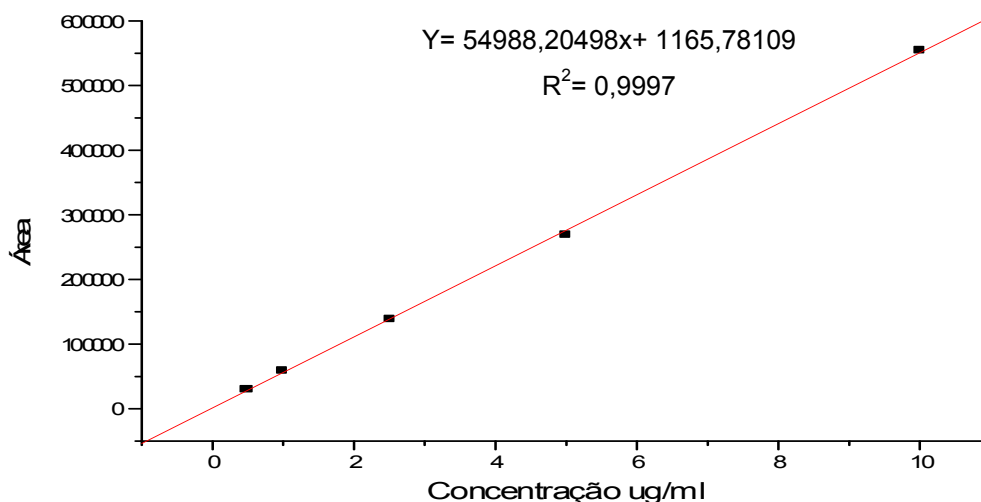
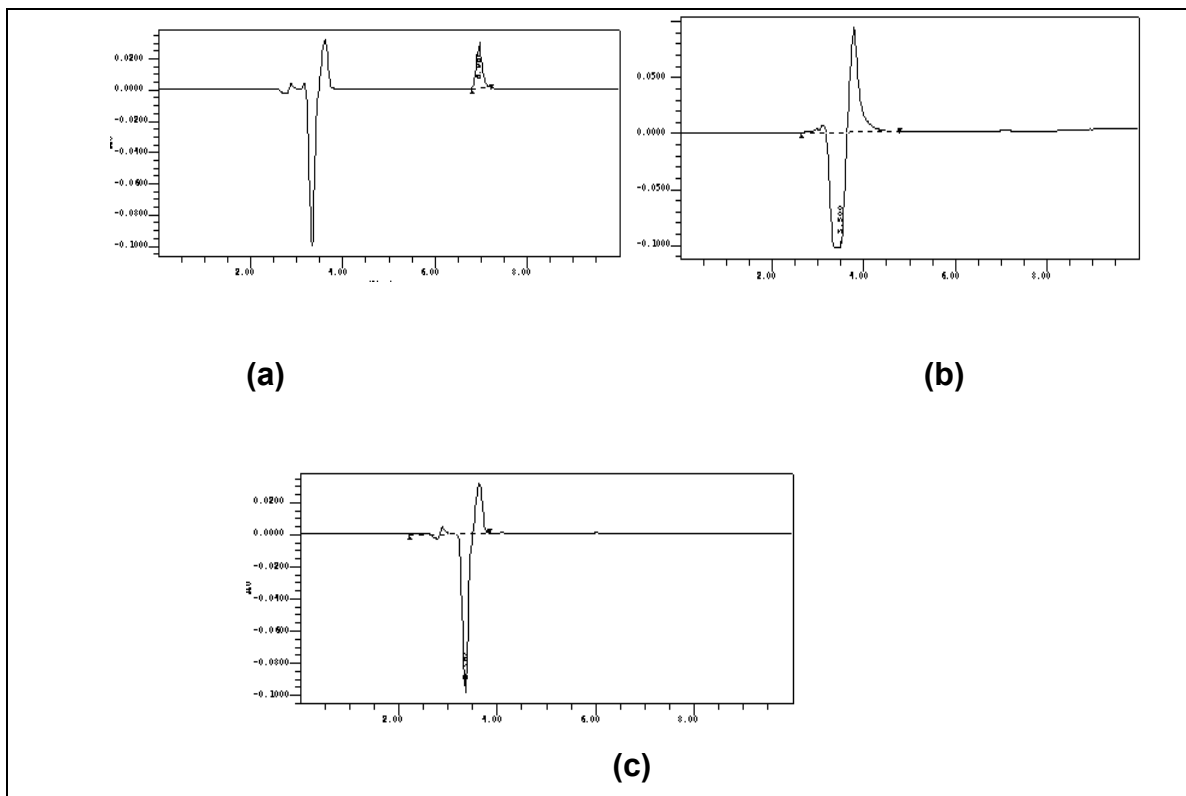


Figura 6 - Curva analítica do acetato de prednisolona

A linearidade para a faixa de trabalho especificada apresentou um coeficiente de correção linear de 0,9997 para o AP, estando de acordo com as exigências da ANVISA.

Quanto à seletividade, esta etapa foi dividida em duas partes, sendo a primeira a verificação de interferentes para o método de um modo geral, onde foram feitas corridas com PBS e PCL. A segunda etapa realizada foi para a verificação de interferentes para o estudo preliminar *in vivo*.

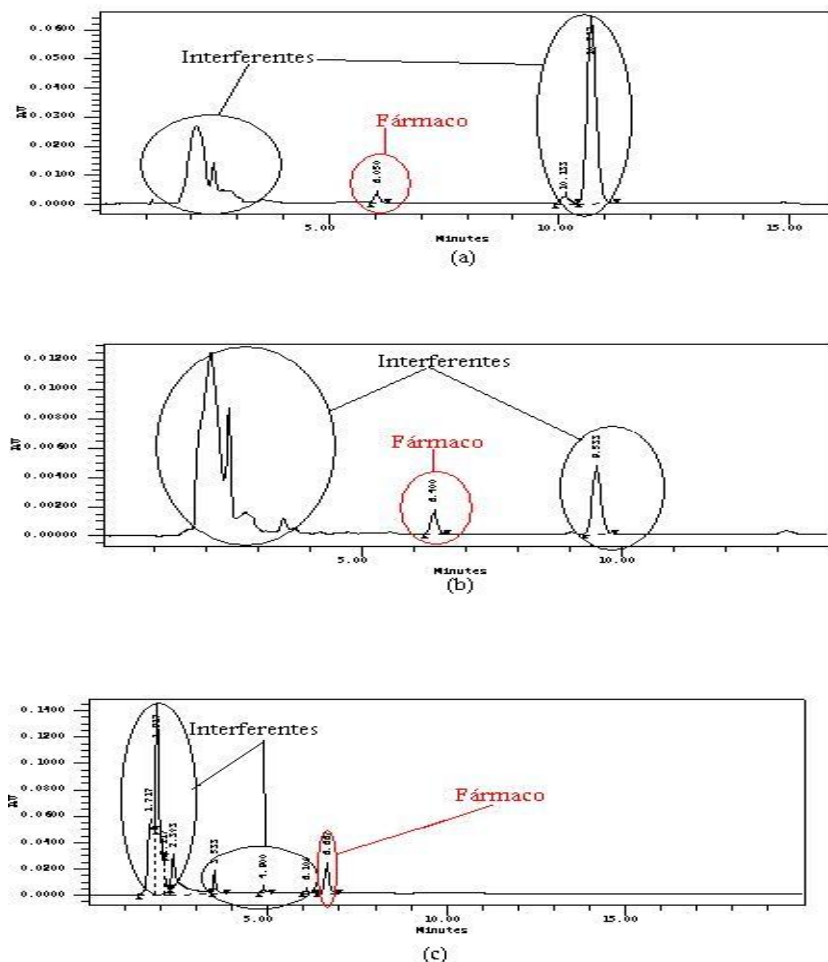
Após a avaliação de interferentes do PBS e do polímero PCL na análise, o método apresentou-se específico e seletivo, sem interferentes próximos do pico de eluição do fármaco (Figura 7).



**Figura 7** - Eluições da amostra em tampão fosfato/metanol 1:1:  
(a) 5 µg/mL de AP; (b) 50 µg/mL de caprolactona (c) tampão fosfato.

Em relação à seletividade do método para o estudo preliminar *in vivo*, este teste foi feito com um padrão de AP adicionado a amostras dos tecidos a serem testados em branco (sem o fármaco). Este também se mostrou seletivo, não sendo

encontrados picos de eluição que possam interferir com o pico referente ao fármaco (Figura 8).



**Figura 8** - Cromatogramas obtidos para os testes de seletividade do estudo preliminar *in vivo*. (a) Eluição do fármaco com amostra do tecido adiposo. (b) Eluição do fármaco com amostra do tecido muscular. (c) Eluição do fármaco com amostra de vítreo.

Para análise das precisões foram realizadas seis pesagens do fármaco e posterior diluição em metanol/ água 1:1 para a concentração de 5 µg/mL. A análise foi feita em um dia e repetida após dois dias com as mesmas amostras para fins de comparação. Os resultados estão apresentados nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Análise estatística intracorrída (Repetibilidade)

	<b>Amostra</b>	<b>[Conc.] Teórica</b>	<b>Área</b>	<b>[Conc.] observada</b>	<b>Precisão</b>
<b>Dia 1</b>	1	5,08	283923	5,14	101,18
	2	5,00	279810	5,06	101,20
	3	5,04	280916	5,08	100,79
	4	5,00	281357	5,09	101,80
	5	5,16	287240	5,20	100,78
	6	5,16	290225	5,25	101,74
				Média	101,25
				DPR	0,44

Tabela 8 - Análise estatística intercorrídas (Intermediária)

	<b>Amostra</b>	<b>[Conc.] Teórica</b>	<b>Área</b>	<b>[Conc.] observada</b>	<b>Precisão</b>
<b>Dia 2</b>	1	5,00	291439	5,28	105,60
	2	4,96	281160	5,09	102,62
	3	5,16	294288	5,33	103,29
	4	4,84	280303	5,07	104,75
	5	5,12	293156	5,31	103,71
	6	5,16	289668	5,24	101,55
				Média	103,59
				DPR	1,40

O cálculo do DPR para avaliar os resultados intra-corrída e inter-corrídas mostraram-se satisfatórios, onde os desvios foram baixos, menores que 2%.

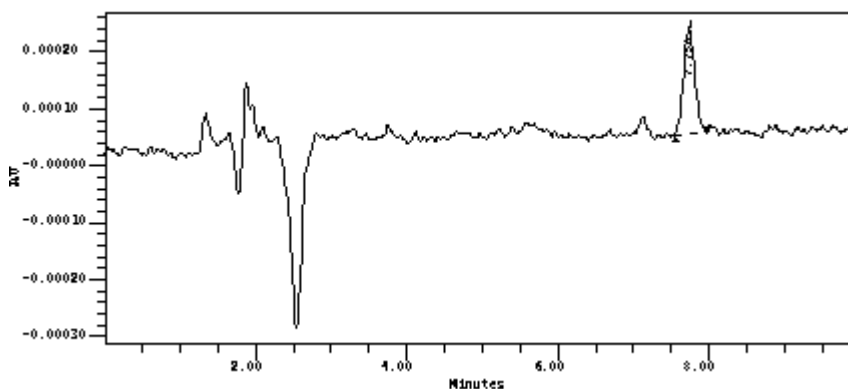
A exatidão deste método foi avaliada apartir dos resultados de recuperação do AP, em concentrações equivalentes aos níveis baixo (1µg/mL), médio (5µg/mL) e alto (10µg/mL). As porcentagens de recuperação do AP estão apresentadas na tabela 9.

Tabela 9 – Porcentagem de recuperação do AP adicionado às microesferas para a avaliação da exatidão do método.

Nível	Recuperação (%)
Baixo (1,0µg/mL)	101,96
	101,66
	101,03
Médio (5,0µg/mL)	100,03
	101,33
	100,75
Alto (10µg/mL)	99,88
	100,58
	100,76

No teste de exatidão, as porcentagens de recuperação do AP adicionado às microesferas branco durante o teste de liberação *in vitro*, encontraram-se dentro do limite estabelecido de 98,0 a 102,0%.

O limite de detecção do método foi estabelecido pela injeção de soluções contendo AP em concentrações decrescentes até se encontrar a menor concentração em que o método detectava o fármaco. A menor concentração em que o pico de eluição do fármaco teve boa aparência e apresentou uma relação entre sinal/ruído próxima de 3 foi a concentração de 0,05 µg/mL, conforme apresentado na figura 9. Este dado permite concluir que o limite de detecção do método foi de 0,05 µg/mL.



**Figura 9** – Cromatograma representativo de uma solução de acetato de prednisolona na concentração de 0,05 µg/mL.



O limite de quantificação encontrado para o método foi aquele em que a menor quantidade do analito em questão pode ser quantificada com precisão e exatidão. A menor concentração de AP em solução que apresentou um pico de eluição com tais características e uma relação entre sinal/ruído próxima de 10:1 foi a de 0,2 µg/mL.

As condições cromatográficas avaliadas apresentaram-se de acordo com as exigências estabelecidas, obtendo-se um método viável para quantificação do fármaco nas formulações e no teste de liberação *in vitro* e *in vivo*.

## 2 Preparação dos sistemas de administração periocular de acetato de prednisolona

Após terem sido desenvolvidos, os implantes compostos por microesferas e pó liofilizado de PCL e prednisolona foram avaliados quanto a sua forma física.

Macroscopicamente, todos os implantes apresentavam com aparência similar, com cor branca e superfície lisa. O peso e o diâmetro médio dos implantes biodegradáveis perioculares obtidos foram determinados e estão representados na tabela 10.

Tabela 10 – Peso e diâmetro dos implantes biodegradáveis perioculares

<b>Implantes</b>	<b>Número amostras (n)</b>	<b>Diâmetro dos Implantes (mm)</b>	<b>Peso dos implantes (média ± DP) (mg)</b>
Mistura liofilizada PCL: Prednisolona	10	4	10,11 ± 0,47
Microesfera liofilizada contendo AP	10	4	10,05 ± 0,32

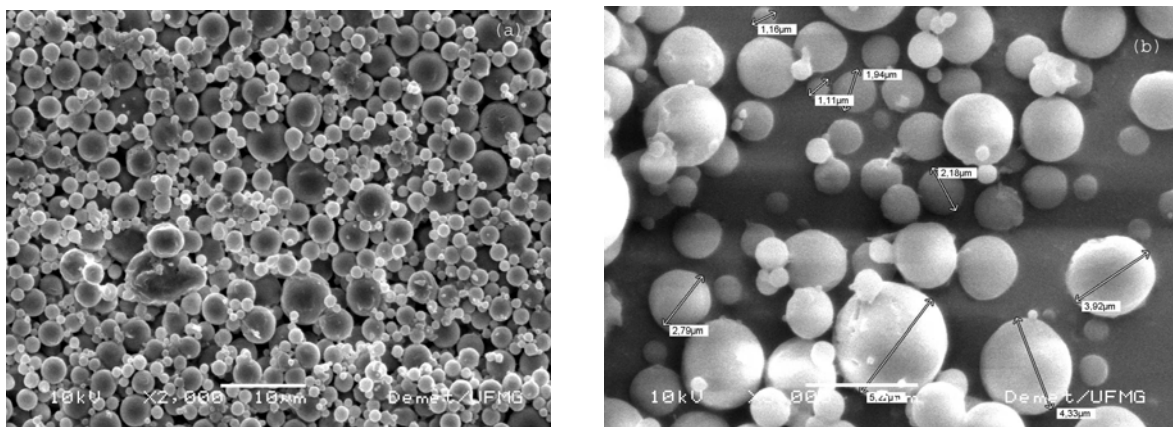
As formulações desenvolvidas na forma de implantes, embora confeccionadas com reprodutibilidade e sucesso, apresentaram, no momento do estudo *in vivo*, o inconveniente de serem grandes e frágeis para a continuidade do estudo. Este tipo de sistema se esfacelava facilmente dificultando a colocação do

implante em uma região específica. Este tipo de sistema foi então excluído das etapas de caracterização posteriores pois não foi mais utilizado.

O sistema de administração periocular de prednisolona na forma de suspensão injetável foi então o escolhido para dar continuidade ao estudo, sendo considerado apto a ser testado como sistemas de liberação prolongada *in vitro* e *in vivo*.

### 3 Microscopia eletrônica de varredura

A formação das microesferas, o seu tamanho aproximado e sua distribuição foram avaliados com as fotomicroscopias digitais obtidas (figura 10).



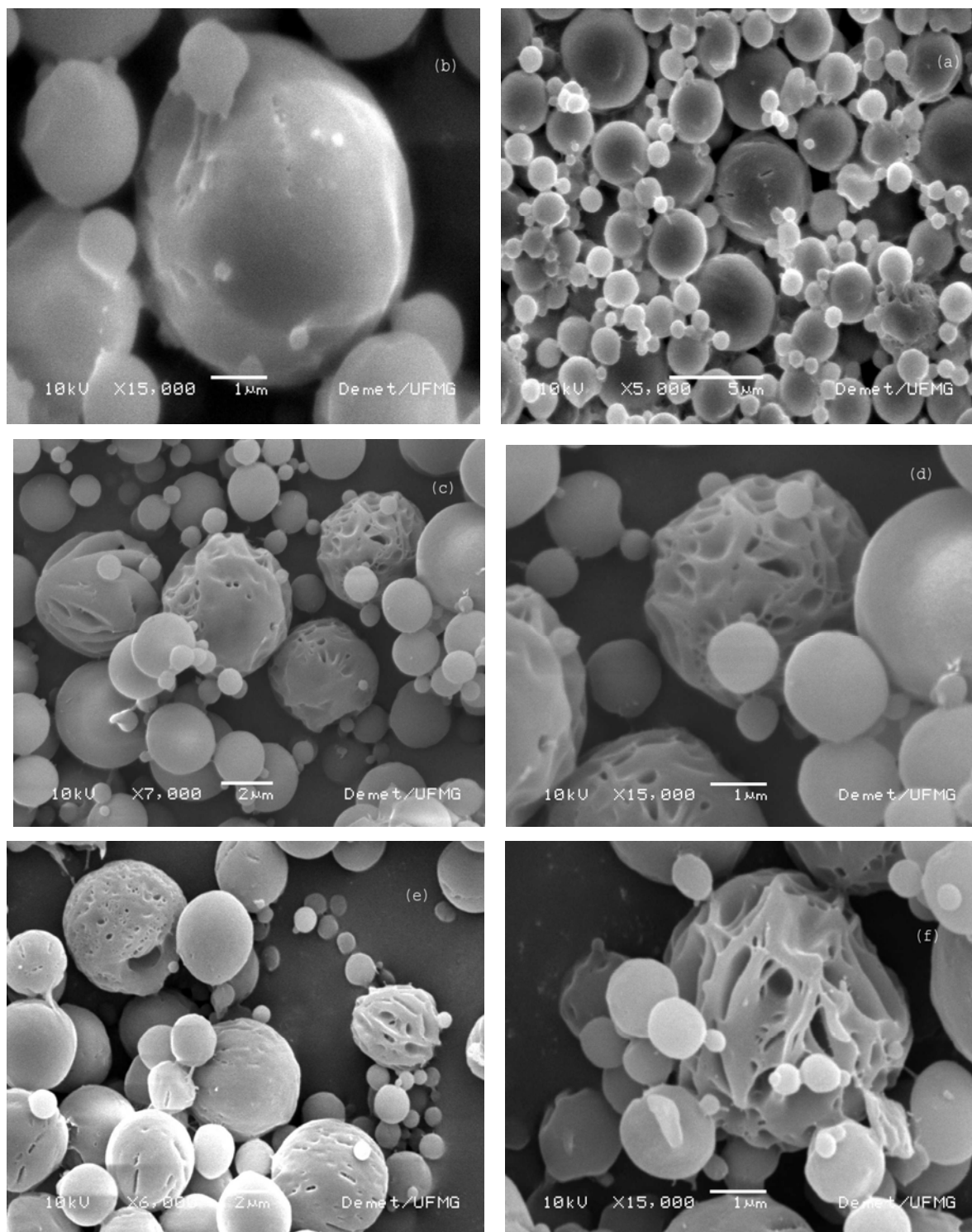
**Figura 10** – Fotomicroscopias da superfície das microesferas liofilizadas: (a) aumento de 2000 X e (b) aumento de 5000 X.

Em todos os casos as microesferas podem ser caracterizadas por um formato esférico (ESPOSITO et al., 2004). Considerando a superfície, as microesferas produzidas exibiram um formato regular e esférico com tamanhos um pouco variados.

A morfologia da superfície de sistemas poliméricos tem um papel importante no seu processo de degradação e de liberação dos fármacos nele presentes, pois a presença de poros ou canais na matriz pode permitir uma difusão do fármaco possivelmente não controlada pela velocidade de degradação do polímero (DASH and CUDWORTH II, 1998).

No trabalho de Lemmouchi e colaboradores (1998), a massa molecular de sistemas poliméricos de liberação de fármacos construídos com PCL permaneceu com 85% de sua massa inicial após 300 dias de incubação, sugerindo que a degradação do PCL é muito lenta, muito provavelmente devido a cristalinidade e a hidrofobicidade deste polímero.

Com base nestas informações, foi procurada nas imagens de MEV, além de uma caracterização das microesferas quanto a sua formação, tamanho e distribuição, informações sobre a possível degradação da superfície das microesferas durante o período em que esta se manteve incubada com PBS para o estudo de liberação in vitro. Na figura 11 estão as fotomicroscopias das microesferas que foram incubadas durante o tempo de um, dois e três meses.



**Figura 11** - Fotomicroscopias da superfície das microesferas liofilizadas que foram encubadas com PBS em tempos diferentes: (a) e (b) tempo de incubação de um mês com aumentos de 5000 X e 15000 X respectivamente. (c) e (d) tempo de encubação de dois meses com aumentos de 7000 X e 15000 X respectivamente e (e) e (f) com tempo de incubação de três meses e aumentos de 6000 X e 15000 X respectivamente.

Na análise das fotomicroscopias da figura 11, pode-se observar um crescente aumento na irregularidade e porosidade da superfície das microesferas, desenvolvidas em função do tempo de incubação. Inicialmente a superfície das microesferas contendo prednisolona se apresentou mais lisa e homogênea, sem evidência de poros ou canais.

Quase nenhuma irregularidade ou aparecimento de poros foram vistos nas microesferas que ficaram um mês incubadas com PBS, o que leva a uma suposição de que a droga liberada durante este período se deva basicamente à difusão do AP, que ao invés de ser encapsulada na microesfera de PCL, ficou adsorvida em sua superfície.

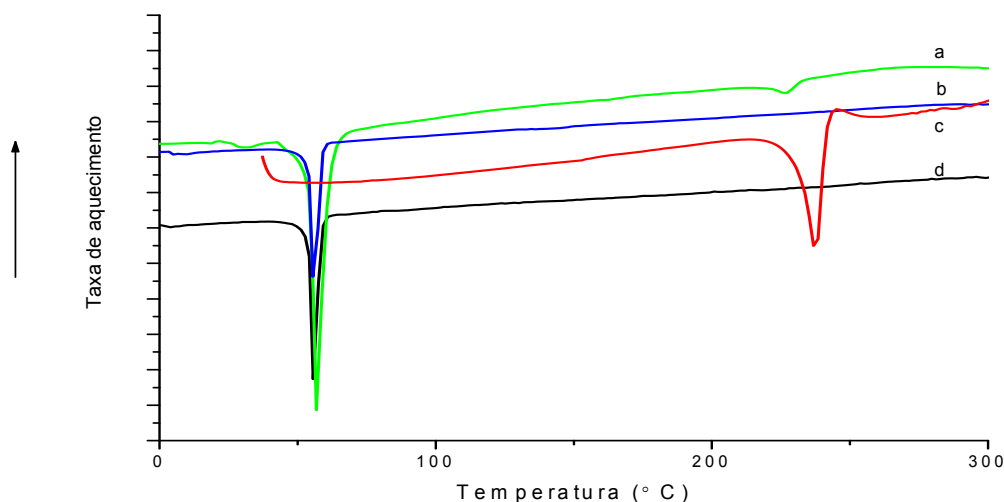
Nas superfícies das microesferas incubadas durante dois e três meses observou-se o aparecimento de poros e irregularidades, sendo que a de três meses, foi onde o aparecimento destes foi maior. Estas informações podem indicar que a liberação da droga neste tempo pode estar relacionada com a sua difusão através dos canais e poros formados durante a degradação e/ou erosão da matriz polimérica.

O aparecimento de poros na superfície das microesferas, que podem ser observados na figura 11, é descrito em muitos estudos, como por exemplo, no trabalho de Kunou e colaboradores (1995). Esses autores observaram a formação de canais aquosos durante o processo de degradação de matrizes poliméricas, conectando a superfície ao interior dos sistemas e permitindo a difusão do fármaco através dos canais da matriz.

#### **4 Calorimetria diferencial exploratória**

A DSC foi utilizada para se obter informações sobre a estabilidade do polímero e do fármaco e a possibilidade de interação entre estes.

Foram avaliados os dados obtidos no estudo de DSC das microesferas de PCL contendo AP, microesferas de PCL sem o fármaco (microesferas branco), do polímero (PCL) e do fármaco (Figura 12).



**Figura 12** – Termogramas de DSC: (a) das microesferas contendo fármaco, (b) do polímero, (c) do fármaco e (d) das microesferas sem fármaco.

Pode-se observar, por meio da análise dos termogramas de DSC, a presença de picos endotérmicos característicos dos pontos de fusão para o polímero e para o fármaco. Os valores dos pontos de fusão observados na figura 12 são mostrados com detalhes na tabela 11.

Tabela 11 – Ponto de fusão do polímero e do fármaco nas amostras estudadas na DSC.

Amostra	ponto de fusão (C°)	
	Polímero	Fármaco
Prednisolona	-	236
PCL	55	-
Microesferas sem fármaco	55	-
Microesferas contendo fármaco	56	226

A temperatura de fusão do PCL permaneceu praticamente a mesma em todas as análises, seja em forma de microesfera, microesfera branco ou polímero puro.

Contudo, o ponto de fusão do PCL encontrado (variando entre 55 °C e 56° C), difere um pouco ao descrito pela literatura, que é de 60°C. Sobre este resultado podemos sugerir a ocorrência de um possível rearranjo das cadeias do polímero quando ele é solubilizado em diclorometano e depois recristalizado pela evaporação do solvente durante o processo de produção das microesferas. Neste momento, o arranjo das cadeias tomaria um novo formato, provavelmente mais desorganizado já que uma menor energia passa a ser requerida para quebrar as ligações entre as cadeias e ocorrer a fusão do polímero. Condição semelhante foi observada no trabalho de Rosa e colaboradores (2005), onde o ponto de fusão de 57,2°C foi encontrado para o PCL quando o polímero foi submetido a tratamento similar de dissolução em solvente orgânico seguido de evaporação para a recristalização.

Uma maior diferença pode ser notada na comparação das curvas da microesfera branco com a carregada com o fármaco. Embora o ponto de fusão do polímero tenha sido alterado muito pouco (1°C), o ponto de fusão do fármaco apresentou uma redução de 10°C, sugerindo um provável indício de alteração da rede cristalina do fármaco durante o processo de produção das microesferas. Freiberg e colaboradores (2004) citam que, normalmente, o fármaco é encontrado molecularmente disperso dentro da matriz polimérica e sua cristalinidade então não é observada, e que embora a mistura física entre fármaco e polímero exiba cristalinidade, o fármaco é amorfo depois que é dispersado nas microesferas. Entretanto, apenas a análise de DSC é insuficiente para se afirmar a existência desta interação, sendo necessário estudos complementares com outras técnicas para uma conclusão sobre esta questão.

Embora em alguns casos também seja possível detectar a Tg do polímero estudado com análises de DSC, no presente estudo este parâmetro não foi avaliado, pois a Tg do PCL ocorre em temperatura negativa (-66°C), condição esta que não interfere na estabilidade do sistema desenvolvido. Pode-se afirmar, no entanto, que os sistemas são estáveis na temperatura em que os estudos *in vivo* e *in vitro* foram realizados (37 °C).

Desta análise, também foi possível apontar a viabilidade técnica do método empregado para a preparação das microesferas, pois, foi possível identificar a

presença do AP nas microesferas produzidas, e não foram encontrados picos que evidenciem a presença de resíduos de solventes orgânicos utilizados no processo de produção.

## **5 Teor de encapsulação**

A análise feita neste estudo para se avaliar a eficiência de encapsulação do fármaco nas microesferas de PCL demonstrou que foi possível encapsular o fármaco no polímero em uma taxa de  $43 \pm 7\%$ . Essa taxa de eficiência indica um teor de encapsulação em p/p de 4,6 %, frente a um valor teórico de 10 %.

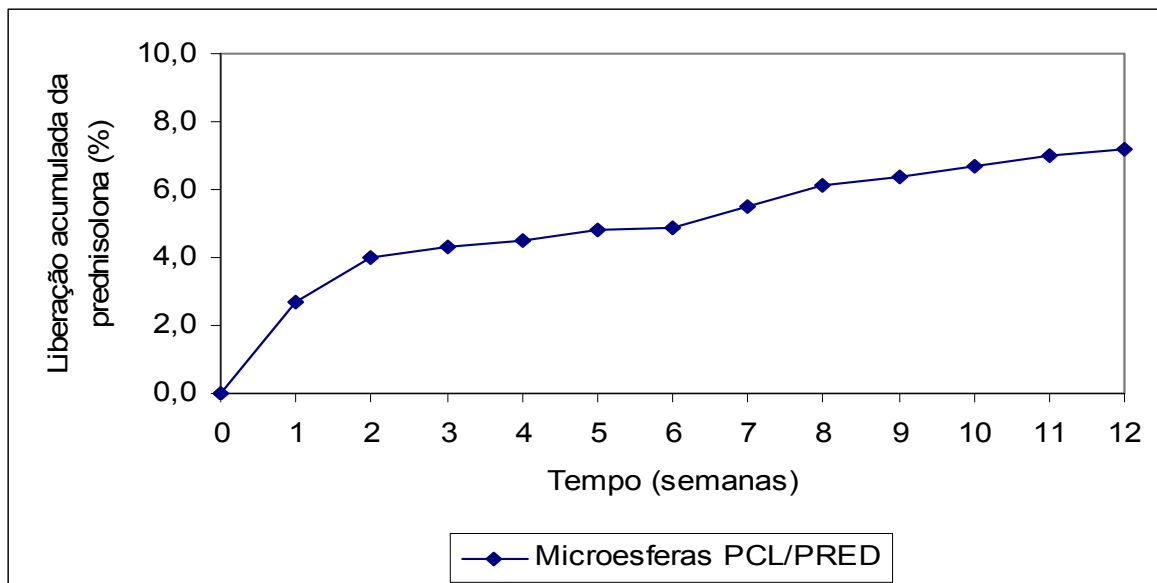
Este teor de encapsulação encontrado não pode ser comparado com o de outros estudos, o que comprova o caráter inédito deste trabalho na formação de microesferas de PCL com AP.

## **6 Estudo de liberação *in vitro***

O estudo de liberação *in vitro* do fármaco a partir das microesferas de PCL, foram realizados para se ter um indicativo do perfil de liberação do sistema quando em contato com fluidos biológicos. Para isso, o método empregado simulou condições fisiológicas: pH de  $7,4 \pm 0,1$  (2,0 mL de PBS), temperatura de 37°C e agitação leve (30 r.p.m.).

O perfil de liberação acumulada da prednisolona obtido neste estudo está representado na figura 13.





**Figura 13** – Liberação acumulada do acetato de prednisolona a partir das microesferas de PCL produzidas. (Os valores são representados como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ).

Neste estudo, a taxa de liberação acumulada da prednisolona foi de aproximadamente 7,2 % durante um período de incubação de 12 semanas.

Segundo Jain (2000) a liberação do fármaco a partir de sistemas monolíticos poliméricos pode ocorrer por difusão, por degradação do polímero ou por uma combinação dos dois mecanismos.

O perfil de liberação *in vitro* obtido para a prednisolona neste estudo apresentou-se lento e crescente durante todo o período de incubação, sendo que houve uma liberação bem maior nas primeiras duas semanas, onde a taxa de liberação chegou a atingir pouco mais de 50% da liberação total do fármaco durante todo o período de liberação. Após as primeiras duas semanas a liberação do fármaco embora crescente, apresentou-se bem mais lenta e bastante uniforme, com um aumento aproximado de 0,3 % por semana.

Em geral, o perfil de liberação pode ser dividido em três etapas: a primeira etapa consiste de uma alta taxa de liberação do fármaco, conhecida como “burst” inicial, possivelmente devido à presença do fármaco na superfície do sistema

(YASUKAWA et al., 2001); a segunda etapa acontece devido à difusão do fármaco da matriz para o meio externo antes mesmo de ocorrer a erosão da matriz polimérica, e está relacionada com o coeficiente de difusão, saturação do meio de incubação e com a concentração de fármaco no sistema (KUNOU et al., 1995; ROHRS, 2001). A terceira fase corresponde a um repentino “burst” devido ao intumescimento e desintegração da matriz propriamente dita (KUNOU et al., 1995).

A terceira etapa, descrita por Kunou e colaboradores (1995), foi a única já citada anteriormente que não foi observada com clareza neste trabalho, devido, provavelmente, ao curto período de tempo estudado, sendo que esta etapa pode vir a aparecer com a continuidade do estudo. A primeira etapa da liberação, aquela que sugere um “burst” inicial de liberação, pôde ser observada nas duas primeiras semanas, muito provavelmente devido à presença de fármaco depositado na superfície da matriz polimérica. Em seguida, a segunda etapa pôde ser observada, onde um estágio de liberação lenta do fármaco ocorreu, podendo a liberação de esta fase ser atribuída à difusão do fármaco pelos poros presentes na matriz e pelos novos canais formados durante o processo de degradação do polímero.

Os resultados obtidos permitem sugerir que o sistema polimérico desenvolvido apresenta perfil característico de um sistema de liberação prolongada, pois o mesmo não liberou todo fármaco presente de uma única vez, tendo proporcionado sua lenta liberação em um período de 12 semanas.

Contudo, é importante comentar que o estudo de liberação *in vitro* só se completa quando todo o fármaco existente na formulação é liberado. Porém o tempo esperado para a degradação completa do polímero e a liberação total do fármaco é elevado. Sun e colaboradores (2006), por exemplo, acompanharam a degradação de implantes de PCI *in vivo* por um período de três anos. Em uma análise preliminar, sem levar em conta outros fatores e considerando que o perfil de liberação permaneça constante até toda a liberação do fármaco, o sistema desenvolvido também poderia levar aproximadamente três anos para se esgotar, se considerarmos a taxa de encapsulação de 43 % e a liberação acumulada de 7,2 % em 12 semanas. Este tempo teórico exigido é demasiado grande para um trabalho

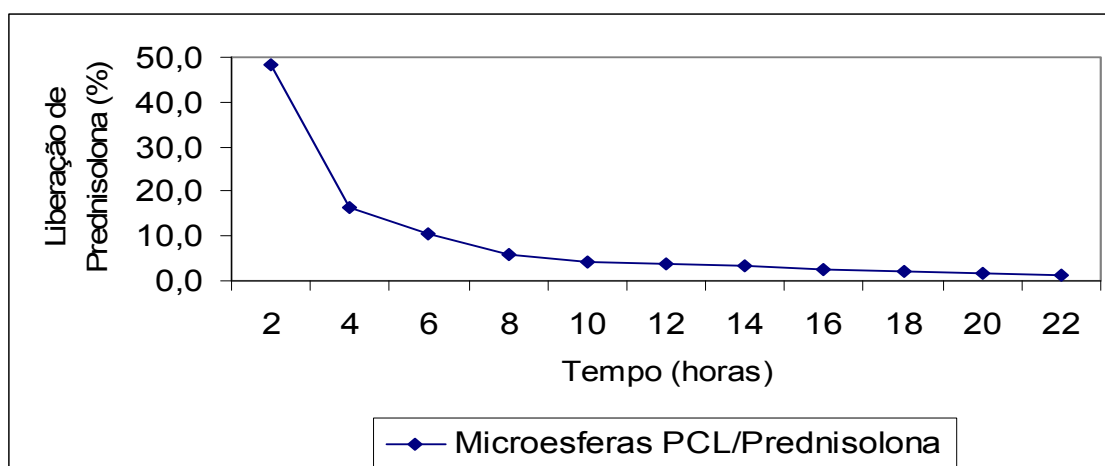
de mestrado, mas em estudos futuros deve ser completado para uma compreensão maior sobre o funcionamento do sistema.

### 6.1 Estudo de adsorção/encapsulação do acetato de prednisolona na superfície das microesferas.

Para uma melhor compreensão e também verificação sobre a etapa de “burst” inicial de liberação observada para o sistema desenvolvido no estudo de liberação *in vitro*, foi feito um teste para confirmar se em um momento inicial a liberação de prednisolona realmente é maior.

Para este teste, amostras do sistema desenvolvido foram incubadas nas mesmas condições utilizadas no teste *in vitro*, porém o meio utilizado, 2,0mL de PBS (pH=7,4), foi trocado de duas em duas horas, durante um período de 22 horas. Este método visa prevenir a saturação com o fármaco do meio utilizado e, assim, verificar se em um momento inicial realmente ocorre uma a liberação de uma maior quantidade de fármaco para o meio, fármaco este que provavelmente não se encontraria dentro da matriz polimérica e sim adsorvido em sua superfície.

A verificação do AP teoricamente adsorvido na superfície da matriz polimérica de PCL e seu perfil de liberação no intervalo de tempo de duas horas para a o sistema obtido está representado na figura 14.

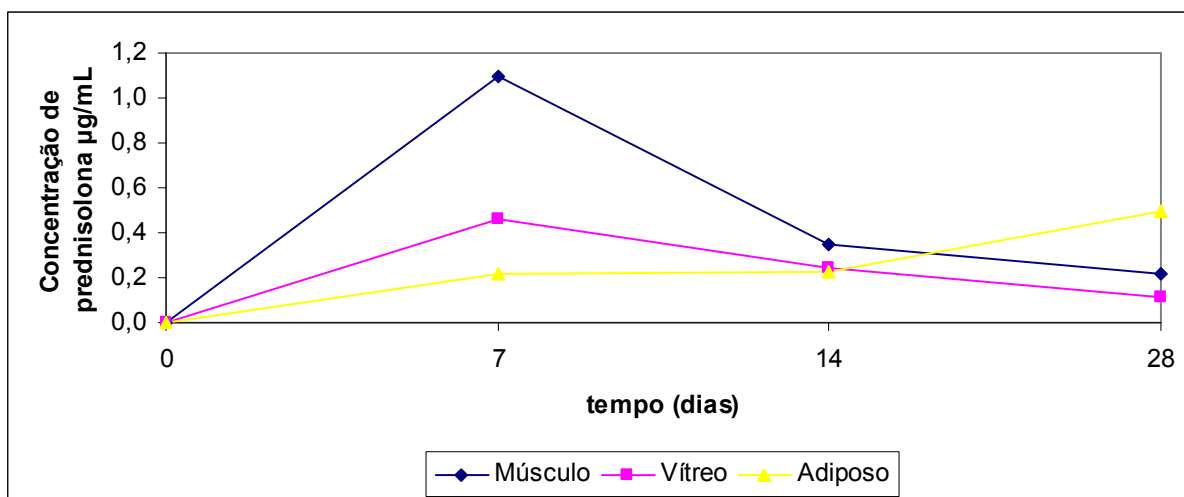


**Figura 14** – Liberação do acetato de prednisolona adsorvida na superfície das microesferas de PCL (os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, n = 3).

O perfil obtido neste teste confirma a hipótese de que realmente existe fármaco adsorvido na superfície da matriz polimérica do sistema obtido, uma vez que no meio analisado, após 2 horas de incubação, 48,34 % do total de fármaco foi liberado no período de 22 horas. Nas horas seguintes, uma quantidade bem menor do fármaco foi liberada, mas o “burst” inicial ainda pode ser observado até a sexta hora da análise, onde 16,38% e 10,61% ainda foram liberados. Da sexta hora em diante, a liberação foi relativamente bem menor, com uma média de aproximadamente 3% da liberação total a cada duas horas, devendo esta liberação ser provavelmente de fármaco ainda adsorvido na superfície da matriz, porém em quantidades muito pequenas.

## 7 Estudo preliminar de liberação *in vivo*

A concentração de AP no vítreo, no músculo reto inferior e no corpo adiposo da órbita encontrados neste estudo *in vivo*, durante um período de 28 dias está representada na Figura 15.



**Figura 15** – Liberação do acetato de prednisolona a partir das microesferas de PCL nos tecidos adiposo da órbita, músculo reto inferior e vítreo (os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ ).

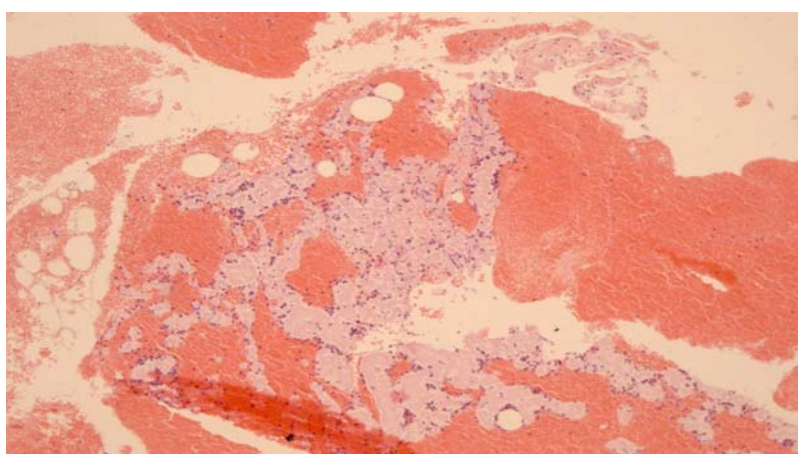
Embora se trate de um estudo preliminar, esta etapa traz informações importantes sobre o comportamento do novo sistema desenvolvido quando em contato com um meio biológico. Embora no estudo *in vitro* tenha-se empregado

condições que se aproximam das fisiológicas, é de se esperar que o comportamento seja diferente no estudo *in vivo*, já que nessa condição a presença de enzimas, como lípases (CALIL et al., 2007), fagocitose por células gigantes e outros processos metabólicos exercerão uma importante influência (SUN et al., 2006). Entretanto, embora ainda seja cedo para se fazer afirmações, principalmente devido ao baixo número de animais utilizados no estudo (n = 12), algumas informações relevantes podem ser tiradas do estudo realizado. A curva de liberação apresentada na figura 15 mostra que o fármaco foi liberado dos sistemas administrados aos animais, e que concentrações significativas do mesmo foram encontradas nos principais tecidos relacionados à oftalmopatias, que é o objetivo principal deste trabalho. Estes tecidos são, principalmente, o corpo adiposo da órbita e os tecidos musculares (representado pelo músculo reto inferior), presentes na região periocular. Uma pequena quantidade de fármaco também foi encontrada no vítreo. Entretanto, este resultado não pode ser apontado como o indício de um efeito indesejado sem a realização de outros estudos. O simples fato de o sistema ter funcionado liberando a droga no meio biológico já pode ser considerado um achado. Cabe também ressaltar que o sistema apresentou perfil de liberação prolongada, visto que após 28 dias ainda era possível detectar a presença do fármaco nos tecidos avaliados.

Com estas últimas informações pode-se afirmar que o principal objetivo do trabalho em questão, o desenvolvimento sistemas biodegradáveis de administração periocular de prednisolona para tratamento de oftalmopatias foi atingido, e estes resultados credenciam o sistema desenvolvido para ser estudado detalhadamente e por um período de tempo maior. Uma avaliação das concentrações plasmáticas do fármaco também seria de grande importância para que se possa prever possíveis efeitos sistêmicos indesejáveis do fármaco e encontrar alternativas para contorná-los. Mesmo sem essas informações sobre efeitos sistêmicos, o simples fato do novo sistema atuar como um veículo de liberação prolongada da prednisolona já é uma vantagem em relação aos tratamentos usuais em que injeções repetidas do fármaco são realizadas, causando desconforto aos pacientes.

### 7.1 Estudo de biocompatibilidade (análise histopatológica)

Os cortes histológicos corados em hematoxilina-eosina revelaram a presença de material amorfo, eosinofílico, parcialmente circundado por discreto infiltrado inflamatório agudo. O material encontrou-se em meio a moderada quantidade de sangue. Não houve sinais de processo inflamatório crônico granulomatoso ou fibrose. O discreto infiltrado inflamatório encontrou-se restrito à área de implante do material, sem extensão para o tecido adiposo orbitário (figura 16).



**Figura 16** - Corte histológico de exenteração ocular, sem evidências de toxicidade.

O resultado sugere então que o sistema desenvolvido é biocompatível com a região periocular. Porém, estudos mais detalhados, incluindo exames clínicos como inspeção ocular, oftalmoscopia e pressão intra-ocular, devem ser realizados para a obtenção de informações sobre possíveis efeitos adversos provocados pelos sistemas desenvolvidos. Apesar do resultado de atoxicidade encontrado nesta análise fosse esperado, em função da presença de um corticoide (AP) e das conhecidas características de biocompatibilidade do polímero utilizado (PCL), o conjunto dos resultados obtidos neste trabalho são relevantes e credenciam o sistema desenvolvido como um candidato em potencial a um medicamento para o tratamento de oftalmopatias.

## **CONCLUSÃO**

Após a apresentação dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- A funcionalidade e a viabilidade do sistema desenvolvido foram avaliadas em um estudo *in vivo* preliminar, onde foi constada a liberação do fármaco por um período prolongado;
- Finalmente, também no estudo *in vivo* preliminar, a biocompatibilidade do sistema obtido foi observada;
- Este estudo demonstrou a viabilidade de confecção de um novo sistema de liberação prolongada de AP destinado à administração periocular;
- O novo sistema pôde ser caracterizado com sucesso quanto à formação das microesferas e quanto à integração entre fármaco e polímero pelas técnicas de MEV e DSC, respectivamente;
- Este novo sistema apresentou-se funcional e capaz de liberar o fármaco por um período de tempo prolongado quando seu perfil de liberação foi avaliado *in vitro*.

Como perspectiva, para que o sistema desenvolvido comprove seu potencial como novo medicamento para tratamento de oftalmopatias auto-imunes, estudo *in vivo* detalhados devem ser realizados.



## **RERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

A região periocular e o bulbo ocular. Adaptado de General Papers. Disponível em: <<http://www.midlands-ophthamologist.co.uk/html/general.asp>>. Acesso em 23 jun. 2008.

ALDRICH HANDBOOK OF FINE CHEMICALS AND LABORATORY EQUIPMENT, Aldrich, 2000 – 2001.

ANDRADE, A. V.; GROSSL. J.; MAIA, L. A. Tratamento do hipertireoidismo da doença de Graves. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, Porto Alegre, v. 45, n. 6, p. 609-618, dez. 2001.

AMBATI, J.; CANKIS, C.S.; MILLER, J. W.; GRAGOUDAS, E. S.; EDWARDS, A.; WEISSGOLD, D. J.; KIM, I.; DELORI, F. C.; ADAMIS, A. P. Diffusion of high molecular weight compounds through sclera. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Rockville, v. 41, n. 5, p. 1181-1185, apr. 2000.

ATHANASIOU, K. A; NIEDERAUER, G.G.; AGRAWAL, C.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. **Biomaterials**, v.17, p.93-102, 1996.

BARBANTI S. H.; ZAVAGLIA C. A. C.; DUEK E. A. R. Degradação acelerada de suportes de poli ( $\epsilon$ - caprolactona) e poli (D,L – ácido láctico-co-ácido glicólico) em meio alcalino. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Paulo, v. 16, n. 2, 2006

BENNET, J. C.; CECIL, R. L. **Tratado de Medicina Interna**. 20.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997. 3647 p.

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**, Paris, v. 58, p. 1182-1202, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2003.

BURCH H.B.; WARTOFSKY L. Graves' ophthalmopathy: current concepts regarding pathogenesis and management. **Endocrinology Reviews**, Washington, v. 14, p. 747-93, 1993.

CALIL, M. R.; GABOARDI, F.; BARDI M. A.; REZENDE, M. L.; ROSA, D.S. Enzymatic degradation of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) and cellulose acetate blends by lipase and  $\alpha$ -amylase. **Polymer Testing**, Itatiba, v. 26, n. 2, p. 257-261, apr. 2007.

CANEVAROLO, J.; SEBASTIÃO, V. **Ciência dos Polímeros**: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. São Paulo: Artliber, 2002. 183 p.

CARR C. Local anaesthesia for ocular surgery. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 5, n. 9.1, p. 312-314, 2004.

DABON-ALMIRANTE, M. L. C.; SURKS I. M. Clinical and laboratory diagnosis of thyrotoxicosis. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, New York, v. 27, n. 1, p. 25-35, mar. 1998.

DASH, A. K.; CUDWORTH II, G. C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 40, n. 1, p. 1-12, jul. 1998.

DAVIES, N. M. Biopharmaceutical considerations in topical ocular drug delivery. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Melbourne, v. 27, n. 7, p. 558-562, jul. 2000.

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

ESPOSITO, E.; MANEGATTI, E.; CORTESI, R. Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study. **International Journal of Pharmaceutics**, Ferrara, v. 288, n. 1, p. 35-49, nov. 2005.

ESTELLÉS M. J.; VIDAURRE, A.; DUEÑAS M. J.; CORTÁZAR C. I. Physical characterization of polycaprolactone scaffolds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Valencia, v. 19, n. 1, p. 189-195, jan. 2008.

FIALHO, S. L. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões e implantes biodegradáveis para aplicação oftálmica**. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2003. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos).

FOSTER, C. S.; SAINS DE LA MAZA, M. **The Sclera**. New York: Springer-Verlag; 1994.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, Montreal, v. 282, n. 1, p. 1-18, sep. 2004.

GERDING M.N.; TERWEE C.B.; DEKKER F.W. Quality of life in patients with Graves' ophthalmopathy is markedly reduced: measurement by the medical outcomes study instrument. **Thyroid**, v.7, p.885–889, 1997.

GUPTA O. P.; BOYNTON, J. R.; SABINI, P.; MARKOWITZ, W.; QUATELA, V. C. Proptosis after retrobulbar corticosteroid injections. **Ophthalmology**. Rochester, v. 110, n. 2, p. 443-447, feb. 2003.

HAUSBERGER, A.G.; DELUCA, P.P. Characterization of biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers and microspheres. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, Lexington, v. 13, n. 6, p.747-760 , 1995

JACOBSON. L. D.; GANGE, J. S.; ROSE, R. N.; GRAHAM, H. N. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. **Clinical Immunology and Immunopathology**, Baltimore, v. 84, n. 3, p. 223-243, sep. 1997.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, Guilford, v.21, n.23, p. 2475- 2490, dec. 2000.

KOMPELLA, B. U.; BANDI, N.; AYALASOMAYAJULA P. Subconjunctival nano- and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Omaha, v. 44, n. 3, p.1192-1201, mar. 2003.

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

LEMMOUCHI, Y.; SCACHT E.; LOOTENS C. In vitro release of trypanocidal drugs from biodegradable implants based on poly ( $\epsilon$ -caprolactone) and poly (D,L-lactide). **Journal of Controlled Release**, Ghent, v. 55, n. 1, p. 79-85, oct. 1998.

MILLER, M. L.; GOLDBERG, S. H.; BULLOCK, J. D. Radiation retinopathy after standard radiotherapy for thyroid-related ophthalmopathy. **American Journal of Ophthalmology**, v.112, n. 5, p.600–601, nov. 1991.

MOSHFEGHI, A. A., PEYMAN, A. G. Micro- and nanopartículas. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Miami, v. 57, n. 14, p.2047-2052, dec. 2005.

MOURA M.V.; MOURA O.F.; PEREZ R. Tear film analysis and its relation with palpebral fissure height and exophthalmos in Graves' ophthalmopathy. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v.68, p. 615-618, 2005.

NETTER H. F. **Atlas de Anatomia Humana**. 2.ed. Porto Alegre, Artmed, 2000.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M.; MANSUR, H. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Ed. Cultura Médica, 2006, p. 552.

OGURA, Y.; KIMURA, H. Biodegradable polymer microspheres for targeted drug delivery to the retinal pigment epithelium. **Survey of Ophthalmology**, Kyoto, v. 39, n.1, p. 17-24, may 1995.

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

OHTSUKA K.; SATO A.; KAWAGUCHI S.; HASHIMOTO M.; SUZUKI Y. Effect of Steroid Pulse Therapy With and Without Orbital Radiotherapy on Graves' Ophthalmopathy. **American Journal of Ophthalmology**, Sapporo, v.135, p. 285–290, 2003.

OLSEN, T. W.; AABERG, S. Y.; GEROSKI, D. H.; EDELHAUSER, H. F. Human sclera: thickness and surface area. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 125, n. 2, p. 237-241, feb. 1998.

OLSEN, T. W.; EDELHAUSER, H. F.; LIM, J. I.; GEROSKI, D. H. Human scleral permeability. Effects of age, cryotherapy, transcleral diode laser, and surgical thinning. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Rockville, v. 36, n. 9, p. 1893-1903, aug. 1995.

PEYMAN, G.A.; GANIBAN, G.J. Delivery systems for intraocular routes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, New Orleans, v. 16, p. 107-123, 1995.

RESINKOFF, S.; PASCOLINI, D.; ETYA'ALE, D.; KOCUR, I.; PARARAJASEGARAM, R.; POKHAREL, G.; MARIOTI, S. P. Global data on visual impairment in the year 2002. **Bulletin on the World Health Organization**, Geneva, v. 82, n. 11, p. 844-851, nov. 2004.

REYNOLDA, J. E. F. **Martindale's The Extra Pharmacopoeia**. 29.ed. London: Pharmaceutical Press, 1989, 1896 p.

RIBANI, M.; BOTTOLI, G. C.; COLLINS, H. C.; JARDIM, F. S. I.; MELO, C. F. L. Validação em métodos analíticos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RITTENHOUSE, K. D.; POLLACK, G. M. Microdialysis and drug delivery to the eye. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 45, n. 2-3, p. 229-241, dec. 2000.

ROCHA, M. O. C.; PEDROSO, P. R. E.; FONSECA, M. G. J. SILVA, A. O. **Terapêutica Clínica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 107, p. 921-926, 1998.

ROHRS, R. B. Dissolution method development for poorly soluble compounds. **Dissolution Technologies**, Kalamazoo, v. 8, n. 3, p. 1-5, aug. 2001.

RONQUIST-NII, Y.; EDLUND O. P. Determination of corticosteroids in tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Stockholm, v. 37, n. 2, p 341-350, feb. 2005.

ROSA, S. D.; LOPES R. D.; CALIL M. R. Thermal properties and enzymatic degradation of blends of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) with starches. **Polymer Testing**, Itatiba, v. 24, n. 6, p. 756-761, sep. 2005.

SMITH, J. R.; GEORGE, R. K.; ROSENBAUM, J. T. Lower eyelid herniation of orbital fat may complicate periocular corticosteroid injection. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 133, n. 6, p. 845-847, jun. 2002.

SNELL R. S.; LEMP, M. A. The eyeball. In: SENLL, R. S.; LEMP, M. A. **Clinical Anatomy of The Eye**. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 1998, p 132-213.

SUN. H.; MEI, L.; SONG, C.; CUI, X.; WANG, P. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. **Biomaterials**, Tianjin, n. 27, p. 1735-1740, sep. 2006.

THE UNITED STATES Pharmacopeia. 24. ed. Rockville: United States Pharmacopeil Convention Inc., 2000. (NF19).

THOMSON MICROMEDEX<sup>®</sup> HEALTHCARE SERIES. Disponível em [http://www.thomsonhc.com/hcs/librarian/ND\\_T/HCS/ND\\_PR/Main/CS/BA4B71/DUPLICATIONSHIELDSYNC/1C297C/ND\\_PG/PRIH/ND\\_B/HCS/ND\\_P/Main/PFPUI/8pY1q12uZzlvo/PFDefaultActionId/hcs.main.KeywordSearch.Search](http://www.thomsonhc.com/hcs/librarian/ND_T/HCS/ND_PR/Main/CS/BA4B71/DUPLICATIONSHIELDSYNC/1C297C/ND_PG/PRIH/ND_B/HCS/ND_P/Main/PFPUI/8pY1q12uZzlvo/PFDefaultActionId/hcs.main.KeywordSearch.Search)>. Acesso em 30 jun. 2008.

WAKELKAMP I. M. M. J.; BALDESCHI L.; SAEED P.; MOURITS M. P.; PRUMMEL M. F.; WIERSINGA W. M. Surgical or medical decompression as a first-line treatment of optic neuropathy in Graves' ophthalmopathy? A randomized controlled trial. **Clinical Endocrinology**, Amsterdam, v.63, n. 3, p. 323-328, 2005.

WILMAR M.; WIERSING; MARK F.; PRUMMEL. Graves' ophthalmopathy: a rational approach to treatment. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, Amsterdam, v.13, n. 7, p. 280-287, 2002.

WOLFF'S E. The eyeball. In: WOLFF'S E. **Anatomy of The Eye and Orbit**. 6 ed. London: H. K. Lewis & Co. Ltda, 1973. Cap. 2, p. 30-181.

YASUKAWA, T.; KIMURA, H.; TABATA, Y.; OGURA, Y. Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 52, n. 1, 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**, Oxford/ New York, v. 23, n. 3, p. 253-281, may. 2004.