

ELIONAI CASSIANA DE LIMA GOMES

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE IMPLANTES
INTRAOCULARES CONSTITUÍDOS DE POLIURETANO
BIODEGRADÁVEL E BEVACIZUMABE**

BELO HORIZONTE – MG

FACULDADE DE FARMÁCIA - UFMG

2011

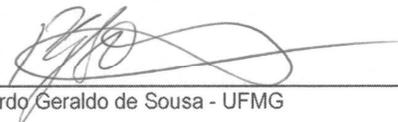
FOLHA DE APROVAÇÃO

ELIONAI CASSIANA DE LIMA GOMES

"Desenvolvimento e avaliação da viabilidade de implantes intraoculares constituídos de poliuretano biodegradável e bevacizumabe"

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

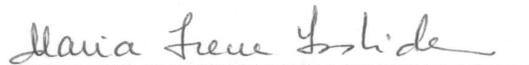
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Ricardo Geraldo de Sousa - UFMG



Dra. Luciana Maria Silva - Fundação Ezequiel Dias



Profa. Dra. Maria Irene Yoshida - UFMG



Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Junior - UFMG

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2011

ELIONAI CASSIANA DE LIMA GOMES

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE IMPLANTES
INTRAOCULARES CONSTITUÍDOS DE POLIURETANO
BIODEGRADÁVEL E BEVACIZUMABE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Irene Yoshida

BELO HORIZONTE – MG

FACULDADE DE FARMÁCIA - UFMG

2011

G633d Gomes, Elionai Cassiana de Lima
Desenvolvimento e avaliação da viabilidade de implantes
intraoculares constituídos de poliuretano biodegradável e
bevacizumabe / Elionai Cassiana de Lima Gomes . – 2011.
98 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior.
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Irene Yoshida

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas.

1. Bevacizumabe – Teses. 2. Polímeros na medicina – Teses.
3. Oftalmologia – Teses. 4. Implantes intraoculares – Teses.
5. Tecnologia de liberação controlada – Teses.. I. Cunha Júnior,
Armando da Silva. II. Yoshida, Maria Irene. III. Universidade Federal
de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:615.4



*“As pessoas mais felizes
não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor
das oportunidades que
aparecem em seus caminhos.
A felicidade aparece para
aqueles que choram. Para
aqueles que se machucam.
Para aqueles que
buscam
e tentam sempre.”*

Clarice Lispector

*Dedico este trabalho a
todas as pessoas que
sofrem ou já sofreram
com a Retinopatia
Diabética Proliferativa
e a Degeneração
Macular Relacionada a
Idade. Desejo que um
dia seja possível evitar
e reverter todos os
males que essas
terríveis doenças
causam.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela Sua presença nas horas alegres e Seu amparo nos momentos difíceis. Agradeço por me dar forças para seguir sempre em frente.

Ao professor Armando da Silva Cunha Júnior, pela confiança em meu trabalho e por me permitir adquirir um aprendizado valioso. É uma pessoa por quem tenho uma grande admiração, e fico feliz que durante este tempo tenhamos nos tornado amigos.

À professora Maria Irene Yoshida, que me acolheu na Iniciação Científica e desde então tem sido uma pessoa indispensável em minha vida, um exemplo que procuro seguir, pela sua competência, profissionalismo e humildade. Agradeço também pelo imensurável apoio em todos os momentos.

Ao professor Wagner da Nova Mussel, que sempre me incentivou, sempre esteve disponível para me ajudar e deu dicas valiosas que enriqueceram este trabalho. Agradeço especialmente a ajuda nas análises de Raios X.

Ao professor Rodrigo Oréfice e à doutora Eliane Ayres, pela colaboração e ajuda na síntese do polímero utilizado neste trabalho.

Ao Marcelinho, que juntamente com a Irene me iniciou na pesquisa e com seu entusiasmo de sempre me fez amar o trabalho acadêmico. É uma pessoa muito querida, sem a qual talvez eu não tivesse chegado até aqui.

Aos professores Liu Wen Yu, Bibo e Vinícius Caliman, pelas horas descontraídas nos almoços e cafés.

A todos os professores do DQ e FAFAR que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal. Em especial à professora Renata Barbosa de Oliveira

e ao professor Ricardo José Alves, pelo carinho que sempre tiveram comigo. São pessoas muito especiais em minha vida, não só pela importância imensurável que tiveram durante o meu processo de aprendizado científico, mas também por me ensinarem constantemente exemplos de humanidade, nos quais eu me espelho na busca por ser uma pessoa mais consciente a cada dia.

Ao Eduardo, coordenador do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, pela presteza, e a todos os professores e alunos do LTF, pela convivência, ajuda e sugestões... Em especial à Juliana e ao Ricardo, que me ensinaram a operar o HPLC; e aos queridos Samu, Elton, Daniel, Mateus, Leilinha, Lorena, Tati e Livinha, por tornarem meu dia-a-dia tão prazeroso.

A todo o pessoal do Controle de Qualidade, especialmente à Taízia, à Isabella e ao Fernando, pela agradável convivência.

À funcionária Lavina, pelo carinho.

A todos os funcionários da Faculdade de Farmácia e do Departamento de Química, pela simpatia.

E um agradecimento particular aos meus pais, Isabel e Arnaldo, pelo apoio e por tornarem mais esta etapa possível; aos meus irmãos Eliezer e Jônatas, minha cunhada Adriana e meu sobrinho Matheus, por me proporcionarem momentos familiares inesquecíveis.

SUMÁRIO

RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 O bulbo do olho	3
2.1.1 O segmento posterior do bulbo do olho	3
2.2 Retinopatia Diabética proliferativa (PDR) e Degeneração Macular Relacionada à idade (AMD)	6
2.2.1 Retinopatia Diabética	6
2.2.2 Degeneração Macular Relacionada à Idade	8
2.3 Angiogênese	9
2.3.1 VEGF	10
2.3.2 Mecanismo patológico da neovascularização relacionada às doenças oftálmicas	11
2.4 Terapia Anti-angiogênica e Inibidores da angiogênese	13
2.4.1 Bevacizumabe	14
2.5 Tratamento da PDR e da AMD com bevacizumabe	16
2.6 Limitações no tratamento das doenças que acometem o segmento posterior do olho	17
2.7 Sistemas de liberação controlada de fármacos	19
2.7.1 Implantes poliméricos	21
2.8 Poliuretanos	23
2.8.1 Dispersões aquosas de poliuretanos	29
3 JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo geral	32
4.2 Objetivos específicos	32
5 PARTE EXPERIMENTAL	33
5.1 Material	33

5.2 Métodos.....	35
5.2.1 Síntese da dispersão aquosa de poliuretano	35
5.2.2 Incorporação do bevacizumabe à dispersão aquosa de poliuretano e preparo dos implantes	40
5.2.3 Desenvolvimento e validação do método de análise do bevacizumabe por cromatografia líquida de alta eficiência.....	40
5.2.4 Análise Térmica.....	44
5.2.5 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	45
5.2.6 Difração de raios X (DRX)	45
5.2.7 Estudo de liberação <i>in vitro</i> do bevacizumabe a partir dos implantes	46
5.2.8 Análise morfológica dos filmes por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	46
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1 Desenvolvimento e validação do método analítico.....	47
6.1.1 Desenvolvimento do método analítico	47
6.1.2 Validação do método analítico	52
6.2 Análise Térmica	56
6.2.1 Termogravimetria (TG)	56
6.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	59
6.3 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	61
6.4 Difração de raios X (DRX)	69
6.5 Estudo de liberação <i>in vitro</i> do bevacizumabe a partir dos implantes	71
6.6 Análise morfológica dos filmes por microscopia eletrônica de varredura (MEV) .	72
7 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURAS QUE COMPÕEM O BULBO DO OLHO	4
FIGURA 2 - ORGANIZAÇÃO DA RETINA	5
FIGURA 3 - O FUNDO DE OLHO NORMAL	7
FIGURA 4 - ANGIOGRAFIAS MOSTRANDO HEMORRAGIA VÍTREA (A), DESCOLAMENTO TRACIONAL DA RETINA (B) E TECIDO FIBROVASCULAR (C)	8
FIGURA 5 - <i>RUBEOSIS IRIDIS</i>	8
FIGURA 6 - MECANISMO DE NEOVASCULARIZAÇÃO SUB-RETINIANA	11
FIGURA 7 - PROCESSO DE ANGIOGÊNESE	12
FIGURA 8 - REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO URETANO	24
FIGURA 9 - ESTRUTURAS DE ALGUNS POLIÓIS UTILISADOS NA SÍNTESE DE POLIURETANOS	25
FIGURA 10 - ESTRUTURAS DE ALGUNS DIISOCIANATOS ALIFÁTICOS	26
FIGURA 11 - REAÇÕES DE ISOCIANATOS	27
FIGURA 12 - ESTRUTURA DE ALGUNS EXTENSORES DE CADEIA COMUMENTE UTILIZADOS NA SÍNTESE DE POLIURETANOS	28
FIGURA 13 - ESTRUTURA SEGMENTADA DOS POLIURETANOS	28
FIGURA 14 - ÁCIDO DIMETIOL PROPIONICO (DMPA)	30
FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO DO ESQUEMA DE DISPERSÃO DO POLIURETANO EM ÁGUA	36
FIGURA 16 - MODELO DE APARELHAGEM UTILIZADA PARA REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO	38
FIGURA 17 - IMPLANTES BRANCOS DE POLIURETANO (ESQUERDA) E POLIURETANO CONTENDO BEVACIZUMABE (DIREITA)	40
FIGURA 18 - CROMATOGRAMA DO TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO 0,1 M PH 7,4	48
FIGURA 19 - CROMATOGRAMA DO BEVACIZUMABE (50 µG/ML) DILUÍDO EM TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO 0,1 M. A SETA INDICA O PICO DO BEVACIZUMABE	48
FIGURA 20 - CROMATOGRAMA DO TAMPÃO FOSFATO SALINO (PBS) PH 7,4	49
FIGURA 21 - CROMATOGRAMA DO BEVACIZUMABE (50 µG/ML) DILUÍDO EM TAMPÃO FOSFATO SALINO (PBS) PH 7,4. A SETA INDICA O PICO DO BEVACIZUMABE	49
FIGURA 22 - CROMATOGRAMA DO BEVACIZUMABE (50 µG/ML) COM FLUXO DE 0,5 ML/MIN	50
FIGURA 23 - CROMATOGRAMA DO BEVACIZUMABE (50 µG/ML) COM FLUXO DE 0,8 ML/MIN	51
FIGURA 24 - CROMATOGRAMA DO BEVACIZUMABE (50 µG/ML) COM FLUXO DE 1,0 ML/MIN	51
FIGURA 25 - CURVAS DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE	52
FIGURA 26 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE TAMPÃO PBS CONTENDO 60 µG/ML DE D-(+)-TREALOSE E 0,04% DE TWEEN 20	55
FIGURA 27 - CURVAS TG/DTG DO POLIURETANO EM ATMOSFERA DINÂMICA DE N ₂	56
FIGURA 28 - CURVAS TG/DTG DO BEVACIZUMABE LIOFILIZADO EM ATMOSFERA DINÂMICA DE N ₂	57
FIGURA 29 - CURVAS TG/DTG DO POLIURETANO CONTENDO BEVACIZUMABE EM ATMOSFERA DINÂMICA DE N ₂	58
FIGURA 30 - SOBREPOSIÇÃO DAS CURVAS TG DO POLIURETANO, BEVACIZUMABE LIOFILIZADO E POLIURETANO CONTENDO BEVACIZUMABE EM ATMOSFERA DINÂMICA DE N ₂	58
FIGURA 31 - SOBREPOSIÇÃO DAS CURVAS DSC DO POLIURETANO, BEVACIZUMABE LIOFILIZADO E POLIURETANO CONTENDO BEVACIZUMABE EM ATMOSFERA DINÂMICA DE HE	59
FIGURA 32 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS DE PUD5 E PUD5BV	62
FIGURA 33 - CURVAS DE DECONVOLUÇÃO DA BANDA NA REGIÃO DE ESTIRAMENTO DA CARBONILA (CO) PARA AMOSTRA DE PUD5	64
FIGURA 34 - CURVAS DE DECONVOLUÇÃO DA BANDA NA REGIÃO DE ESTIRAMENTO DA CARBONILA (CO) PARA AMOSTRA DE PUD5BV ..	64
FIGURA 35 - CURVAS DE DECONVOLUÇÃO DA BANDA NA REGIÃO DE ESTIRAMENTO DE GRUPO N-H PARA AMOSTRA DE PUD5	66
FIGURA 36 - CURVAS DE DECONVOLUÇÃO DA BANDA NA REGIÃO DE ESTIRAMENTO DE GRUPO N-H PARA AMOSTRA DE PUD5BV	67

FIGURA 37 - POSSÍVEIS INTERAÇÕES DE HIDROGÊNIO ENTRE O BEVACIZUMABE E O POLIURETANO. AS INTERAÇÕES 1-4 OCORREM ENTRE O FÁRMACO E OS GRUPOS PERTENCENTES AOS SEGMENTOS RÍGIDOS DO POLÍMERO. A INTERAÇÃO 5 OCORRE ENTRE O FÁRMACO E GRUPOS PERTENCENTES AOS SEGMENTOS MACIOS DO POLIURETANO.....	68
FIGURA 38 - DIFRAÇÃO DE RAIOS X COM ÂNGULO RAZANTE PARA PUD5	69
FIGURA 39 - DIFRAÇÃO DE RAIOS X COM ÂNGULO RAZANTE PARA PUD5BV	70
FIGURA 40 - SUBTRAÇÃO ESPECTRAL ENTRE PUD5BV E PUD5	71
FIGURA 41 - MICROGRAFIA DA REGIÃO DE FRATURA DO FILME DE POLIURETANO.....	72
FIGURA 42 - MICROGRAFIAS REFERENTES ÀS AMOSTRAS DE PUD5 E PUD5BV, ANTES E APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO EM TAMPÃO PBS: (A) PUD5 ANTES DA INCUBAÇÃO; (B) PUD5BV ANTES DA INCUBAÇÃO; (C) PUD5 APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO; E (D) PUD5BV APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO	73

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - PROPRIEDADES E ESTRUTURA QUÍMICA DOS REAGENTES UTILIZADOS NA SÍNTESE DA DISPERSÃO AQUOSA DE POLIURETANO....	34
TABELA 2 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	52
TABELA 3 - RESULTADOS DO TRATAMENTO ESTATÍSTICO POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A REGRESSÃO LINEAR.....	53
TABELA 4 - ROBUSTEZ COM RELAÇÃO À VARIAÇÃO DO FLUXO. MÉDIAS COM LETRAS IGUAIS SÃO ESTATISTICAMENTE SEMELHANTES A 5%	54
TABELA 5 - ROBUSTEZ COM RELAÇÃO À VARIAÇÃO DO PH. MÉDIAS SEGUIDAS DE LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI ESTATISTICAMENTE PELO TESTE T DE STUDENT A 5%	54
TABELA 6 - VALORES DE DESVIO PADRÃO RELATIVO DA AVALIAÇÃO DA REPETIBILIDADE E DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO MÉTODO ANALÍTICO	54
TABELA 7 - BANDAS DE ABSORÇÃO OBTIDAS A PARTIR DA DECONVOLUÇÃO DA CURVA REFERENTE À AMOSTRA DE PUD5 NA REGIÃO DE ABSORÇÃO DAS CARBONILAS.....	65
TABELA 8 - BANDAS DE ABSORÇÃO OBTIDAS A PARTIR DA DECONVOLUÇÃO DA CURVA REFERENTE À AMOSTRA DE PUD5BV NA REGIÃO DE ABSORÇÃO DAS CARBONILAS.....	65

SIGLAS E ABREVIATURAS

AMD	Degeneração Macular Relacionada à Idade
ARPE-19	Células epiteliais pigmentares da retina
BVC	Bevacizumabe
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNV	Neovascularização coroidal
DCCT	Diabetes Control and Complication Trial
DMPA	Ácido dimetilolpropiônico
DM	Diabetes melittus
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EMA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
EPR	Epitélio pigmentar da retina
FDA	Food and Drug Administration
FF	Forma farmacêutica
FFS	Forma farmacêutica sólida
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
INV	Neovascularização da íris
IPDI	Isoforona diisocianato
MEC	Membrana extracelular
Min	Minuto
MNSR	Membrana neovascular sub-retiniana
MMPs	Metaloproteases
PDR	Retinopatia Diabética Proliferativa

PIO	Pressão intraocular
PU	Poliuretano
PUD/PUD5	Dispersão aquosa de poliuretano
PUD5BV	Dispersão aquosa de poliuretano contendo bevacizumabe
Tr	Tempo de retenção
Tg	Transição vítrea
TG	Termogravimetria
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular
DRX	Difração de raios X

RESUMO

O tratamento de doenças que atingem o segmento posterior do olho é limitado pela dificuldade no transporte de doses eficazes de fármacos para o vítreo, retina e coróide. Injeções intravítreas vêm sendo utilizadas para transportar fármacos para o segmento posterior do olho, mas é uma técnica invasiva e apresenta riscos de infecções oculares e danos aos tecidos. Visando a obtenção de níveis terapêuticos adequados de fármacos no segmento posterior do olho por longos períodos, sistemas poliméricos de liberação prolongada implantados diretamente no vítreo estão sendo investigados para o tratamento de várias doenças vítreo-retinianas. Tais sistemas eliminam a necessidade de aplicações repetidas, visto que o fármaco é liberado por um período de tempo maior, apresentando assim uma enorme vantagem em relação às injeções. Neste trabalho, foi sintetizada uma dispersão aquosa de poliuretano biodegradável, e o bevacizumabe foi incorporado a ela. A partir desta incorporação, implantes constituídos de poliuretano e bevacizumabe foram desenvolvidos e avaliados como dispositivos intraoculares de liberação controlada do fármaco, destinados ao tratamento da Retinopatia Diabética proliferativa e Degeneração Macular Relacionada à Idade. Estes implantes foram caracterizados por FTIR, DRX e Análise Térmica, e também foram submetidos ao estudo de liberação *in vitro* do bevacizumabe. O fármaco foi quantificado por método analítico desenvolvido e validado previamente. As diferentes técnicas de caracterização revelaram que o bevacizumabe interagiu com o poliuretano após dispersão na matriz polimérica. Esta interação foi confirmada também pelo estudo de liberação *in vitro*, uma vez que não foram detectados picos referentes ao fármaco durante o estudo. Portanto, o poliuretano utilizado no presente trabalho não apresentou viabilidade para ser utilizado em sistemas de liberação prolongada do bevacizumabe.

Palavras-chaves: Poliuretano, bevacizumabe, implantes intraoculares, liberação prolongada de fármacos, segmento posterior do olho

ABSTRACT

The treatment of diseases of the posterior segment of the eye is limited by the difficulty in delivering effective doses of the drug to the vitreous, retina and choroid. Intravitreal injections have been used to deliver drugs to the posterior segment of the eye, but it is an invasive technique and shows risk of infections and damages in ocular tissues. Aiming to reach adequate therapeutic range of the drugs in the posterior segment of the eye for long periods, controlled drug release polymeric systems implanted directly in the vitreous have been investigated for the treatment of several ocular diseases. Such systems eliminate the need for repeated applications, since the drug is released over a period of time, thus presenting a huge advantage over injections. In this study, a biodegradable aqueous dispersion of polyurethane was synthesized, and bevacizumab was incorporated to it. From this incorporation, implants made of polyurethane and bevacizumab were developed and evaluated as intraocular devices for controlled drug delivery for the treatment of proliferative diabetic retinopathy and age-related macular degeneration. These implants were characterized by FTIR, XRD and thermal analysis, and also submitted to in vitro drug release study. The drug was quantified by the analytical method previously developed and validated. Different characterization techniques revealed that bevacizumab interacted with polyurethane when dispersed in the polymer matrix. This interaction was further confirmed by in vitro release study, since no peaks concerning to the drug were detected during the study. Therefore, the polyurethane used in this work showed no viability for use in delivery systems for prolonged bevacizumab.

Keywords: Polyurethane, bevacizumab, intraocular implants, controlled drug release, posterior segment of the eye

1 INTRODUÇÃO

A retinopatia diabética proliferativa (PDR, *proliferative diabetic retinopathy*) e a degeneração macular relacionada à idade (AMD, *age-related macular degeneration*) são responsáveis pela maioria dos casos de cegueira adquirida no mundo inteiro. Tais doenças acometem o segmento posterior do olho, cujo tratamento é limitado devido à presença de barreiras naturais do olho, constituídas pela córnea, conjuntiva e sistema hematorretiniano. Essas barreiras dificultam o transporte de doses efetivas de fármacos para o interior do olho, e, havendo necessidade desse transporte, as formas farmacêuticas oculares convencionais não são eficientes.

A administração tópica, na forma de soluções, suspensões, géis e pomadas, apresenta um efeito terapêutico praticamente insignificante nas estruturas posteriores do olho. Os fármacos utilizados pela via sistêmica também penetram muito pouco no olho e, algumas vezes, é necessário o tratamento prolongado com doses elevadas, por meio de injeções intravenosas, para manutenção da concentração do fármaco no vítreo dentro da faixa terapêutica, o que pode ocasionar sérios efeitos adversos. A administração intravítrea é uma alternativa para que se atinja uma concentração efetiva do fármaco nos tecidos oculares posteriores. Entretanto, são requeridas injeções repetidas nesse local, que podem resultar em inúmeras complicações e desconforto para o paciente.

Dentre os fármacos utilizados no tratamento da PDR e da AMD destaca-se o bevacizumabe, que apesar de não ter seu uso aprovado para essa finalidade, vem sendo muito útil na terapia das doenças oculares degenerativas, devido ao seu mecanismo de ação. O tratamento com o fármaco em questão é feito por meio de injeções intravítreas.

Uma forma de evitar os riscos relacionados a essas injeções é o desenvolvimento de um sistema que permita a liberação gradual e em doses efetivas de fármaco no interior do olho. Diferentes sistemas de transporte de fármacos têm sido desenvolvidos para essa finalidade, dentre os quais destacam-se os implantes poliméricos, que podem ser biodegradáveis ou não.

O presente trabalho objetivou desenvolver um implante intraocular constituído por uma matriz polimérica de poliuretano, um material biocompatível e biodegradável, contendo o fármaco bevacizumabe.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O bulbo do olho

O bulbo do olho é formado por estruturas que compõem os segmentos anterior e posterior do olho. O segmento anterior é constituído pela conjuntiva, íris, cristalino, pupila, córnea, humor aquoso e esclera, sendo que esta última circunda todo o bulbo do olho. O segmento posterior compreende o corpo vítreo, a retina, coróide, o nervo óptico e também a esclera (Ogura, 2001; Yasukawa, Ogura *et al.*, 2004).

Além dessas estruturas, há também os chamados anexos do bulbo do olho, os quais são constituídos pelas pálpebras, conjuntiva e sistema nasolacrimal.

Neste trabalho será considerado apenas o segmento posterior do bulbo do olho.

2.1.1 O segmento posterior do bulbo do olho

As estruturas que formam o segmento posterior do bulbo do olho estão representadas na Figura 1.

A esclera (ou esclerótica) é a camada mais externa do segmento posterior e também está presente no segmento anterior, e forma juntamente com a córnea a camada protetora e fibrosa do olho, porque se mantém estável durante variações da pressão intraocular e movimentos do olho. As fibras do nervo óptico atravessam a esclera,

através de uma área posterior desta estrutura denominada lâmina cribrosa (Watson e Young, 2004).

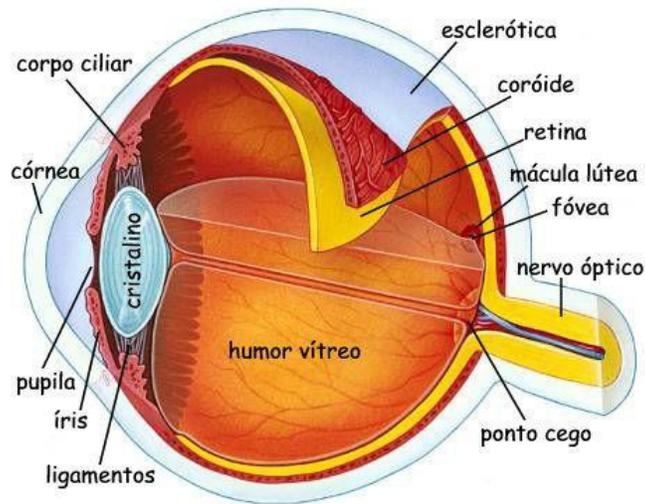


Figura 1 - Estruturas que compõem o bulbo do olho

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

A retina (Figura 2) é a camada mais interna do segmento posterior do bulbo do olho, e é a estrutura ocular responsável pela captação dos estímulos luminosos, por meio dos fotorreceptores nela presentes, que são compostos pelos cones e bastonetes.

A camada externa da retina encontra-se em contato com a coróide, e a camada interna, com o corpo vítreo.

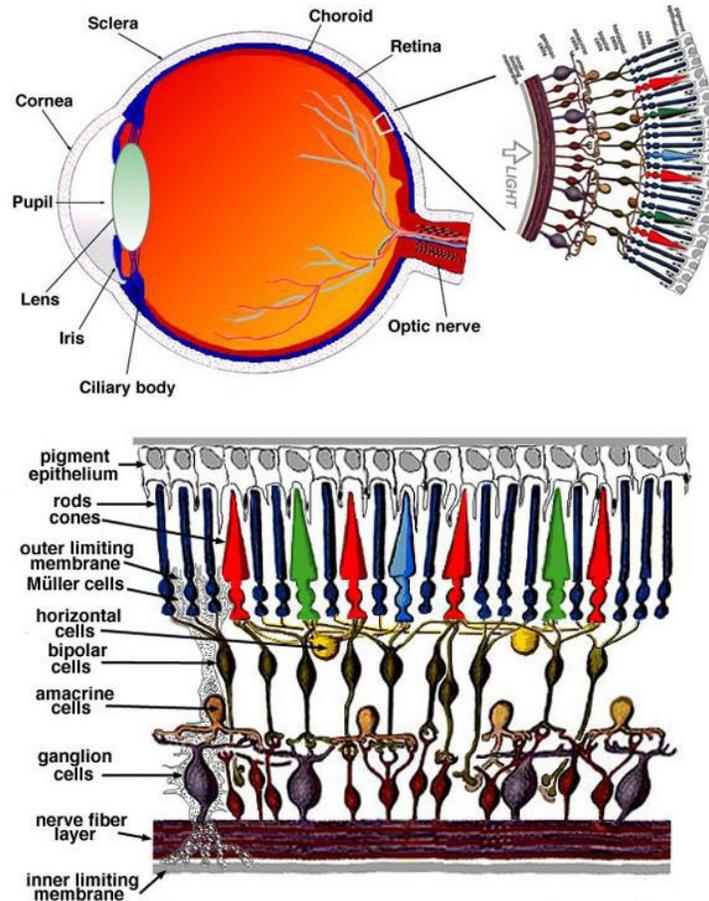


Figura 2 - Organização da retina

O corpo vítreo, também denominado humor vítreo, é constituído de água, colágeno, proteínas do plasma e ácido hialurônico.

O corpo vítreo está em contato direto com a retina, o corpo ciliar e a porção posterior da lente, e é capaz de promover estabilidade aos componentes posteriores do olho, atenuando o estresse que pode ser gerado à retina, devido aos súbitos movimentos. Esta observação é justificável quando se considera que a primeira etapa no processo de descolamento de retina é sua separação do corpo vítreo (Lloyd, Faragher *et al.*, 2001).

2.2 Retinopatia Diabética proliferativa (PDR) e Degeneração Macular Relacionada à idade (AMD)

A PDR e a AMD estão entre as principais causas de cegueira irreversível no nosso meio, cuja perda visual é decorrente da neovascularização ocular. A neovascularização ocorre em situações patológicas como uma tentativa de reparação de danos teciduais por meio da formação local de novos vasos sanguíneos (neovascularização) (Damico, 2007).

A AMD é a principal causa de cegueira nos pacientes com mais de 50 anos de idade na maioria dos países desenvolvidos (Farah, Oshima *et al.*, 2001). Por sua vez, a PDR afeta a metade dos pacientes diabéticos, sendo a principal causa de cegueira em adultos portadores dessa doença. Só no Brasil, a prevalência do diabetes é de 12,1% (Universo Visual, 2010).

2.2.1 Retinopatia Diabética

Atualmente, estima-se que 7 a 8% da população mundial seja portadora de diabetes mellitus (DM). A prevalência no Brasil é comparável à dos países mais desenvolvidos, onde o Diabetes Mellitus (DM) é considerado um dos maiores problemas de saúde pública. No nosso país, situa-se entre as 10 maiores causas de mortalidade (Malerbi e Franco, 1992). Entretanto, é na sua morbidade que se concentra o maior impacto sócio-econômico. Os resultados do *Diabetes Control and Complication Trial* (DCCT) comprovaram que a hiperglicemia crônica é o fator causal mais importante para o desenvolvimento da microangiopatia, que acomete em particular rins e olhos (Alder, Su *et al.*, 1997). A Retinopatia Diabética é a complicação vascular mais específica, tanto do DM tipo 1 quanto do tipo 2, e quando resulta em cegueira é considerada uma das complicações mais trágicas. Seu diagnóstico geralmente é feito por meio de

angiografias com fluoresceína. Um exemplo de angiografia mostrando um fundo de olho normal é mostrado na Figura 3.

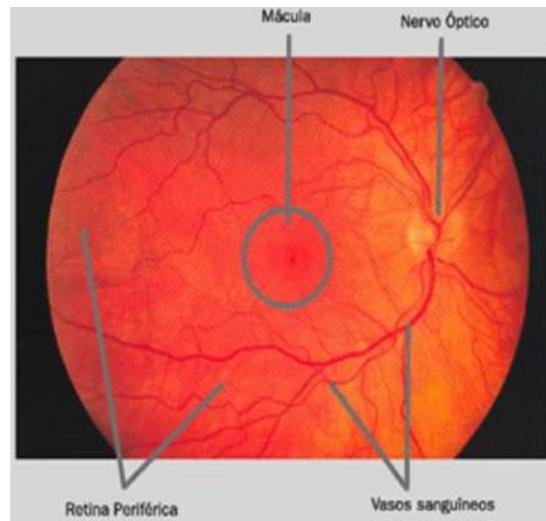


Figura 3 - O fundo de olho normal

Quase 100% dos indivíduos com DM1 irá progredir para alguma forma de retinopatia após 15 anos de doença, sendo que, destes, aproximadamente 60% irá desenvolver a forma mais grave que é a proliferativa. Este estágio é caracterizado pela formação de novos vasos (angiogênese) na retina que crescem em direção à interface vítrea. Esses vasos possuem paredes mais finas que os vasos normais, e, portanto, são mais suscetíveis à ruptura, causando extravasamento de sangue no humor vítreo. Essa situação pode evoluir para a perda irreversível da acuidade visual, principalmente em decorrência de glaucoma neovascular, hemorragia vítrea (Figura 4a) e descolamento tracional da retina (Figura 4b) (Alder, Su *et al.*, 1997; Bosco, Lerário *et al.*, 2005). O descolamento tracional da retina ocorre em consequência do crescimento de tecido fibroso (Figura 4c) durante a cicatrização da hemorragia. Essa cicatriz fibrosa pode se contrair, causando assim o descolamento da retina por tração. Já o glaucoma neovascular é consequência da neovascularização da íris, condição denominada *rubeosis iridis* (figura 5). Os novos vasos interrompem o fluxo normal de humor aquoso, o que causa aumento da pressão intraocular.

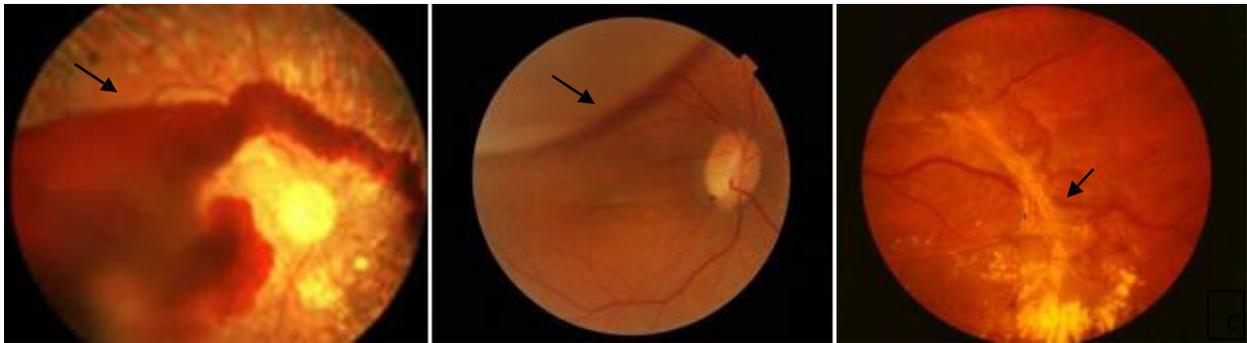


Figura 4 - Angiografias mostrando hemorragia vítrea (a), descolamento tracional da retina (b) e tecido fibrovascular (c)

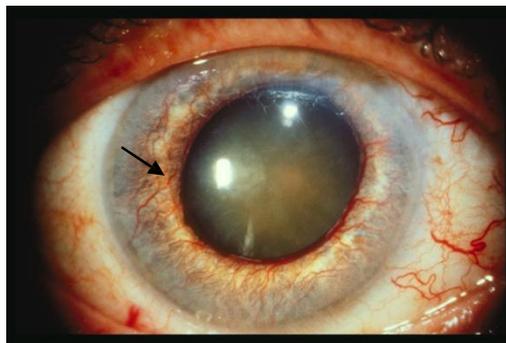


Figura 5 - Rubeosis iridis

2.2.2 Degeneração Macular Relacionada à Idade

A Degeneração Macular Relacionada à Idade é uma das principais causas de perda visual na terceira idade. Os fatores de risco estabelecidos para a doença são: idade avançada, etnia caucasiana, fumo, e hipertensão arterial sistêmica. A forma neovascular (ou exsudativa) da AMD é a mais grave e caracteriza-se pelo crescimento anormal de vasos sanguíneos no espaço sub-retiniano, especificamente sob o tecido da coróide, formando a denominada membrana neovascular sub-retiniana (MNSR). A MNSR estende-se anteriormente através de um defeito na membrana de Bruch para o espaço abaixo do epitélio pigmentar da retina (EPR), e/ou da retina neurosensorial, levando ao acúmulo de líquido (sangue ou lipídeos) no espaço sub-retiniano. Estes

efeitos secundários da MNSR, adicionados à presença de um tecido cicatricial ou fibroso, ocasiona a perda da visão central (Rodrigues, Rossi *et al.*, 2006).

2.3 Angiogênese

A teoria de que a formação de vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (angiogênese) é essencial para o crescimento e desenvolvimento dos tumores, surgiu por volta de 1939, quando Ide e colaboradores (1939) postularam a existência de vasos sanguíneos derivados de tumores, que serviriam para suprir as necessidades nutricionais dos mesmos.

Em 1968, experimentos realizados por Greenblatt & Shubi e Ehrmann & Knoth demonstraram que a angiogênese poderia ser mediada por proteínas ou fatores estimuladores do crescimento vascular liberados pelas células tumorais. Já no princípio da década de setenta, Folkman (1971) demonstrou a importante participação da microcirculação no processo do crescimento tumoral.

A angiogênese ocorre naturalmente no organismo durante o desenvolvimento embrionário, ciclo reprodutivo da mulher e em resposta a cicatrização de ferimentos para a restauração do fluxo sanguíneo nos tecidos lesados. Em condições normais, o organismo é capaz de manter o equilíbrio entre os mediadores angiogênicos e anti-angiogênicos. Nas situações em que o organismo perde a capacidade de modular a angiogênese, surgem as doenças relacionadas a essa perda (Polverini, 2002; Tonini, Rossi *et al.*, 2003).

A angiogênese insuficiente ocorre em doenças como cicatrização retardada de ferimentos, doenças das artérias coronárias e derrame cerebral. Quando a angiogênese é excessiva, doenças como câncer, aterosclerose, inflamações crônicas,

retinopatia diabética, psoríase, endometriose e adiposidades podem surgir (Griffioen e Molema, 2000).

Um dos fatores de crescimento mais bem estudados e um dos mais potentes fatores pró-angiogênicos é o VEGF (*Vascular endothelial growth factor*, fator de crescimento de endotélio vascular), descoberto por Dorak e colegas em meados dos anos 80 (Senger, Galli *et al.*, 1983).

2.3.1 VEGF

O VEGF é um dos principais alvos para o desenvolvimento de terapias anti-angiogênicas devido às suas características, como exemplo: posição estratégica do VEGF na regulação da angiogênese tumoral, servindo como ponto de integração de uma grande variedade de sinais reguladores positivos e negativos que resultam em estimulação das células endoteliais; e promoção da angiogênese pela ação direta do VEGF sobre as células endoteliais. Além disso, o VEGF pode induzir a expressão de proteases e receptores importantes na invasão celular e no remodelamento, prevenindo, com isso, a apoptose (Griffioen e Molema, 2000). Em contraste com fármacos que inibem a angiogênese indiretamente, por meio da inibição de fatores angiogênicos derivados dos tumores, fármacos que atuam na inibição da sinalização mediada pelo VEGF são menos susceptíveis à resistência por parte de linhagens celulares mutantes (Pandya, Dhalla *et al.*, 2006).

A família VEGF inclui o VEGF-A, -B, -C, -D, -E e o fator de crescimento placentário (Rodrigues, Farah *et al.*, 2009). Por meio de “splicing alternativo” podem ser encontradas as seguintes isoformas do VEGF: com 121, 145, 148, 162, 165, 165b, 183, 189 e 206 aminoácidos, sendo as isoformas mais comumente encontradas aquelas contendo 121 e 165 aminoácidos (Matsumoto e Claesson-Welsh, 2001; Cross, Dixelius *et al.*, 2003; Eubank, Galloway *et al.*, 2003).

Os receptores de VEGF (VEGFR) são expressos em células endoteliais de adultos e na maioria das células durante a embriogênese. Os VEGFRs não agem sozinhos, mas acoplados a proteínas acessórias e co-receptores para regularem a sinalização. Estas proteínas acessórias incluem as caderinas, integrinas, neuropilinas, heparina e proteoglicanas de sulfato de heparana (Matsumoto e Claesson-Welsh, 2001). Na angiogênese anormal, o VEGF-A é a isoforma mais relacionada com os efeitos patológicos sobre as células endoteliais e o VEGFR-2 é o seu principal mediador (Cross, Dixelius *et al.*, 2003; Rodrigues, Farah *et al.*, 2009).

2.3.2 Mecanismo patológico da neovascularização relacionada às doenças oftálmicas

O mecanismo de neovascularização sub-retiniana mais aceito está descrito e ilustrado a seguir:

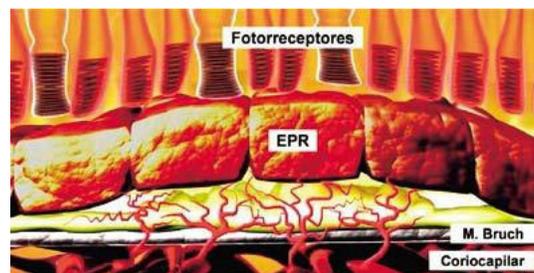


Figura 6 - Mecanismo de neovascularização sub-retiniana

O envelhecimento causa alterações no epitélio pigmentar da retina (EPR), que perde parte da capacidade de degradar metabólitos do processo visual que ocorre nos fotorreceptores, levando ao acúmulo de lipídios na membrana de Bruch (Holz, Sheridah *et al.*, 1994), tornando-a mais espessa e diminuindo a capacidade de difusão do oxigênio (Bird, 2003). Além disso, a demanda de oxigênio na mácula, a presença de ácidos graxos e a exposição contínua à luz visível oxidam diversas moléculas do EPR,

o que leva à formação e acúmulo de lipofuscina na região macular. Com isso, as células do EPR, que eram bem vascularizadas devido à produção de VEGF local, têm sua vascularização comprometida, resultando em hipóxia dos fotorreceptores e atrofia da coriocapilar (Ramrattan, Van Der Schaft *et al.*, 1994). Em resposta a hipóxia, há a indução da liberação de VEGF pelas células do EPR (Blaauwgeers, Holtkamp *et al.*, 1999).

A presença dos metabólitos e da lipofuscina causa inflamação crônica da mácula, condição que leva à ativação do sistema complemento e migração de células inflamatórias para o espaço sub-retiniano (exsudato), causando destruição focal da membrana de Bruch (Johnson, Leitner *et al.*, 2001). Finalmente, a liberação excessiva de VEGF associada aos danos na membrana de Bruch leva à formação de novos vasos e a formação de cicatriz fibrosa macular com perda acentuada da visão (Damico, 2007). O VEGF induz a mitose nas células endoteliais, ao mesmo tempo em que há liberação de enzimas que digerem a membrana basal, permitindo assim o entroncamento dos vasos sanguíneos, formando os neovasos (Figura 7).

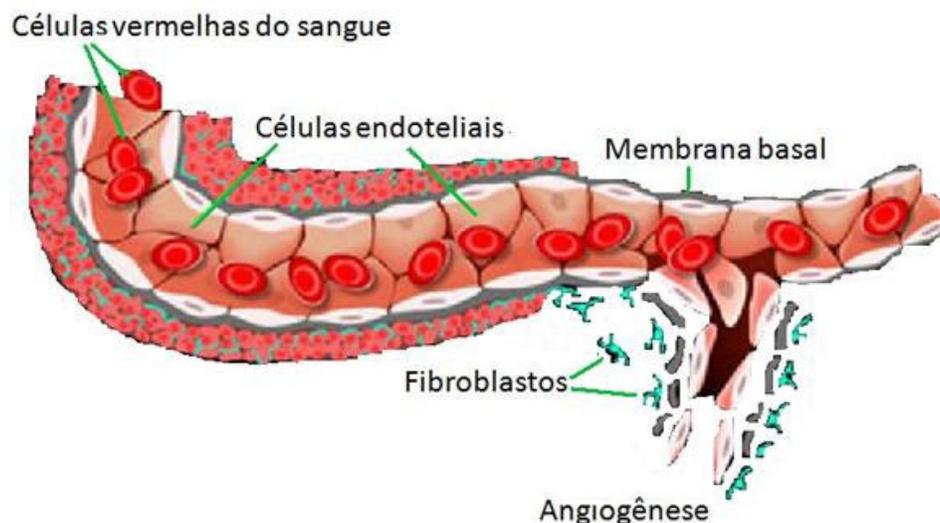


Figura 7 - Processo de angiogênese

2.4 Terapia Anti-angiogênica e Inibidores da angiogênese

Na busca das substâncias que poderiam atuar na terapia pró e anti-angiogênica, a primeira molécula isolada e identificada como angiogênica foi descrita em 1984 (Shing, Folkman *et al.*, 1984), e a primeira que exibiu efeitos inibitórios sobre o crescimento celular, com especificidade para as células endoteliais foi o o-cloroacetilcarbamoil fumagillol ou AGM-1470/TNP-470, um análogo do antibiótico fumagillin, cujo mecanismo de ação é impedir que as células endoteliais entrem na fase G₁ do ciclo celular, resultando numa diminuição da proliferação (Ingber, 1990; Rosen, 2000).

Atualmente existem muitas classes de substâncias que atuam bloqueando diferentes etapas que envolvem a angiogênese: inibição de determinados fatores de crescimento como o VEGF, a interrupção da sinalização via bloqueio das tirosinas-quinases do receptor do VEGF (VEGFR), bloqueio de enzimas que degradam a membrana extracelular (MEC) ou a utilização de inibidores endógenos (Sivakumar, Harry *et al.*, 2004). Estão disponíveis substâncias inibidoras de metaloproteases (MMPs) da MEC, tais como o Marimastat, o Prinomastat, BMS275291, BAY12-9566 e o Neovastat, fármacos similares aos inibidores endógenos da angiogênese como a Endostatina, Angiostatina, os Interferons, e as substâncias que bloqueiam a sinalização das células endoteliais via VEGF e seu receptor VEGFR: SU5416, SU6668, ZD6474, CP-547, CP-632, ZD4190, BAY 43-9006, SU11248, PTK787/ZK222584 e o rhuMAb VEGF (Bevacizumabe) (Rosen, 2000; Castro Junior, Puglisi *et al.*, 2006).

A utilização de inibidores da angiogênese não se restringe apenas ao tratamento das neoplasias. Muitos desses inibidores estão sendo utilizados no tratamento de doenças decorrentes da angiogênese excessiva e da neovascularização, tais como psoríase, artrite reumatóide, doença de Crohn, neovascularização de coróide, retinopatia diabética, etc (Carmeliet e Jain, 2000; Cao, 2001).

Lai e colaboradores (2001) demonstraram que a injeção subretiniana contendo adeno vírus, o qual expressa angiostatina, reduz significativamente a neovascularização da coróide sem induzir a apoptose ou inflamação no local da aplicação.

Krzystolik e colaboradores (2002) relataram que a utilização de injeção intravitreal de fragmento do anticorpo anti-VEGF (rhu-FAB) preveniu a neovascularização de coróide em modelo experimental em macacos.

2.4.1 Bevacizumabe

O bevacizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado, produzido por tecnologia de DNA recombinante em um sistema de expressão em célula de mamífero, de ovário de Hamster Chinês, em um meio nutriente contendo o antibiótico gentamicina e é purificado por um processo que inclui a inativação viral específica e etapas de remoção. Esse anticorpo é constituído por 214 aminoácidos e tem um massa molecular de aproximadamente 149kDa (Food & Drug Administration, 2004).

O bevacizumabe foi aprovado pelo FDA em fevereiro de 2004 e em janeiro de 2005 pela EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products). Em estudo de fase III, envolvendo casos de câncer colorretal metastatizado, os resultados foram promissores: a quimioterapia de primeira linha (irinotecan, 5-fluorouracil e leucovorin) associada ao bevacizumabe mostrou ser capaz de prolongar significativamente o tempo de progressão dos tumores e aumentar a sobrevida do paciente, em comparação com a quimioterapia sem associações (Hurwitz, Fehrenbacher *et al.*, 2004).

A adição de bevacizumabe à carboplatina e ao paclitaxel aumentou significativamente a sobrevida de pacientes com câncer metastático do pulmão (Johnson, Fehrenbacher *et al.*, 2004; Ferrara, Hillan *et al.*, 2005).

O bevacizumabe liga-se ao VEGF, inibindo desta forma sua ligação aos seus receptores, Flt-1 (VEGFR-1), KDR (VEGFR-2) e Flt-4 (VEGFR-3) na superfície das células endoteliais. A neutralização da atividade biológica do VEGF diminui a vascularização, o que, no caso de tumores, causa a diminuição ou supressão do crescimento (Rodrigues, Farah *et al.*, 2009).

Além da aplicação do bevacizumabe no tratamento de vários tipos de câncer, devido ao seu efeito inibidor da angiogênese, o fármaco vem sendo utilizado também em doenças degenerativas oftalmológicas decorrentes da angiogênese excessiva, tais como a Neovascularização Coroidal (CNV, *choroidal neovascularization*), a Retinopatia Diabética Proliferativa e a Degeneração Macular Relacionada à Idade (Pandya, Dhalla *et al.*, 2006). Tanto o bevacizumabe como o seu derivado, o ranibizumabe, têm sido empregados no tratamento de tais doenças por meio de injeções intravítreas (Rosenfeld, Moshfeghi *et al.*, 2005; Bashshur, Bazarbachi *et al.*, 2006; Rodrigues, Farah *et al.*, 2009).

A meia-vida biológica do bevacizumabe, quando administrado por via endovenosa é cerca de 12-14 dias. Entretanto, a meia vida do fármaco no corpo vítreo ainda não foi determinada (Bakri, Cameron *et al.*, 2006). A frequência das administrações intravítreas de bevacizumabe para o tratamento de doenças do segmento posterior do olho também não foi adequadamente estabelecida (Oshima, Sakaguchi *et al.*, 2006).

Estudos anteriores mostraram a correlação existente entre a neovascularização que ocorre durante as doenças oftálmicas, e a presença de isquemia ocular, que estimula de maneira contínua a produção de VEGF, molécula-chave no desenvolvimento da neovascularização (Adamis, Miller *et al.*, 1994; Aiello, Avery *et al.*, 1994; Carmeliet e Jain, 2000).

2.5 Tratamento da PDR e da AMD com bevacizumabe

Nguyen e colaboradores (2001) demonstraram que a utilização sistêmica de bevacizumabe suprimiu a CNV decorrente de miopia em dois pacientes que até então mostraram-se refratários quando submetidos a outros tratamentos.

Rosenfeld e colaboradores (2005) mostraram que, para o tratamento da AMD, a aplicação intravítreal de bevacizumabe restabeleceu a acuidade visual e a aparência normal do contorno da mácula em quatro semanas. Além disso, o custo da aplicação intravítreal é significativamente menor: para a aplicação intravítreal de bevacizumabe a dose é cerca de quatrocentas vezes menor do que a dose utilizada por via endovenosa.

Bakri e colaboradores (2006) demonstraram que a aplicação intravítreal de bevacizumabe em coelhos não causou atrofia celular nem evidências histológicas de toxicidade para a retina ou para o nervo óptico.

Avery e colaboradores (2006) utilizaram o bevacizumabe por meio de injeção intravítreal (1,25 mg) em pacientes com AMD e verificaram que houve diminuição significativa do edema da retina, do fluido subretiniano e do descolamento do epitélio pigmentar da retina (EPR).

A neovascularização da íris (INV) e o subsequente desenvolvimento de glaucoma neovascular são sérias consequências para pacientes com PDR (Oshima, Sakaguchi *et al.*, 2006). Oshima e colaboradores (2006), e Grisanti e colaboradores (2006), demonstraram que a aplicação intravítreal de bevacizumabe induz a regressão da INV em pacientes com PDR.

2.6 Limitações no tratamento das doenças que acometem o segmento posterior do olho

Como dito anteriormente, as doenças do segmento posterior do bulbo do olho são responsáveis pela maioria dos casos de cegueira irreversível no mundo inteiro. A eficácia do tratamento depende, basicamente, do sucesso no transporte de doses efetivas de agentes farmacológicos diretamente para os locais a serem tratados (Geroski e Edelhauser, 2001).

A baixa penetração dos fármacos no interior do olho limita o número de medicamentos indicados para uso em oftalmologia e exige cuidado com aqueles disponíveis devido a possíveis ocorrências de efeitos adversos. A administração de fármacos para o tratamento de doenças oculares deve ser feita, preferencialmente, por meio de vias que atinjam o tecido local, visando reduzir a ocorrência de efeitos indesejáveis e a absorção sistêmica (Ogura, 2001). O tratamento de doenças do segmento posterior do olho é limitado devido à dificuldade de acesso aos tecidos dessa região; a obtenção de níveis terapêuticos desejáveis, por meio das vias convencionais de administração, é praticamente impossível. A barreira hemato-ocular atua como um mecanismo protetor contra substâncias exógenas, que incluem os fármacos.

A administração de uma preparação pela via ocular tópica, por meio de colírios, é a mais utilizada em oftalmologia, principalmente quando a doença acomete o segmento anterior do olho. Esta via apresenta maior facilidade de aplicação e comodidade para o paciente (Urtti e Salminen, 1993). Entretanto, para o tratamento das doenças que atingem os tecidos intraoculares, as preparações tópicas são ineficazes, devido a fatores biológicos que protegem o olho e, conseqüentemente, limitam a entrada dos fármacos (Davies, 2000). Tais fatores incluem a impermeabilidade relativa do epitélio da córnea, a dinâmica lacrimal, a drenagem nasolacrimal e a eficiente barreira hemato-ocular (Ding, 1998). Estima-se que menos de 5% da dose administrada pela via tópica

é absorvida e atinge os tecidos intraoculares, o que inviabiliza a utilização desta via no tratamento de doenças do segmento posterior do olho.

A via periocular é utilizada no tratamento de doenças do segmento posterior do olho por meio das injeções subconjuntival e, principalmente, da subtenoniana (Fialho, Rego *et al.*, 2003). A esclera constitui o tecido de entrada 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, facilitar a administração de fármacos por meio de injeções perioculares (Ambati, Canakis *et al.*, 2000). Os principais riscos relacionados a esta via incluem a perfuração do bulbo do olho, a fibrose dos músculos extra-oculares e a possível ocorrência de endoftalmite (Smith, George *et al.*, 2002; Gupta, Boynton *et al.*, 2003).

Os fármacos administrados pela via sistêmica atingem o segmento posterior do olho por meio da circulação sanguínea e encontram um obstáculo anatômico importante para o tratamento de doenças oculares, a barreira hemato-ocular, compreendida pelas barreiras hemato-aquosa e hematorretiniana. Por esta razão, a utilização desta via na terapêutica ocular requer, geralmente, a administração de doses elevadas visando a manutenção de níveis terapêuticos intravítreos adequados por períodos prolongados, o que pode levar a sérios efeitos adversos, contribuindo assim para a não adesão do paciente ao tratamento (Cunha-Vaz, 2004).

Visando a manutenção de níveis terapêuticos adequados no segmento posterior do olho, em particular, no corpo vítreo, na retina e na coróide, a via intraocular tem sido a de escolha para o tratamento de diferentes doenças do olho. Utilizando essa via, pode ser evitada a ocorrência de efeitos adversos sistêmicos proporcionados por vias que não liberam o fármaco no local de ação. No entanto, devido a uma rápida eliminação, para que se obtenha uma terapia eficaz, são necessárias múltiplas injeções intraoculares de forma a manter a concentração do princípio ativo dentro da faixa terapêutica, no local onde se desenvolve a doença, e durante um período suficiente, sendo necessárias, para isso, múltiplas injeções. As injeções intraoculares repetidas

podem causar sérias complicações, tais como hemorragia intraocular, descolamento de retina, endoftalmite e catarata (Geroski e Edelhauser, 2001; Yasukawa, Ogura *et al.*, 2004), além de proporcionar um enorme desconforto ao paciente.

Devido a todas as dificuldades encontradas, pesquisas têm sido realizadas no sentido de desenvolver sistemas de administração intraoculares que permitam liberar concentrações terapêuticas dos fármacos por um período prolongado. Tais sistemas podem proporcionar inúmeras vantagens, como aumentar a biodisponibilidade do fármaco, no sentido de obter uma liberação constante e prolongada; aumentar a concentração local, sem a ocorrência de efeitos adversos sistêmicos; atingir especificamente um tipo de tecido; e reduzir a frequência de injeções intraoculares. Tais vantagens podem reduzir as complicações observadas com a utilização das injeções intraoculares (Behar-Cohen, 2002), além de aumentar o conforto do paciente, garantindo assim uma melhor adesão ao tratamento.

Diferentes sistemas de transporte de fármacos têm sido desenvolvidos com as finalidades acima descritas. Esses sistemas são representados, principalmente, pelas micro e nanopartículas; pelos lipossomas, que são compostos por lípides e emulsionantes; pela iontoforese, que se baseia na aplicação de corrente elétrica; e pelos implantes, sendo eles compostos por diferentes polímeros, biodegradáveis ou não (Fialho e Silva-Cunha, 2007).

2.7 Sistemas de liberação controlada de fármacos

Após a administração de uma forma farmacêutica sólida (FFS), o fármaco deve ser liberado e dissolver-se nos fluidos biológicos para que exerça a ação farmacológica esperada. As FFS podem ser classificadas, de acordo com o tipo de liberação do fármaco, em produtos com liberação convencional ou modificada.

As FFS com liberação convencional (ou pronta liberação ou liberação imediata) são desenvolvidas para liberar o fármaco rapidamente após a administração, sendo empregados nesses sistemas diluentes solúveis, desintegrantes e/ou outros recursos que favorecem os processos de liberação e dissolução do fármaco. Em contrapartida, as FFS de liberação modificada são concebidas para modularem a liberação do fármaco, retardando ou prolongando a sua dissolução. Os objetivos podem ser: tornar a FF gastrorresistente (no caso de formas farmacêuticas sólidas orais), prolongar o efeito farmacológico, liberar o fármaco em um sítio específico do organismo ou após um período definido de tempo (cronoterapia).

Os termos liberação prolongada, lenta ou sustentada são aplicados às formas farmacêuticas (FF) desenvolvidas para liberarem o fármaco gradualmente, mantendo a concentração no local de ação dentro de níveis terapêuticos, por período de tempo prolongado. Essas FF requerem administrações menos frequentes se comparadas às convencionais, aumentando a adesão do paciente ao tratamento.

Diversas tecnologias podem ser empregadas para promover a liberação gradual de um fármaco veiculado em uma FFS e a possibilidade de utilização das mesmas em sistemas monolíticos (matriciais) ou multiparticulados (sistemas do tipo reservatório) aumenta a sua versatilidade.

Os materiais poliméricos desempenham um papel importante na taxa de liberação, e os do tipo biodegradáveis, principalmente, têm sido extensamente investigados nas últimas décadas para aplicação em sistemas de liberação controlada destinados à via ocular. Esses materiais podem promover um aumento da biodisponibilidade e uma redução de efeitos adversos, desde que a biocompatibilidade do polímero no olho, que é um fator imprescindível para a aplicação clínica, seja avaliada (Fialho, Rego *et al.*, 2003).

2.7.1 Implantes poliméricos

Implantes preparados a partir de sistemas poliméricos podem ser aplicados em diferentes regiões do olho. Ordenando-se as regiões da mais superficial à mais profunda, temos: região subconjuntival, região subtenoniana, esclera e o interior do bulbo do olho (câmara anterior e corpo vítreo). Em geral, quanto mais profunda a região, mais delicado o procedimento e mais eficaz a concentração do fármaco no vítreo e na retina (Athanasίου, Niederauer *et al.*, 1996; Kimura e Ogura, 2001).

Os implantes intravítreos evitam o problema de redução da transparência do meio ocular, observado com a utilização de outros tipos de sistemas aplicados na forma de dispersão, e têm sido investigados para o tratamento de diferentes doenças intraoculares.

Como o sistema de liberação de fármacos na forma de implante deve ser biocompatível com o organismo, os componentes nele presentes devem ser hipoalergênicos, não-carcinogênicos, mecanicamente estáveis e não devem causar resposta inflamatória local de aplicação. Além disso, as características químicas e físicas do material não devem ser modificadas pelo tecido local (Athanasίου, Niederauer *et al.*, 1996).

Os implantes poliméricos podem ser de dois tipos: matriciais (ou monolíticos) e reservatórios (Dash e Cudworthii, 1998; Kimura e Ogura, 2001), e podem ser preparados a partir de diferentes polímeros, os quais podem ser biodegradáveis ou não (Dash e Cudworthii, 1998).

No sistema matricial, o fármaco se encontra homogeneamente disperso na matriz polimérica ou adsorvido na superfície, e a sua liberação ocorre por difusão pelos poros da matriz, por degradação do polímero ou por uma combinação dos dois mecanismos. Caso a velocidade de degradação do polímero seja inferior à difusão do fármaco pela matriz, a liberação inicial do mesmo é dependente de sua difusão pelo sistema,

podendo diferir se ele estiver dissolvido molecularmente ou disperso no polímero. Quando se utilizam polímeros não-biodegradáveis, a liberação ocorre apenas por um processo de difusão lenta pela matriz.

No sistema do tipo reservatório, o fármaco encontra-se em uma cavidade central envolta por uma membrana polimérica, a qual controla sua taxa de liberação. Mudanças na natureza e espessura dessa membrana promovem alterações na velocidade de liberação dos fármacos. Da mesma maneira que no sistema matricial, no sistema reservatório composto por polímeros não-biodegradáveis a liberação do fármaco ocorre apenas por difusão através da membrana.

2.7.1.1 Implantés poliméricos biodegradáveis e não-biodegradáveis

Sistemas compostos por polímeros não-biodegradáveis, principalmente, os derivados de celulose, silicones, polímeros acrílicos, polivinilpirrolidona e copolímeros dos óxidos de etileno e propileno, embora apresentem uma taxa de liberação relativamente constante, precisam, geralmente, ser removidos posteriormente, o que requer processos cirúrgicos. Já os biodegradáveis apresentam vantagens sobre os anteriores, pois são totalmente absorvidos pelo organismo, não necessitando de uma remoção posterior (Kimura e Ogura, 2001), o que proporciona melhor aceitação e adesão do paciente ao tratamento. Entretanto, a preparação de sistemas biodegradáveis requer o controle de um grande número de variáveis, já que a cinética de degradação do polímero *in vivo* deve permanecer constante para que seja obtida uma liberação controlada do fármaco (Dash e Cudworthii, 1998). Entre os polímeros classificados como biodegradáveis, encontram-se os poliuretanos.

Para que os sistemas poliméricos biodegradáveis sejam eliminados do organismo, três principais mecanismos de degradação são descritos (Merkli, Tabatabay *et al.*, 1998):

- **erosão simples:** este mecanismo está relacionado aos polímeros solúveis em água e que se tornaram insolúveis devido a uma reação química de "crosslinking". Desta forma, pode-se dizer que eles são insolúveis em água, mas apresentam uma matriz fortemente hidrofílica. Estes polímeros, portanto, não são adequados para a veiculação de substâncias hidrossolúveis e de baixa massa molar, pois elas se difundem pela rede polimérica, independente da velocidade de degradação matricial. Entre os principais polímeros desta categoria, destacam-se a gelatina, o colágeno e o álcool polivinílico.

- **erosão sem clivagem:** mecanismo que ocorre com os polímeros que se tornam hidrossolúveis após reações de hidrólise ou ionização sem alterações significativas na sua massa molar. Por apresentarem dificuldade de eliminação, tais polímeros não podem ser empregados na forma de implantes. O Eudragit[®] (copolímero do éter metil vinílico e do anidrido maleico) é um exemplo de polímero que sofre este tipo de erosão.

- **erosão/clivagem:** neste mecanismo, os polímeros são transformados em pequenas e solúveis moléculas pela clivagem de suas cadeias. Durante este processo de degradação eles permitem a liberação da substância ativa. Este mecanismo é o que está relacionado à definição de biodegradável. Os principais polímeros que sofrem este mecanismo de erosão são os poliésteres (poli(ϵ -caprolactona)), polímeros e copolímeros derivados dos ácidos lático e glicólico, as poliamidas, os poliaminoácidos, os polialquilcianacrilatos, os polioctoésteres e os poliuretanos.

2.8 Poliuretanos

Os poliuretanos são produzidos pela reação de policondensação de um isocianato (di ou polifuncional) com um diol (ou polioliol). Durante a síntese, também podem ser utilizados outros tipos de reagentes, tais como: agentes de cura, extensores de cadeia, catalisadores, surfactantes, cargas, etc (Oliveira, 2008).

A estrutura da cadeia principal do poliuretano é composta de segmentos alifáticos ou aromáticos unidos por grupos uretanos polares (Figura 8).

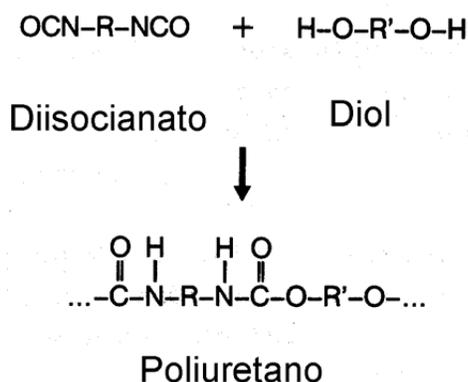


Figura 8 - Reação de formação do uretano

Onde R é um radical alifático, aromático ou alicíclico derivado do monômero isocianato e R' é um grupo derivado do polioliol. A ligação uretânica (-NH-COO-) é formada como resultado da reação entre um grupo isocianato (-NCO) do diisocianato e um grupo hidroxila (-OH) do polioliol (Ayres, 2006).

Os polióis utilizados na síntese de poliuretanos podem ser poliéteres, poliésteres, polibutadienos, ou produtos naturais, como o óleo de mamona. Os isocianatos podem ser aromáticos ou alifáticos (Ayres, 2006). Desta forma, a utilização de reagentes variados na síntese permite a obtenção de poliuretanos com diferentes propriedades físicas e químicas, o que explica a versatilidade dos poliuretanos para as mais diversas aplicações, como espumas, revestimentos, resinas, além do seu crescente uso nas pesquisas de desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada de fármacos.

A decisão entre a escolha de um poliéster (como a poli(ε-caprolactona)) ou poliéter (como o poli(etilenoglicol)) está intimamente relacionada com a finalidade a qual se destina o poliuretano. De uma maneira generalizada, pode-se dizer que, comparado com poliéteres, os segmentos nos poliésteres ficam mais fortemente ligados através

dos grupamentos NCO. A presença de uma estrutura de ligação mais polar leva à formação de um polímero mais coeso com melhores propriedades mecânicas à temperatura ambiente. Esse efeito também pode ser atribuído a maior tendência à cristalização dos poliuretanos à base de poliésteres. Além disso, pode-se dizer que poliéteres são mais resistentes à hidrólise do que poliésteres. No caso de polímeros biodegradáveis, a instabilidade hidrolítica das ligações éster é fundamental (Ayres, 2006). A Figura 9 mostra alguns polióis comumente empregados para a síntese de poliuretanos.

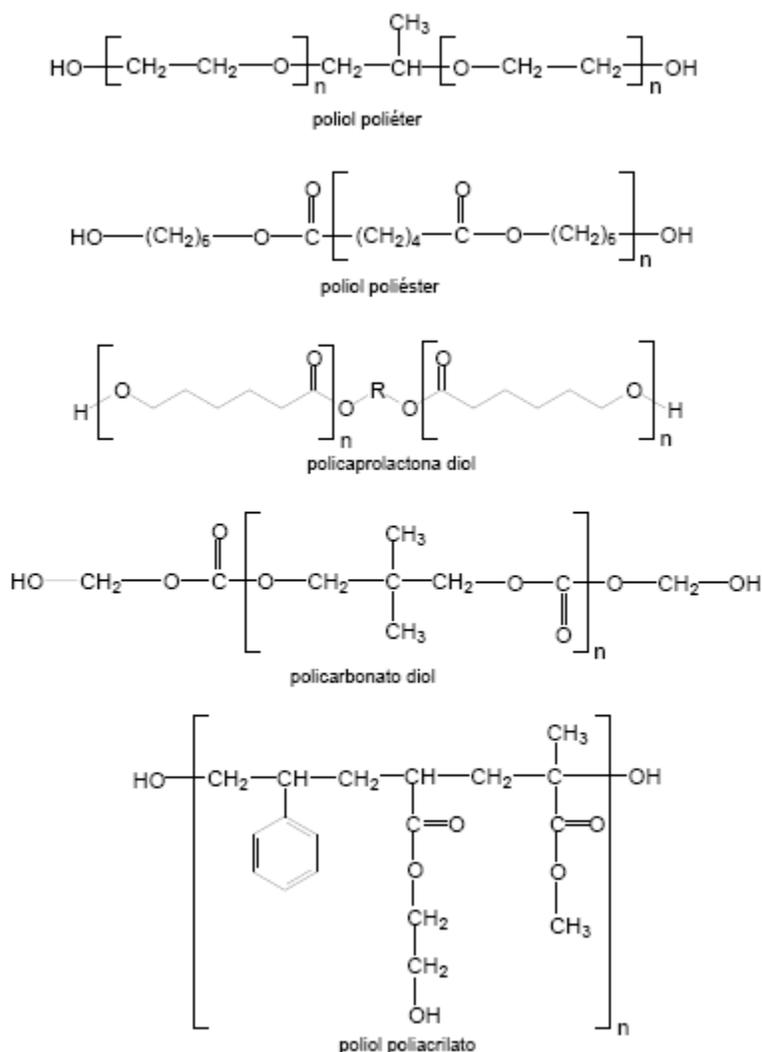


Figura 9 - Estruturas de alguns polióis utilizados na síntese de poliuretanos

A decisão entre usar um isocianato aromático ou alifático também vai depender da aplicação a que se destina o poliuretano a ser preparado. De uma maneira geral, os isocianatos alifáticos dão origem a poliuretanos mais flexíveis e resistentes às intempéries. Os isocianatos aromáticos formam poliuretanos mais viscosos. Isso, muitas vezes, dificulta a preparação de poliuretanos isentos de solventes. Os monômeros alifáticos mais usados são o hexametileno diisocianato (HDI), o isoforona diisocianato (IPDI) e o 4,4'-diciclohexilmetano diisocianato (H12MDI) cujas estruturas químicas encontram-se na figura 10 (Ayres, 2006).

As propriedades básicas de um poliuretano, isto é, se ele é borrachoso (com características da borracha, ou seja, baixa Tg e capaz de grandes deformações), resinoso (com características de um plástico convencional) ou cristalino à temperatura ambiente, são determinadas, entre outros fatores, pela estrutura de cadeia tanto do diol como do diisocianato.

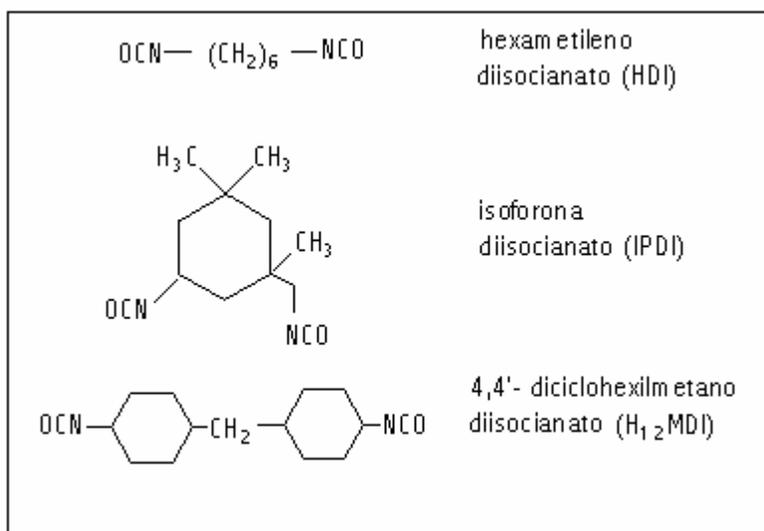


Figura 10 - Estruturas de alguns diisocianatos alifáticos

Os isocianatos são compostos altamente reativos, pois possuem o grupo NCO com ligações duplas que reagem prontamente com hidrogênios reativos, gerando produtos de adição. As principais reações dos isocianatos estão esquematizadas na Figura 11.

Os isocianatos reagem com hidroxilas para formar uretanos (a), e com aminas para formar uréias (b). Os isocianatos também reagem com a água formando, inicialmente, um ácido carbâmico instável, o qual decompõe gerando amina (c). A amina é um reagente nucleofílico que reage com o isocianato, gerando uréias (d). Outros produtos, tais como o biureto (e) e o alofanato (f) podem ser gerados a partir das reações dos isocianatos. Além disso, reações secundárias também podem acontecer, em menor escala, levando à formação de anéis uretidiona (g), isocianurato (h), amida (i) e carbodiimida (j) (Chattopadhyay, Sreedhar *et al.*, 2006). Estas reações secundárias podem acontecer durante a síntese e estocagem e são inconvenientes na formação dos poliuretanos.

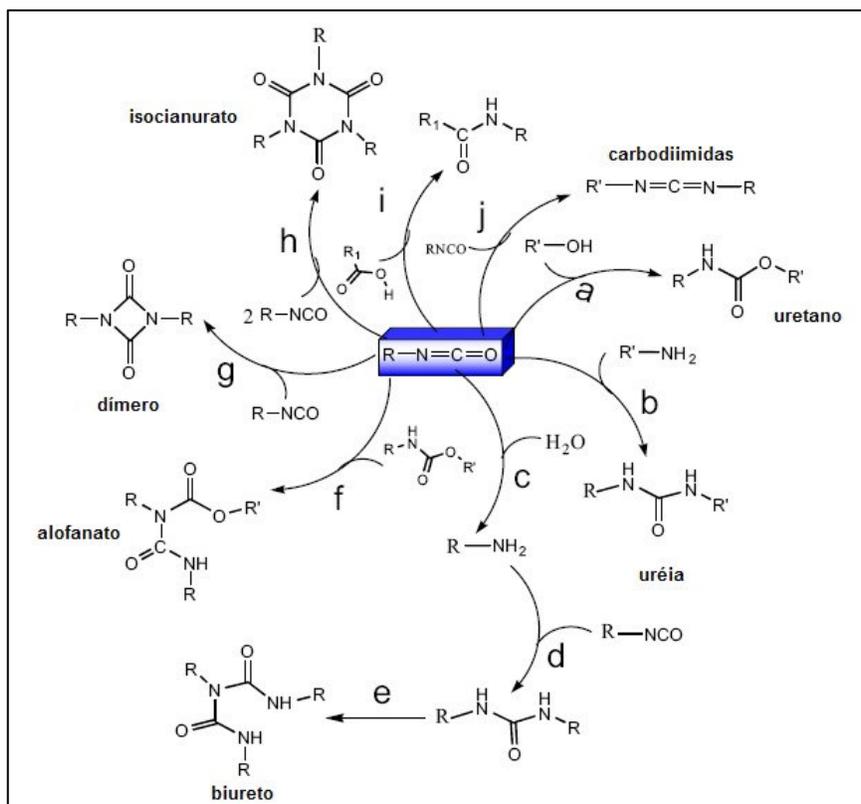


Figura 11 - Reações de isocianatos

Normalmente, na síntese dos poliuretanos é utilizado excesso de diisocianato, o que permite a obtenção de um pré-polímero com grupos isocianato (-NCO) terminais, que ficam disponíveis para futuras reações. São estas terminações isocianato que

permitem o processo denominado extensão de cadeia, no qual o pré-polímero terminado em $-NCO$ reage com um diol de baixa massa molar para formar ligações uretano ou com aminas para formar ligações uréia. Neste caso, será produzido um poli(uretano-uréia) que é mais rígido que o homopoliuretano similar (Delpech e Coutinho, 2000). A Figura 12 mostra alguns agentes extensores de cadeia comumente utilizados.

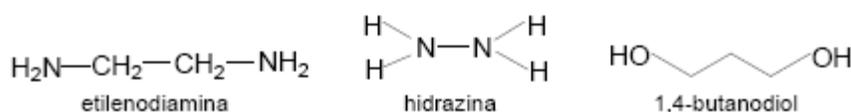


Figura 12 - Estrutura de alguns extensores de cadeia comumente utilizados na síntese de poliuretanos

Poliuretanos segmentados podem ser descritos como copolímeros em bloco lineares do tipo $(AB)_n$. Um bloco do polímero consiste do diol poliéster ou poliéter flexível de cadeia longa. Esse bloco é usualmente chamado de segmento macio ou segmento flexível, pois incorpora o caráter elastomérico ao polímero. O segundo bloco do copolímero é o segmento rígido, formado pela reação de diisocianatos com extensores de cadeia, ou seja, com dióis ou trióis de baixa massa molar ou diaminas, dando origem a ligações uretano ou uréia que são altamente polares e promovem a coesão do polímero. Os dois tipos de segmentos tendem a uma micro-separação de fases de maneira a formar micro-domínios (Figura 13). Geralmente, a segregação é mais pronunciada com poliéteres que com poliésteres porque a estrutura do éter é menos polar e interage menos com os segmentos mais polares de uretano e uréia (Crawford, Bass *et al.*, 1998).



Figura 13 - Estrutura segmentada dos poliuretanos

Para que os poliuretanos possam ser utilizados futuramente em aplicações intraoculares, é fundamental que, além de biodegradáveis, também sejam biocompatíveis. A biocompatibilidade *in vitro* do poliuretano utilizado neste trabalho foi estudada por Da Silva e colaboradores, que observaram que houve adesão e proliferação de células humanas ARPE-19 (células epiteliais pigmentares da retina) na superfície do polímero. A biocompatibilidade *in vivo* também foi avaliada. O poliuretano foi inserido no espaço subretiniano e no corpo vítreo de olhos de ratos, e o polímero foi bem tolerado, uma vez que não houve sinais de inflamação. Além disso, a arquitetura da retina e a cavidade vítrea mantiveram-se íntegras, mostrando assim a excelente biocompatibilidade dos poliuretanos (Da Silva, 2009).

2.8.1 Dispersões aquosas de poliuretanos

Geralmente, a síntese dos poliuretanos é feita com o uso de solventes orgânicos (Oliveira, 2008). Porém, a preocupação crescente com o meio ambiente tem levado ao desenvolvimento de novos produtos com baixa quantidade ou isentos de solventes orgânicos, que são substituídos por água. Isso é altamente desejável para a aplicação de polímeros como biomateriais, uma vez que resíduos de solventes que permanecem no polímero após seu processamento podem danificar células e tecidos vizinhos (Spaans, Belgraver *et al.*, 2000), além de limitar os agentes farmacologicamente ativos que podem ser incorporados à matriz polimérica, uma vez que os solventes orgânicos poderiam ocasionar a desnaturação dos fármacos que possuem estrutura protéica, como é o caso do bevacizumabe.

Uma dispersão aquosa de poliuretano (PUD) é um sistema binário coloidal, no qual as partículas de poliuretano estão dispersas em água. Entretanto, usualmente os poliuretanos não são solúveis em água, e para que a dispersão aquosa possa ser formada é necessário o auxílio de um emulsificante externo. Outra possibilidade é a

introdução de grupos promotores de emulsificação na cadeia do poliuretano, que podem ser segmentos não iônicos de poliéter ou grupos iônicos. Poliuretanos que contém grupos iônicos são chamados ionômeros e o processo para obtê-los é denominado processo do pré-polímero. Para introduzir os grupos iônicos, chamados de emulsificantes internos, é utilizado um composto com as funções álcool e ácido, tal como o ácido dimetilolpropiônico (Figura14). Após sua adição, o emulsificante interno deve ser neutralizado com compostos básicos, e para isso geralmente é utilizada uma amina terciária (Delpech e Coutinho, 2000).

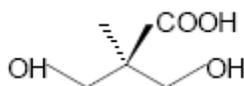


Figura 14 - Ácido dimetilol propiônico (DMPA)

No processo do pré-polímero para obtenção das dispersões aquosas de poliuretano, além da dispersão do pré-polímero em água, deve ser feita também a extensão de cadeia para zerar as terminações –NCO da cadeia do polímero. Essa extensão de cadeia geralmente é feita após a dispersão do pré-polímero em água, pois de outro modo o pré-polímero de alta viscosidade resultante não poderia ser disperso. Portanto, o pré-polímero com grupos isocianato terminais são dispersos em água com o auxílio do emulsificante interno e subsequentemente reagem com aminas ou dióis de baixa massa molar (Oliveira, 2008), terminando assim o processo de síntese da dispersão.

Para a obtenção dos filmes poliméricos, a dispersão aquosa é colocada em moldes para secagem e os filmes são obtidos por coalescência durante a evaporação de água.

3 JUSTIFICATIVA

A AMD tem sido a maior causa indolor da perda da visão central e a principal causa de cegueira em pessoas acima de 50 anos. A PDR afeta cerca da metade dos pacientes diabéticos. Essas doenças são decorrentes da neovascularização e afetam o segmento posterior do olho. A administração intravítrea de fármacos é um dos caminhos mais eficientes para o tratamento das doenças do segmento posterior do olho, mas geralmente os fármacos administrados são eliminados rapidamente pela vascularização local, dificultando o tratamento e exigindo esquemas posológicos de administrações frequentes. O bevacizumabe, um anticorpo monoclonal anti-VEGF, antiangiogênico, tem sido utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer. Devido ao seu efeito inibidor da angiogênese, tem sido utilizado paralelamente para tratamento da AMD e da PDR. Assim, o desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada para o bevacizumabe, com o intuito de minimizar ou suprimir os efeitos adversos, aumentar o tempo de residência do fármaco no segmento posterior do olho e, conseqüentemente, diminuir a freqüência de administração do fármaco parece ser de óbvia relevância, pois pode representar um caminho importante para a terapia dessas doenças crônicas do segmento posterior do olho. Entretanto, a estrutura protéica do bevacizumabe exige cuidados na escolha do material a ser utilizado como matriz. O poliuretano utilizado no presente trabalho parece ser adequado para tal finalidade, uma vez que a ausência de solventes orgânicos em seu processo de síntese não compromete a estrutura do fármaco. Além disso, trabalhos da literatura mostraram a excelente biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* desse polímero, demonstrando assim seu potencial promissor na área farmacêutica.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Este projeto tem como objetivo a veiculação do Bevacizumabe em uma matriz polimérica biodegradável constituída de poliuretano visando o aumento do tempo de residência do fármaco no segmento posterior do olho.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Desenvolvimento dos sistemas;
- 2) Caracterização dos sistemas obtidos;
- 3) Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação do bevacizumabe;
- 4) Estudo de liberação *in vitro* do bevacizumabe.

5 PARTE EXPERIMENTAL

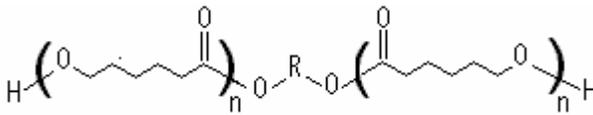
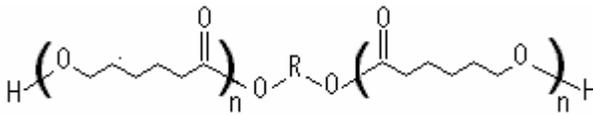
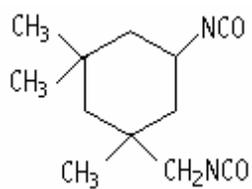
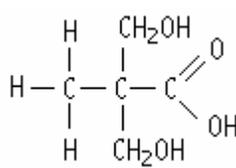
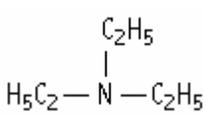
5.1 Material

Foram utilizados os seguintes materiais:

- Avastin[®] (25 mg/mL, ampola de 4 mL)
- Fosfato de sódio bibásico anidro – Synth, Brasil
- Fosfato de potássio monobásico anidro – Synth, Brasil
- Cloreto de sódio – Synth, Brasil
- Água ultra pura Milli-Q

Os reagentes utilizados na síntese da dispersão aquosa de poliuretano estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades e estrutura química dos reagentes utilizados na síntese da dispersão aquosa de poliuretano

<p>Policaprolactona diol (PCL 1000) Massa molar: 1000 g/mol Aspecto: pastoso Nome comercial: Tone™ Polyol 2221 Fornecedor: Union Carbide Corporation Função: diol utilizado na etapa de preparação do pré-polímero</p>	
<p>Policaprolactona diol (PCL 2000) Massa molar: 2000 g/mol Aspecto: sólido Nome comercial: Tone™ Polyol 0249 Fornecedor: Union Carbide Corporation Função: diol utilizado na etapa de preparação do pré-polímero</p>	
<p>Isoforona diisocianato (IPDI) Equivalente: 111,1 Aspecto: líquido transparente Nome comercial: Desmodur I Fornecedor: Bayer Função: diisocianato utilizado na etapa de preparação do pré-polímero</p>	
<p>Ácido dimetilol propiônico (DMPA) Equivalente grama: 67 (OH) e 134 (COOH) Aspecto: pó branco Fornecedor: Fluka Função: emulsificante interno utilizado na etapa de preparação do pré-polímero</p>	
<p>Dibutil dilaurato de estanho Massa molar: 631,55 g/mol Aspecto: líquido viscoso amarelado Nome comercial: Liocat 118 Fornecedor: Miracema Nuodex Função: catalisador utilizado na etapa de preparação do pré-polímero</p>	$(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{Sn}[\text{OOC}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3]_2$
<p>Trietilamina (TEA) Equivalente: 101 Pureza: 98% Aspecto: líquido transparente Fornecedor: Vetec Função: neutralizante utilizado na etapa de dispersão do pré-polímero em água</p>	
<p>Hidrazina (HZ) Equivalente: 16 Concentração: 64% (solução aquosa) Aspecto: solução transparente Fornecedor: Arch Química Brasil Ltda. Função: extensor de cadeia utilizado na etapa de dispersão do pré-polímero em água</p>	NH_2-NH_2

5.2 Métodos

5.2.1 Síntese da dispersão aquosa de poliuretano

A dispersão de poliuretano foi preparada pelo método convencional no qual, primeiramente, se produz um pré-polímero em cuja cadeia são inseridos grupos hidrofílicos através do DMPA, que após neutralizados com TEA passam a agir como emulsificantes internos e possibilitam a dispersão do poliuretano em água. A reação de extensão de cadeia com diamina é feita imediatamente após a etapa de dispersão a fim de evitar a reação entre grupos NCO e água. Nessa etapa são produzidas ligações uréia que fazem parte dos segmentos rígidos do poliuretano (Ayres, 2006).

A Figura 15 mostra um esquema que representa a dispersão do poliuretano em água.

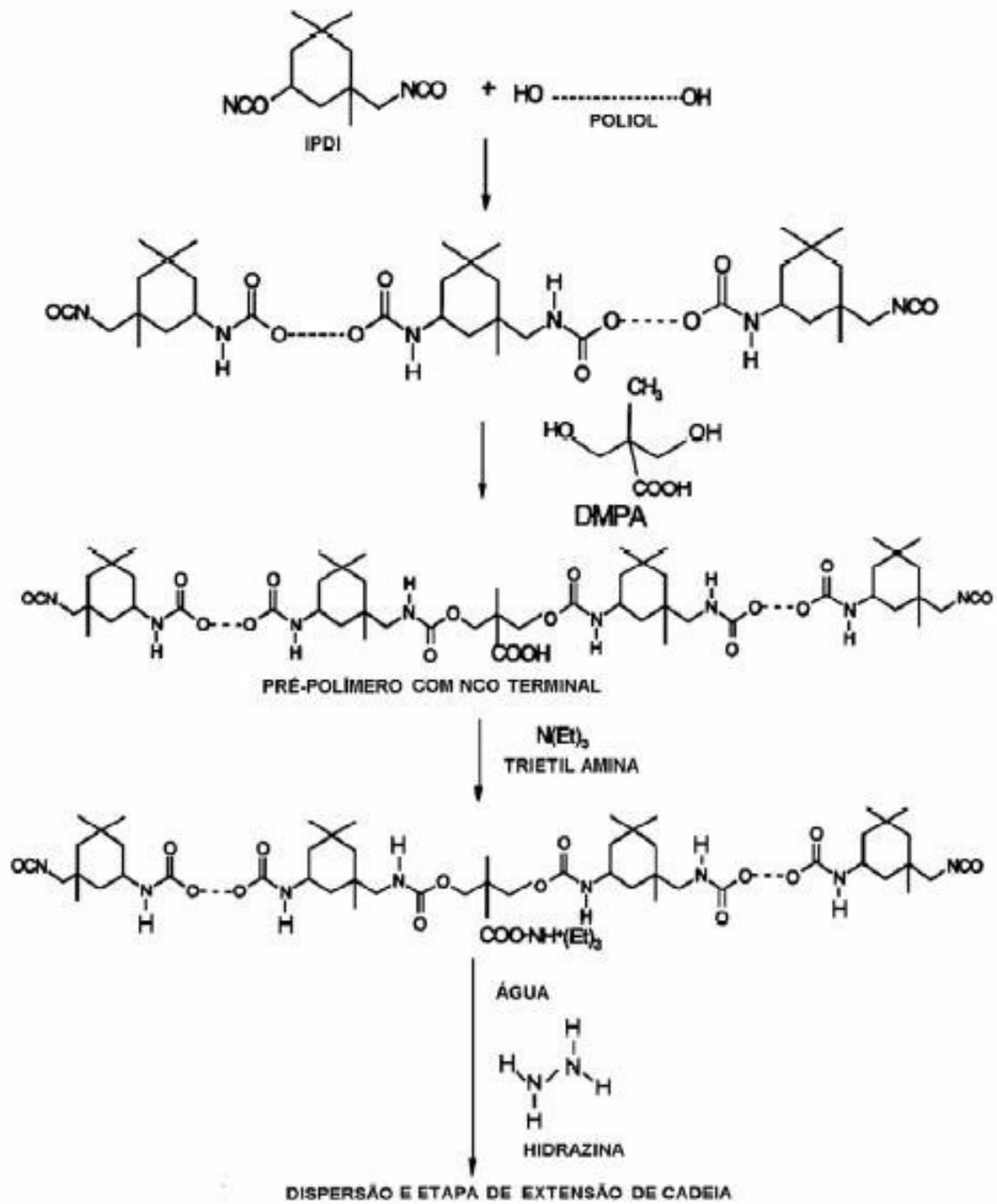


Figura 15 - Representação do esquema de dispersão do poliuretano em água

5.2.1.1 Preparação do pré-polímero

A síntese foi feita em um balão de 3 vias (Figura 16) sob agitação e atmosfera inerte de N_2 . Foram pesadas diretamente no balão as quantidades suficientes dos polióis. Sobre os mesmos foi adicionado o DMPA. Esses reagentes foram mantidos a uma temperatura de $60^\circ C$ por cerca de 30 minutos para que todo DMPA fosse dissolvido no meio. À mistura dos polióis foi adicionada quantidade calculada de IPDI para obtenção de uma razão $[NCO]/[OH]$ de 2,29. A temperatura foi mantida em $72-75^\circ C$ por 2 horas. Em seguida foi feita uma adição do catalisador dibutildilaurato de estanho correspondente a 0,01% em massa sobre a quantidade total de reagentes. A temperatura foi mantida em $72-75^\circ C$ por mais 1 hora e foi feita uma nova adição de catalisador idêntica à primeira. Novamente a temperatura foi mantida em $72-75^\circ C$ por 1 hora. Ao final desse tempo, a massa reacional foi resfriada à temperatura de $60-50^\circ C$ e foi retirada uma amostra para determinação titulométrica da porcentagem de NCO livre. O resultado deve ser o mais próximo possível da porcentagem teórica, calculada conforme a equação 1.

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

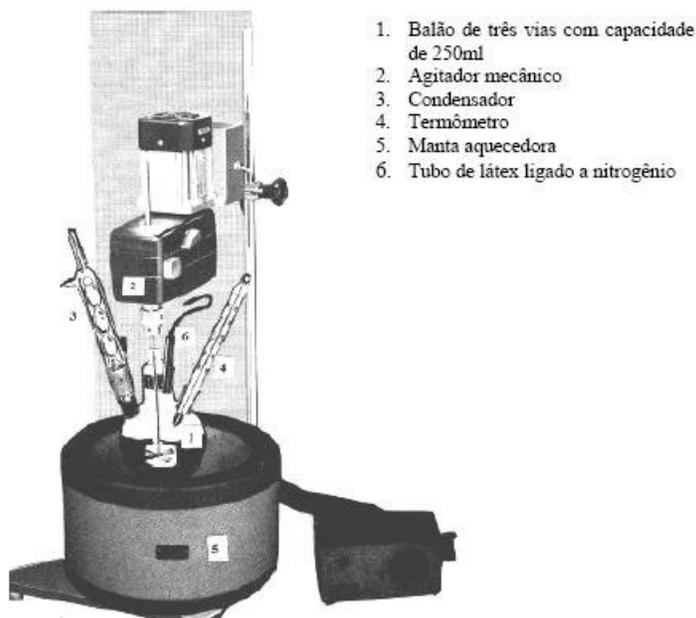
Onde:

$\% NCO_T$ = porcentagem teórica de grupos NCO livres.

n_{NCO} = número de equivalentes-gramas do diisocianato usado.

n_{OH} = somatório do número de equivalentes-gramas de todos os reagentes hidroxilados usados.

m_{pp} = massa total do pré-polímero.



1. Balão de três vias com capacidade de 250ml
2. Agitador mecânico
3. Condensador
4. Termômetro
5. Manta aquecedora
6. Tubo de látex ligado a nitrogênio

Figura 16 - Modelo de aparelhagem utilizada para reações de polimerização

Para realizar a titulação, foram colocados 50 mL da solução de di-n-butilamina* e pesou-se exatamente cerca de 10 g da amostra. A mistura foi agitada e aquecida até início da ebulição. Após resfriamento, foram adicionados 100 mL de metanol e 2 gotas de azul de bromofenol. O mesmo procedimento foi repetido para o ensaio em branco. A titulação foi realizada com ácido clorídrico (HCl) 1N. O ponto de viragem foi evidenciado pela mudança de coloração de azul para verde e depois para amarelo leitoso e a porcentagem de NCO livre foi calculada pela equação 2.

(2)

$V_{amostra}$ = volume em mL de HCl 1N consumido na titulação.

V_{branco} = volume em mL de HCl 1N consumido na titulação de di-n-butilamina pura (sem amostra).

f = fator de correção da concentração de HCl 1N especificado no frasco do reagente.

*Preparação da solução de di-n-butilamina: 206,8g de di-n-butilamina são dissolvidos em tolueno e completa-se o volume para 2 litros com tolueno.

5.2.1.2 Reação de extensão de cadeia

Imediatamente após a dispersão do pré-polímero em água foi realizada a reação de extensão de cadeia. Para essa finalidade foi utilizada hidrazina (HZ). A quantidade de extensor de cadeia é calculada de acordo com a porcentagem de grupos NCO livres encontrada por meio da titulação com n-dibutilamina. No caso da hidrazina, a quantidade foi calculada pela equação 3:

$$\text{-----} \tag{3}$$

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

m_{pp} = massa de pré-polímero.

NCO_p = % de NCO obtido na titulação conforme método descrito.

42 é o equivalente-grama do grupamento NCO.

A solução aquosa do extensor de cadeia foi adicionada lentamente e a temperatura foi controlada de forma que nunca ultrapassasse 40°C. A massa reacional foi mantida nessa temperatura por 1 hora. O aspecto final da dispersão aquosa de poliuretano é de um líquido branco que deve estar isento de qualquer tipo de depósito sólido.

5.2.2 Incorporação do bevacizumabe à dispersão aquosa de poliuretano e preparo dos implantes

Foram adicionados 12 mL de Avastin[®], correspondendo a 300 mg de bevacizumabe, em 4 mL da dispersão aquosa de poliuretano, com agitação branda, visando obter uma concentração de 12% (p/p) do fármaco. As dispersões aquosas de poliuretanos que continham bevacizumabe dissolvido foram transferidas para moldes de plástico e deixadas à temperatura ambiente por 7 dias. Também foram preparados filmes sem o fármaco. Após secagem, o aspecto final tanto dos filmes brancos quanto os que continham bevacizumabe era de um plástico transparente. Os filmes foram cortados no formato de quadrados de 3 x 3 mm de diâmetro (Figura 17).

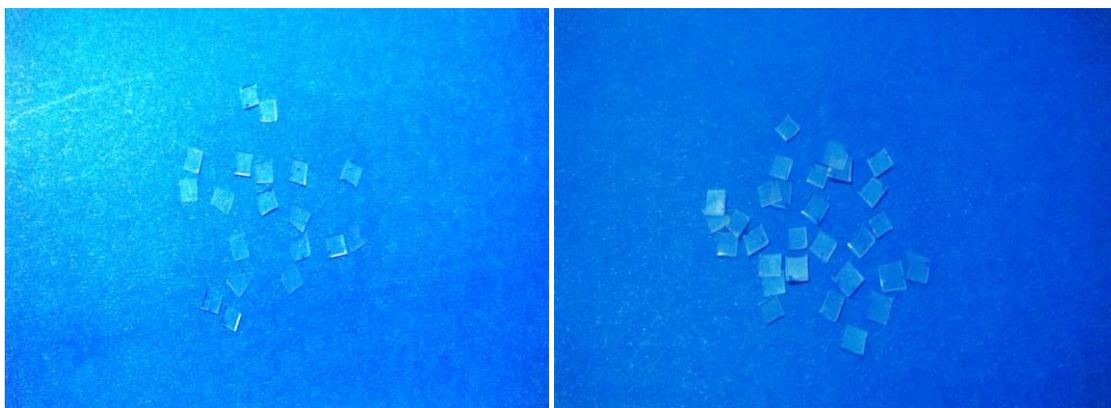


Figura 17 - Implantes brancos de poliuretano (esquerda) e poliuretano contendo bevacizumabe (direita)

5.2.3 Desenvolvimento e validação do método de análise do bevacizumabe por cromatografia líquida de alta eficiência

A maioria dos trabalhos na literatura utiliza ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para a quantificação do bevacizumabe. Neste trabalho foram propostos o desenvolvimento e validação de método analítico para doseamento do anticorpo utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), uma técnica mais simples e

mais barata para utilização em pesquisa. A validação foi feita de acordo com a RE 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Foi escolhida a cromatografia por exclusão de tamanho, uma vez que as técnicas mais utilizadas em CLAE (cromatografia em fase normal e reversa) utilizam solventes orgânicos para ajuste da polaridade da fase móvel, como acetonitrila, metanol, etc., o que causaria a desnaturação do fármaco.

Para a validação, foram utilizados espectrofotômetro Hewlett Packard® HP 8453 e cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters® (bomba Waters® 515 e auto-injetor Waters® 717 plus) acoplado a detector Waters® 486 UV-VIS. A coluna utilizada foi a BioSuite 250® HR SEC, de 7,8 mm de diâmetro e 300 mm de comprimento, com tamanho de partícula de 5 µm (Waters, EUA).

5.2.3.1 Desenvolvimento do método analítico

Primeiramente foi realizada uma varredura do fármaco em espectrofotômetro Hewlett Packard HP 8453. A amostra de bevacizumabe testada foi diluída em tampão PBS pH 7,4 até uma concentração final de 25 µg/mL, sendo a varredura programada em uma faixa entre 200 a 400 nm, com o objetivo de determinar o comprimento de absorvância máxima do fármaco.

O tampão PBS pH 7,4 utilizado como fase móvel foi preparado com 2,38 g de fosfato de sódio bibásico anidro, 0,19 g de fosfato de potássio monobásico anidro e 8,00 g de cloreto de sódio, diluídos em água purificada até um volume final de 1000 mL.

Visando redução de custo e de tempo de análise, foram avaliados três diferentes fluxos para a fase móvel (0,5, 0,8 e 1,0 mL/min).

5.2.3.2 Validação do método analítico

Todo método desenvolvido e não descrito em farmacopéia ou formulários oficiais deve ser validado, sendo avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, intervalo, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez (Brasil, Brasília, 2003).

5.2.3.2.1 Parâmetros avaliados

Linearidade

A preparação da curva de linearidade foi realizada a partir de 3 curvas autênticas, nas concentrações de 5 (limite inferior do intervalo), 10, 25, 50 e 75 (limite superior do intervalo) µg/mL de bevacizumabe. Para cada dia foi utilizada uma ampola diferente, totalizando três lotes do medicamento. Todas as amostras foram diluídas em tampão PBS até a concentração final desejada, filtradas em membrana 0,45 µm de poro (Durapore, Millipore®) e injetadas em triplicata no cromatógrafo, registrando-se os valores das áreas. Os resultados foram tratados estatisticamente pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a regressão linear. Ainda como resultado da avaliação da linearidade do método, foram calculados os limites de detecção e de quantificação, por meio da divisão entre o desvio padrão dos coeficientes lineares das três curvas de calibração do ensaio de linearidade pela média dos coeficientes angulares das curvas, multiplicados por 3,0 e 10,0, respectivamente (Equações 4 e 5).

$$\text{---} \tag{4}$$

$$\text{---} \tag{5}$$

Em que LD é o limite de detecção, LQ é o limite de quantificação, DP é o desvio padrão do intercepto médio das três curvas de linearidade e b é o coeficiente angular da curva média.

Robustez

Para o estudo da robustez foram avaliadas as variações de fluxo no intervalo de 0,99 a 1,01 mL/min e de pH da fase móvel no intervalo de 7,0 a 7,8. A análise foi feita avaliando-se as variações nas concentrações encontradas para uma amostra de 50 µg/mL.

Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis: precisão intra-corrída (repetitividade) e precisão inter-corrídas (precisão intermediária). Para a repetitividade, cinco concentrações diferentes (5, 10, 25, 50 e 75 µg/mL) foram injetadas em triplicata, totalizando 15 determinações, sendo o resultado da análise expresso em termos de desvio padrão relativo (DPR). A precisão intermediária foi avaliada do mesmo modo, porém as análises foram realizadas em três dias diferentes, totalizando 45 determinações.

Exatidão

A exatidão foi determinada preparando-se as amostras até obtenção de quatro concentrações utilizadas para a construção da curva de linearidade, considerando-se que o método é exato quando há proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro. Foi utilizada a concentração declarada nas ampolas de Avastin[®] como referência.

Especificidade

A especificidade do método foi testada analisando-se uma amostra branca de poliuretano em tampão PBS contendo 60 mg/mL de D-(+)-trealose e 0,04% de Tween 20 (constituintes da ampola de Avastin[®] nas concentrações mencionadas). Tal amostra foi mantida em incubadora a 37 °C e rotação de 30 r.p.m.

Estabilidade

Foi feita uma avaliação preliminar da estabilidade do fármaco nas condições utilizadas para o teste de liberação *in vitro*. O bevacizumabe foi diluído em tampão PBS pH 7,4 até uma concentração final de 50 µg/mL e a amostra foi colocada em incubadora mantida a 37 °C e com rotação de 30 r.p.m. Em tempos pré-determinados, foram retiradas alíquotas desta amostra, que foram analisadas por CLAE.

5.2.4 Análise Térmica

5.2.4.1 Termogravimetria (TG)

As amostras de PUD5 e PUD5BV foram analisadas na termobalança TGA 50H da Shimadzu. As amostras foram colocadas em cadinhos de alumina (Al₂O₃), e os experimentos foram conduzidos em atmosfera dinâmica de nitrogênio (fluxo de 50 mL/min). O aquecimento foi realizado da temperatura ambiente até 750 °C na razão de aquecimento de 10 °C/min.

5.2.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O comportamento térmico foi avaliado utilizando o calorímetro modelo DSC50 (Shimadzu), de acordo com a norma ASTM D3418 que regulariza os procedimentos de análise por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Foram pesados cerca de 4 miligramas das amostras do polímero puro e contendo o fármaco. Após a pesagem, as amostras foram seladas em um cadinho de alumínio semi-hermético. Para a determinação da transição vítrea do polímero, as amostras foram submetidas a um aquecimento prévio sob atmosfera dinâmica de Hélio a 10 °C/min até 100 °C, mantidas

nesta temperatura por 10 minutos, resfriadas até uma temperatura de -100 °C e novamente aquecidas a 10 °C/min até 350 °C.

5.2.5 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As medidas de espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier foram realizadas em um espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 1000. Os filmes de poliuretano e poliuretano contendo bevacizumabe foram analisados por meio da técnica ATR (Reflexão Total Atenuada). As amostras foram pressionadas contra um cristal de seleneto de zinco, e os espectros foram obtidos a partir de 32 varreduras com uma resolução de 4 cm⁻¹, no intervalo de 4000 a 650 cm⁻¹.

5.2.6 Difração de raios X (DRX)

As análises de raios X foram obtidas utilizando-se um difratômetro Siemens D5000 munido de um tubo de cobre e um monocromador de grafite, com $K_{\alpha 1\text{Cu}} = 1,5406 \text{ \AA}$. As amostras dos filmes de poliuretano e poliuretano contendo bevacizumabe foram montadas sobre um porta-amostra de carbeto de silício polido em ângulo de 3°, para minimizar a contagem do *background* do porta-amostra. Os filmes foram presos com fita dupla face para impedir que o feixe de raios X atingisse a fita, e foram submetidos a *spinning* de 60 rpm, para prevenir orientação preferencial e deterioração local pelo feixe de raios X. Os dados foram obtidos na faixa de 5 a 60° 2 θ , com incremento de 0,01° 2 θ e constante de tempo de 10 segundos por incremento.

5.2.7 Estudo de liberação *in vitro* do bevacizumabe a partir dos implantes

A liberação *in vitro* do bevacizumabe a partir dos implantes foi realizada em incubadora, a 30 rpm e 37 °C. Os implantes com e sem fármaco (n = 12, sendo 6 implantes brancos e 6 contendo bevacizumabe) foram colocados em frascos de vidro contendo 2 mL de tampão PBS. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, o meio de incubação dos implantes foi totalmente retirado para posterior quantificação e a solução tampão dos frascos foi renovada, adicionando-se a cada frasco 2 mL de tampão recém-preparado a fim de obter o mesmo volume final. O fármaco liberado no meio de incubação foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência, de acordo com o método analítico previamente desenvolvido e validado.

5.2.8 Análise morfológica dos filmes por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os filmes de PUD5 e PUD5BV antes e após sete dias de incubação foram diretamente analisados em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, modelo JSM-6360LV) operado a 5 kV. Foi feita a fratura criogênica dos filmes, e feita a análise tanto da superfície quanto da região de fratura. Não foi necessária a metalização das amostras.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento e validação do método analítico

6.1.1 Desenvolvimento do método analítico

De acordo com a varredura feita em espectrofotômetro, o λ de maior absorção do fármaco encontrado foi 279 nm, e, portanto, este foi o comprimento de onda selecionado para as análises em CLAE.

As fases móveis testadas eram compostas exclusivamente por tampão, uma vez que o uso de solventes orgânicos poderia desnaturar o fármaco. O primeiro tampão testado (tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4) não apresentou viabilidade para ser utilizado como fase móvel, pois o tampão apresentou uma alta absorvância em 279 nm, e não houve uma boa resolução entre o pico referente ao tampão e o pico referente ao fármaco (Figuras 18 e 19). Sendo assim, foi testado o tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4, que apresentou uma baixa absorvância no comprimento de onda selecionado (Figura 20), e não interferiu no pico do fármaco (Figura 21). Logo, esse tampão foi escolhido como fase móvel.

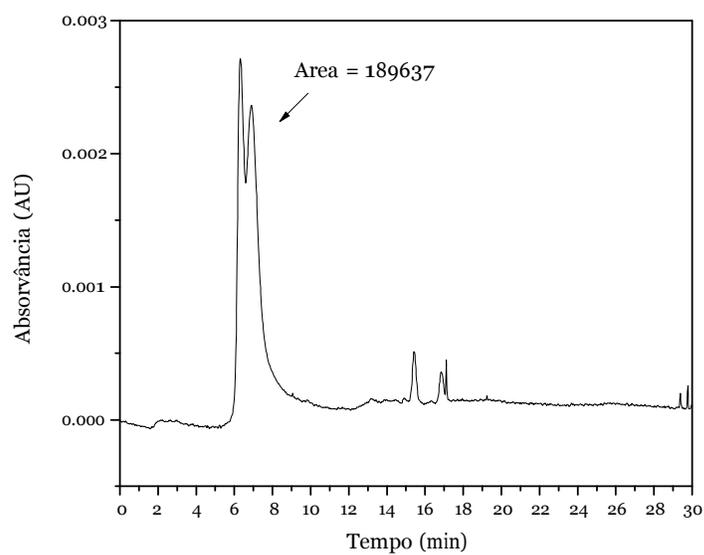


Figura 18 - Cromatograma do tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4

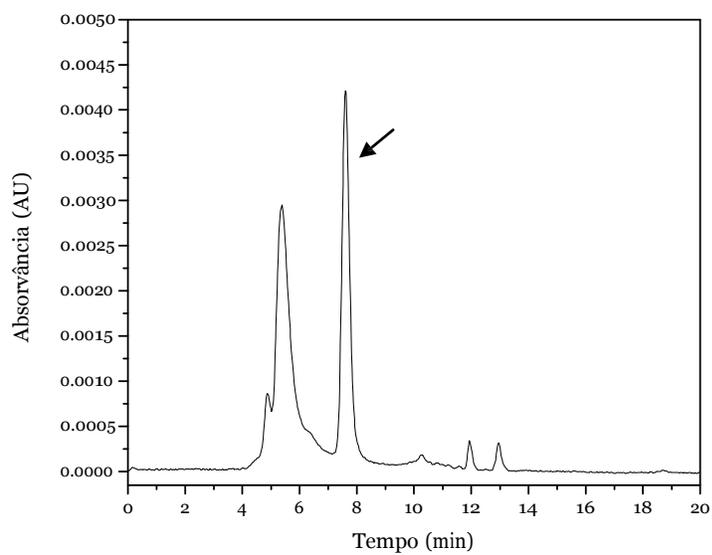


Figura 19 - Cromatograma do bevacizumabe (50 µg/mL) diluído em tampão fosfato de sódio 0,1 M. A seta indica o pico do bevacizumabe.

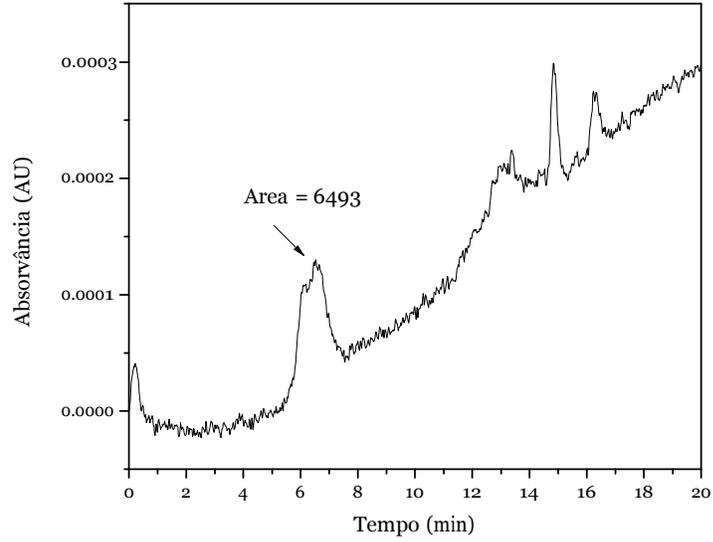


Figura 20 - Cromatograma do tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4

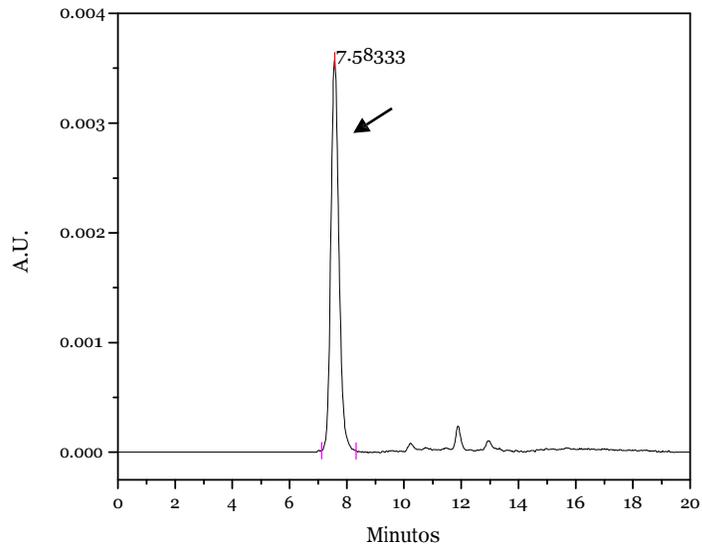


Figura 21 - Cromatograma do bevacizumabe (50 µg/mL) diluído em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4. A seta indica o pico do bevacizumabe.

Após escolha do tampão a ser utilizado como fase móvel, foi feita a avaliação de diferentes fluxos de fase móvel (0,5; 0,8; e 1,0 mL/min). Foram considerados a resolução do pico e o tempo de retenção, e o fluxo selecionado foi de 1,0 mL/min. Os cromatogramas obtidos para cada fluxo são mostrados nas Figuras 22, 23 e 24. Pode-se observar que não houve alteração na resolução dos picos quando o fluxo é alterado. Dessa forma, o fluxo de 1,0 mL/min foi escolhido por proporcionar maior rapidez à análise, diminuindo o tempo de corrida de 28 (fluxo de 0,5 mL/min) para 15 minutos (1,0 mL/min). O tempo de retenção (T_r) do fármaco foi reduzido de 14,98 (0,5 mL/min) para 7,58 minutos (1,0 mL/min).

O cromatograma obtido com o fluxo escolhido apresentou pico simétrico, com tempo de retenção curto, muito desejável em pesquisa ou rotina industrial, como demonstrado na Figura 24.

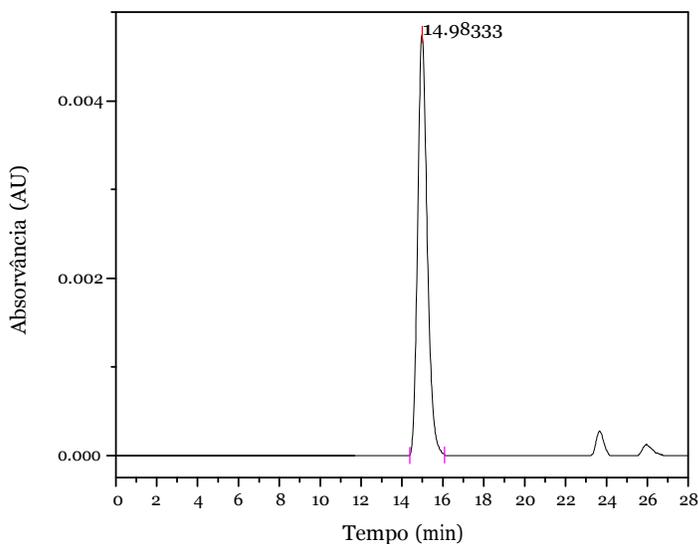


Figura 22 - Cromatograma do bevacizumabe (50 µg/mL) com fluxo de 0,5 mL/min

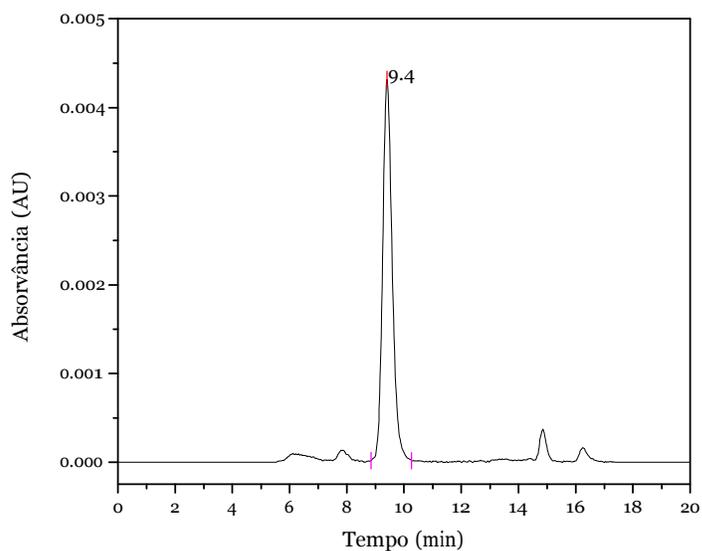


Figura 23 - Cromatograma do bevacizumabe (50 µg/mL) com fluxo de 0,8 mL/min

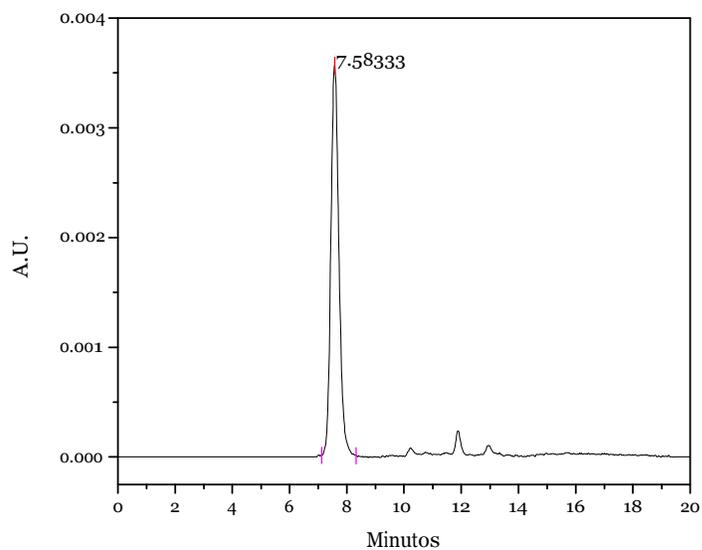


Figura 24 - Cromatograma do bevacizumabe (50 µg/mL) com fluxo de 1,0 mL/min

Durante o estudo, o volume de injeção foi fixado em 20 µL. Os parâmetros cromatográficos utilizados encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros cromatográficos utilizados para validação do método analítico

Detecção	UV ($\lambda = 279$
nm) Fluxo	1,0 mL/min
Coluna	Waters BioSuite 250, 5 μ m, HR SEC (7.8 x 300 mm)
Fase móvel	Tampão PBS pH 7,4
Volume de injeção	20 μ L

6.1.2 Validação do método analítico

O método se mostrou linear, para o intervalo de concentrações entre 5 a 75 μ g/mL, conforme equação da reta $Y = 1536x - 2161$. Esta equação foi obtida calculando-se a média dos valores de inclinação e intercepto com o eixo Y encontrados nas 3 curvas de calibração feitas em dias diferentes. As três curvas obtidas são mostradas na Figura 25.

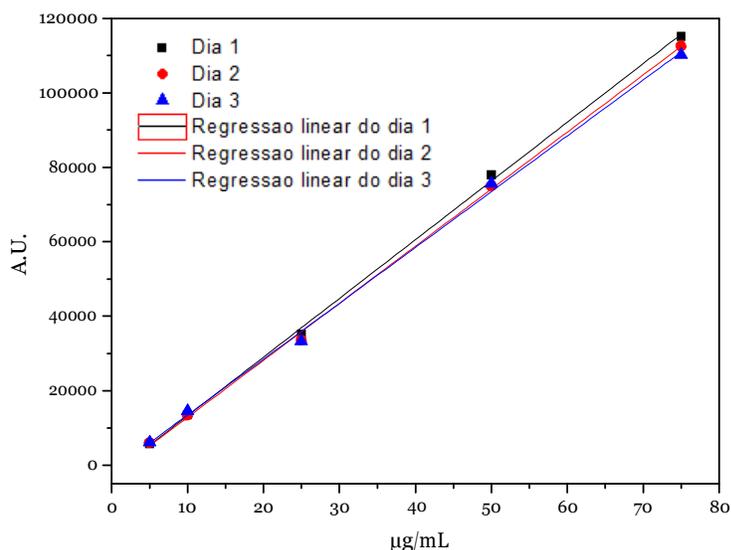


Figura 25 - Curvas de calibração obtidas na avaliação da linearidade

Por meio de análise de variância (ANOVA), verificou-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p < 0,05$). O coeficiente de correlação encontrado para a curva média foi de 0,9983 (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados do tratamento estatístico por análise de variância para a regressão linear

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Variância	F
Total	14	$2,432 \times 10^{10}$	$1,737 \times 10^9$	
Regressão	1	$2,428 \times 10^{10}$	$2,428 \times 10^{10}$	12140,5*
Desvios da regressão	3	20000000	6666667	3,33
Erro puro	10	20000000	2000000	
<i>Estatística de regressão e coeficientes</i>				
R ²	0.9983			
Inclinação	1536			
Intercepto	-2161			
* Valor significativo ($\alpha = 0,05$)				

Com os dados provenientes da avaliação da linearidade foram calculados os limites de detecção e de quantificação (Equações 4 e 5). Os valores obtidos foram 1,11 $\mu\text{g/mL}$ e 3,71 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Quanto à robustez, o método se mostrou robusto para variações de fluxo no intervalo proposto (0,99 a 1,01 mL/min). Porém, para as variações de pH, no intervalo testado (7,0 a 7,8), verificou-se que há diferença estatisticamente significativa nos valores de área obtidos em pH 7,0 quando comparados aos obtidos em pH 7,4 ou 7,8. Em relação aos dois últimos, não houve diferença estatisticamente significativa entre as áreas obtidas ($p < 0,05$). Os resultados estão descritos nas Tabelas 4 e 5. Sendo assim, recomenda-se o controle do pH para a utilização deste método.

Tabela 4 - Robustez com relação à variação do fluxo. Médias com letras iguais são estatisticamente semelhantes a 5%

Fluxo (mL/min)	Concentração (µg/mL)					Média	CV
	1	2	3	4	5		
0,99	46,3	48,2	48,0	47,7	47,5	47,5 ^a	1,57%
1,00	48,2	47,8	47,8	48,6	45,5	47,6 ^a	2,54%
1,01	47,6	47,2	46,4	50,0	47,2	47,7 ^a	2,87%

Tabela 5 - Robustez com relação à variação do pH. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si estatisticamente pelo teste t de student a 5%

pH	Concentração (µg/mL)					Média	CV
	1	2	3	4	5		
7,0	38,0	35,9	36,8	37,8	36,5	37,0 ^a	2,39%
7,4	49,8	46,4	48,6	49,0	50,7	48,9 ^b	3,29%
7,8	51,4	50,4	50,2	51,0	49,6	50,5 ^b	1,39%

Os resultados da repetibilidade e da precisão intermediária foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR) e encontram-se na Tabela 6. Todos os valores de DPR obtidos, tanto para a precisão intra-corrída quanto para a precisão inter-corrídas, encontram-se abaixo de 5%, estando de acordo com o que preconiza a RE 899 da ANVISA, o que evidencia repetibilidade e precisão intermediária adequadas para o método analítico em questão.

Tabela 6 - Valores de desvio padrão relativo da avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária do método analítico

Concentração (µg/mL)	DPR (%)			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Inter-dias
5	4,56	1,27	1,91	3,59
10	4,87	1,27	2,91	3,38
25	1,11	1,60	0,65	2,75
50	1,81	0,59	1,72	2,21
75	0,91	0,53	0,44	1,99

Com relação à exatidão, o método permitiu a recuperação de $(99,66 \pm 2,37)\%$ para a concentração de $5 \mu\text{g/mL}$; $(101,39 \pm 4,13)\%$ para $10 \mu\text{g/mL}$; $(101,95 \pm 2,07)\%$ para $50 \mu\text{g/mL}$; e $(99,79 \pm 2,17)\%$ para $75 \mu\text{g/mL}$, o que caracteriza o método como exato.

Para o teste de especificidade, não foi registrado pico no tempo de retenção do fármaco no cromatograma referente à solução de tampão PBS contendo D-(+)-trealose na concentração de $60 \mu\text{g/mL}$ e $0,04\%$ de Tween 20 (Figura 26).

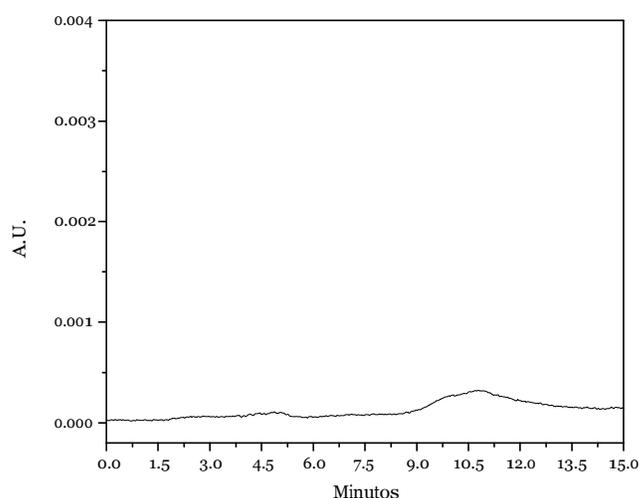


Figura 26 - Cromatograma da amostra de tampão PBS contendo $60 \mu\text{g/mL}$ de D-(+)-trealose e $0,04\%$ de Tween 20

Por meio do estudo de estabilidade, verificou-se que a concentração de bevacizumabe atinge 94% da concentração inicial em 7 dias, em tampão PBS pH 7,4 e temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$,. A estabilidade foi considerada boa, visto que nos testes de liberação, geralmente, a amostra de tampão é sempre renovada num tempo inferior a 7 dias.

Pode-se concluir que o método analítico proposto para detecção e quantificação do bevacizumabe por CLAE mostrou-se sensível, preciso e linear no intervalo de concentração entre 5 e $75 \mu\text{g/mL}$, sendo adequado para a quantificação do bevacizumabe em testes de liberação *in vitro*. A estabilidade do fármaco em tampão

PBS pH 7,4 é limitada, porém suficiente para a realização de análises normalmente conduzidas em estudos de liberação do ativo.

6.2 Análise Térmica

6.2.1 Termogravimetria (TG)

As curvas TG e DTG da amostra de poliuretano estão representadas na Figura 27. A curva TG do poliuretano mostra que o polímero se decompõe em duas etapas, a primeira entre 237,02 °C e 386,17 °C, com uma perda de massa de 72,29%, e a segunda entre 387,47 °C e 457,71 °C (valores extraídos da curva DTG), correspondente a uma perda de massa de 19,08%. A massa residual foi de 8,63%.

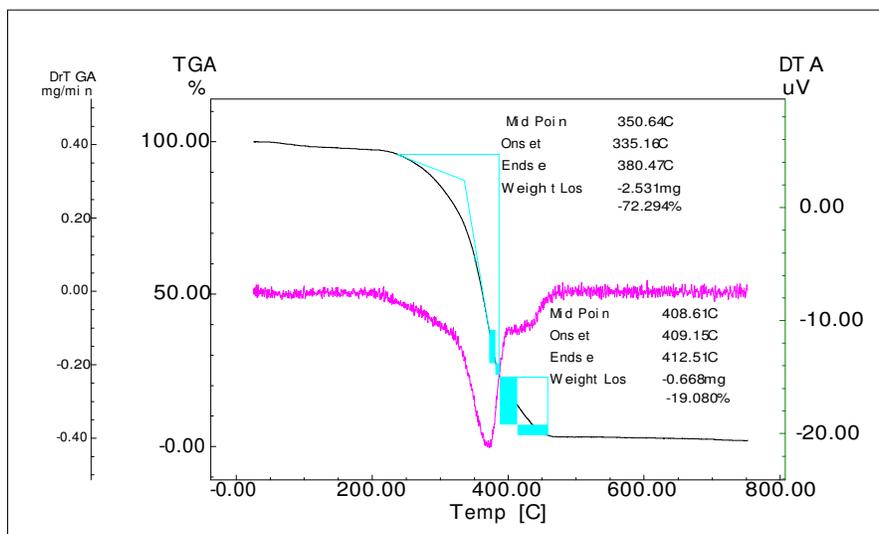


Figura 27 - Curvas TG/DTG do poliuretano em atmosfera dinâmica de N₂

As curvas TG e DTG da amostra de bevacizumabe liofilizado (Figura 28) apresentam uma perda de massa de 27,04% entre 248,06 °C e 311,61 °C, atribuída à

decomposição parcial do fármaco, seguida de uma segunda perda de massa de 14,49% entre 311,61 °C e 373,66 °C (valores extraídos da curva DTG). A massa residual foi de 58,47%.

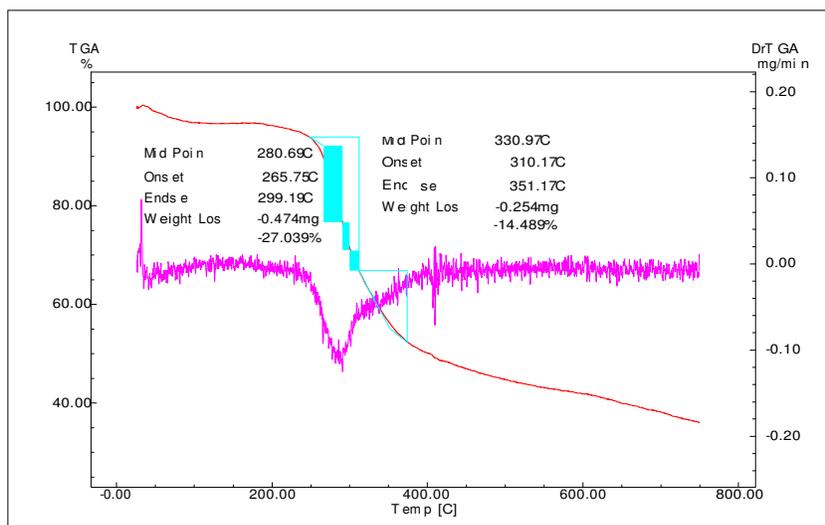


Figura 28 - Curvas TG/DTG do bevacizumabe liofilizado em atmosfera dinâmica de N₂

As curvas TG e DTG da amostra de poliuretano contendo bevacizumabe estão representadas na Figura 29. Observa-se uma pequena perda de massa de 2,72% próxima a 100 °C, correspondente à perda de água residual do filme. A decomposição ocorreu em uma única etapa com uma perda de massa de 86,07% entre 215,79 °C e 449,15 °C, ao contrário do polímero que não continha fármaco, em que houve uma decomposição parcial seguida de outra etapa de decomposição. Pode-se observar uma diminuição da estabilidade térmica do polímero quando o fármaco é adicionado a ele, visto que houve uma diminuição da temperatura em que ocorre o início da decomposição quando o fármaco está presente (215,79 °C), comparada à temperatura de início de decomposição do polímero puro (237,02 °C). Além disso, a massa residual da amostra de poliuretano contendo bevacizumabe foi de 11,21%, maior que da amostra de poliuretano puro.

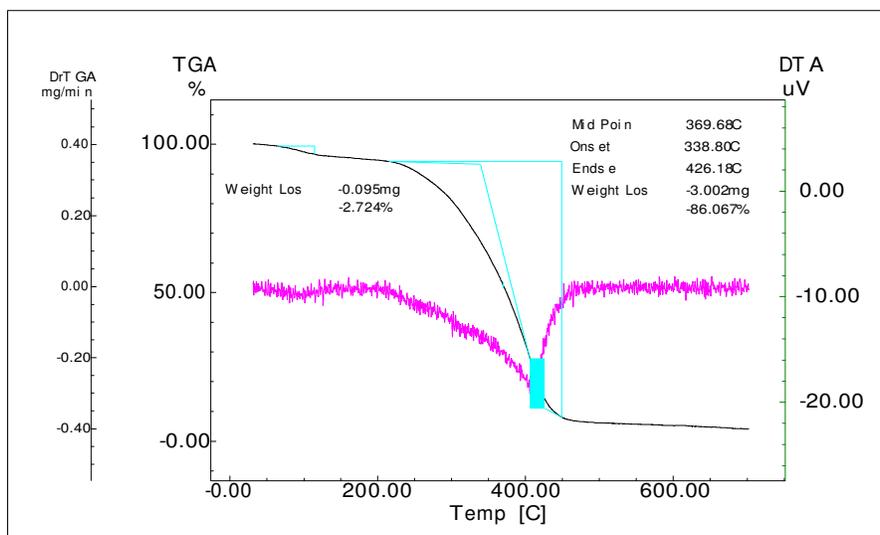


Figura 29 - Curvas TG/DTG do poliuretano contendo bevacizumabe em atmosfera dinâmica de N₂

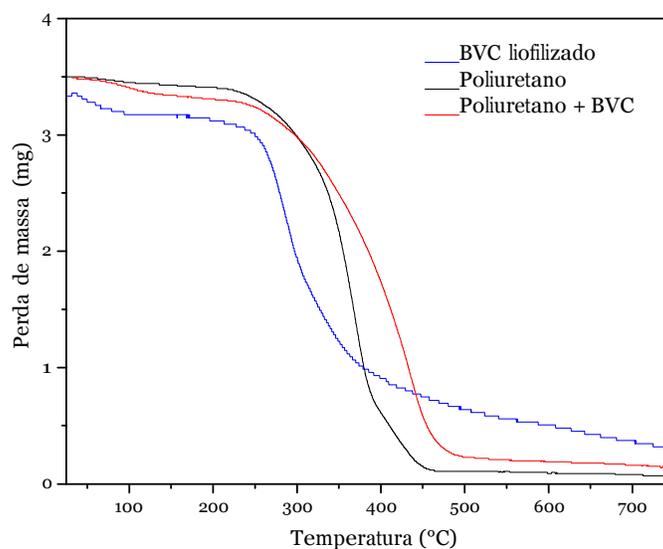


Figura 30 - Sobreposição das curvas TG do poliuretano, bevacizumabe liofilizado e poliuretano contendo bevacizumabe em atmosfera dinâmica de N₂

A Figura 30 mostra a sobreposição das curvas TG do poliuretano, bevacizumabe liofilizado e poliuretano contendo bevacizumabe. Como pode-se observar, o filme

contendo o fármaco apresenta um comportamento térmico distinto do poliuretano e bevacizumabe isoladamente, uma vez que sua curva não se mostrou como um somatório das curvas do polímero e do fármaco isolados. Isso sugere a ocorrência de interação entre o polímero e o fármaco. A fim de confirmar esta hipótese, foi feita também Calorimetria Exploratória Diferencial das amostras.

6.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Foram obtidas as curvas DSC para o poliuretano, bevacizumabe e poliuretano contendo bevacizumabe. Quando não ocorre interação entre as substâncias que são misturadas, a curva DSC da mistura mostra-se como um somatório das curvas dos componentes isolados. O desaparecimento, aparecimento ou deslocamento de picos nas curvas DSC são fortes indícios de interação entre os componentes.

Os eventos observados nas curvas DSC em regiões nas quais não houve perda de massa nas curvas TG foram atribuídos a transições de fase. O perfil de cada curva pode ser visualizado na Figura 31.

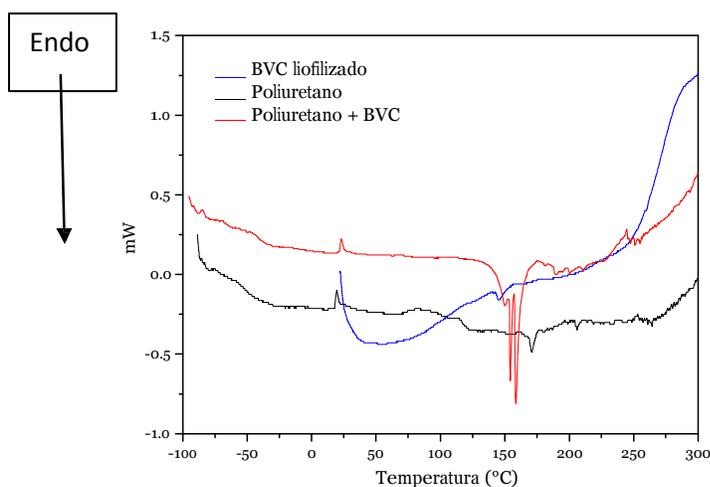


Figura 31 - Sobreposição das curvas DSC do poliuretano, bevacizumabe liofilizado e poliuretano contendo bevacizumabe em atmosfera dinâmica de He

Segundo Ayres, o poliuretano apresenta duas transições vítreas, correspondentes às transições dos segmentos rígidos e macios, sendo que a dos segmentos rígidos ocorre em temperatura maior que a dos segmentos macios (Ayres, 2006). Na curva DSC do poliuretano, as duas transições vítreas foram observadas. A dos segmentos macios, ou seja, da policaprolactona, ocorreu em $-69,30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (onset), estando dentro da faixa relatada na literatura (entre $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$), e a do segmento rígido, em $115,74\text{ }^{\circ}\text{C}$ (onset), também de acordo com os dados da literatura (Ayres, 2006). Também foi observado um evento exotérmico em $19,50\text{ }^{\circ}\text{C}$, correspondente à cristalização do poliuretano, e um evento endotérmico em $170,81\text{ }^{\circ}\text{C}$, atribuído à sua fusão. Logo após a fusão, começa o processo de termodecomposição do polímero.

Na curva DSC do bevacizumabe liofilizado, ocorre um fenômeno endotérmico em $145,63\text{ }^{\circ}\text{C}$, que foi atribuído à fusão do fármaco, uma vez que não foi observada perda de massa na curva TG a essa temperatura. Após $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ começa a termodecomposição do bevacizumabe, confirmando os resultados obtidos por meio da curva TG.

Na curva DSC do poliuretano contendo bevacizumabe também é possível observar o pico exotérmico referente à cristalização do polímero e a transição vítrea atribuída ao segmento flexível. Entretanto, não foi possível observar a transição vítrea correspondente ao segmento rígido, o que pode indicar que a interação entre o fármaco e o polímero está mais relacionada com esse segmento. Além disso, pode-se observar o surgimento de 3 picos referentes a fenômenos endotérmicos que não estão presentes nas curvas do polímero e do fármaco isolados. Dessa forma, a diferença verificada no perfil do polímero contendo bevacizumabe, com o aparecimento de picos antes não observados e o desaparecimento da transição vítrea do segmento rígido, confirma a interação que ocorre entre o fármaco e o polímero quando os dois são misturados, observada na termogravimetria.

6.3 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os poliuretanos são capazes de formar interações de hidrogênio nas quais o doador de prótons é grupo N-H da ligação uretano, ao passo que os grupos receptores podem incluir tanto a carbonila adjacente à própria ligação uretano como a carbonila da ligação éster, quando o segmento macio for um poliéster, ou o átomo de oxigênio da ligação éter, quando o segmento macio for um poliéter. A presença das interações de hidrogênio se manifesta pelo deslocamento das bandas de absorção do estiramento dos grupos N-H e C=O para frequências mais baixas que aquelas observadas quando estes grupos não estão associados por meio de interações de hidrogênio (Ayres, 2006).

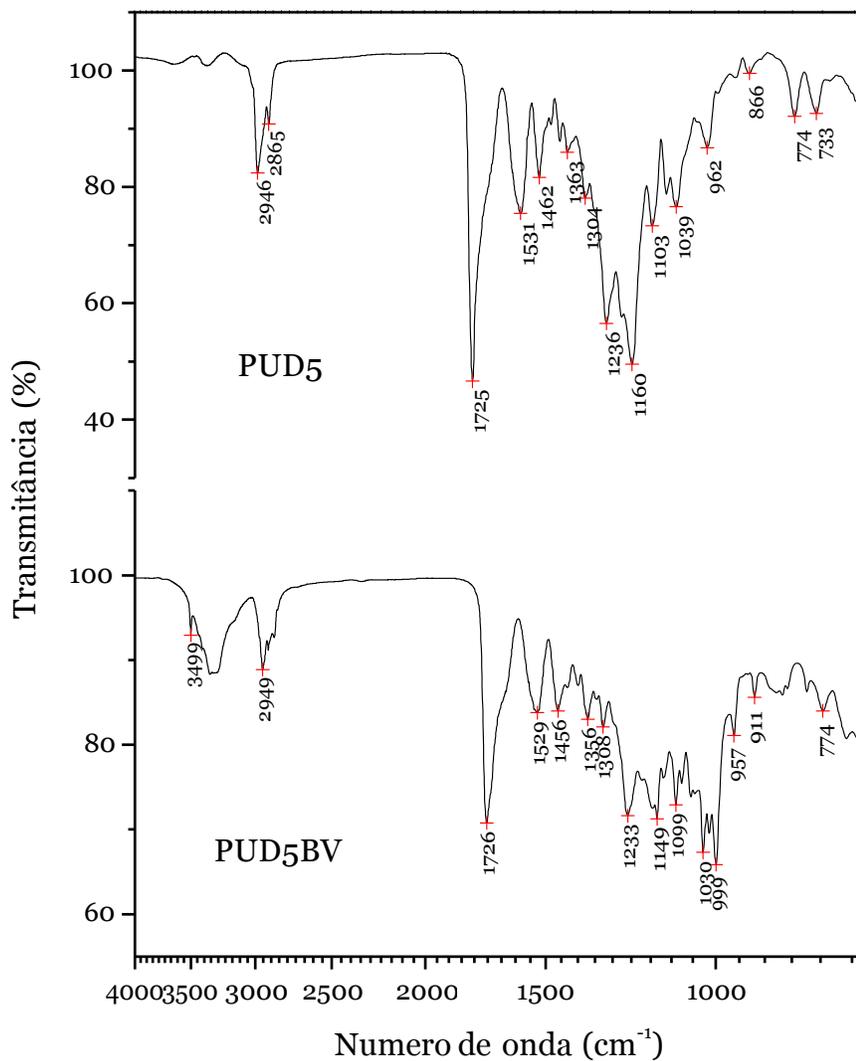


Figura 32 - Espectro de infravermelho das amostras de PUD5 e PUD5BV

Na figura 32 está representado o espectro FTIR para PUD5 e PUD5BV. No espectro referente à amostra de PUD5, absorções típicas de poliuretanos foram detectadas. Nas regiões de 2946 cm⁻¹ e 2865 cm⁻¹ observam-se as bandas características de estiramento assimétrico e simétrico de -CH₃, respectivamente. Outra banda característica pode ser observada em 1725 cm⁻¹, atribuída ao estiramento dos grupos

carbonila presentes no uretano, uréia e éster, envolvidos em ligações de hidrogênio com grupos N-H da ligação uretano. Não foram observadas bandas em aproximadamente 3500 cm^{-1} que corresponderiam às amins livres, o que indica que todas as amins formaram ligações de hidrogênio com grupos polares, tais como as carbonilas. Isto é confirmado pela banda em 3348 cm^{-1} , correspondente ao estiramento de grupos N-H em ligações de hidrogênio. A banda característica do grupo N=C=O livre residual próxima a 2300 cm^{-1} também não é observada, o que confirma a reação total entre os grupos NCO do diisocianato com a poli (ϵ -caprolactona) e o extensor de cadeia utilizados na síntese da dispersão de poliuretano. Isso é vantajoso, visto que grupos NCO livres podem gerar reações secundárias indesejáveis, formando ligações cruzadas que tornariam o polímero mais rígido.

No espectro do PUD5BV pode-se observar o aparecimento de uma banda na região de 3499 cm^{-1} , atribuída aos grupos N-H livres presentes na estrutura protéica do fármaco. Entretanto, a banda próxima a 3300 cm^{-1} aparece mais intensa do que no espectro do PUD5 puro, o que indica que a maior parte dos grupos N-H do fármaco também participam de ligações de hidrogênio com grupos polares do polímero. Esse resultado está de acordo com os resultados obtidos por meio das análises de TG e DSC, que mostraram que ocorria uma interação entre o fármaco e o polímero.

A fim de se analisar melhor a banda na região de absorção das carbonilas foi feita a deconvolução dessa banda, tanto para a amostra de PUD5 (Figura 33) quanto para a amostra de PUD5BV (Figura 34). De acordo com Ayres, a deconvolução é útil para diferenciar as bandas dos diferentes grupos que possuem carbonila, como os grupos uretano, uréia e éster.

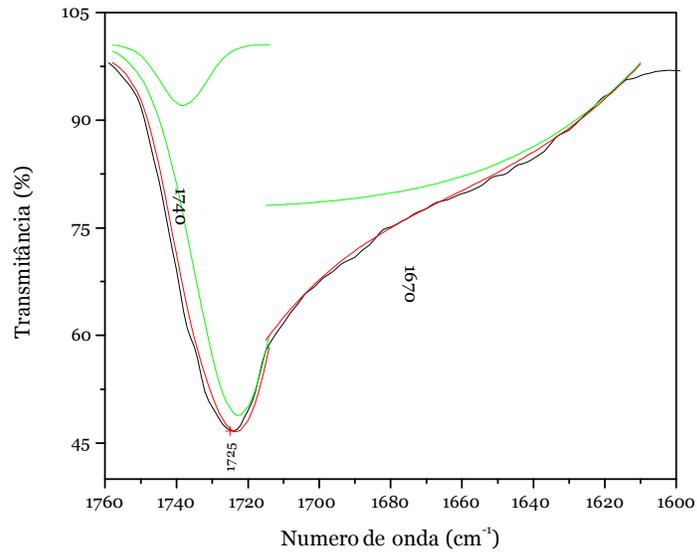


Figura 33 - Curvas de deconvolução da banda na região de estiramento da carbonila (CO) para amostra de PUD5

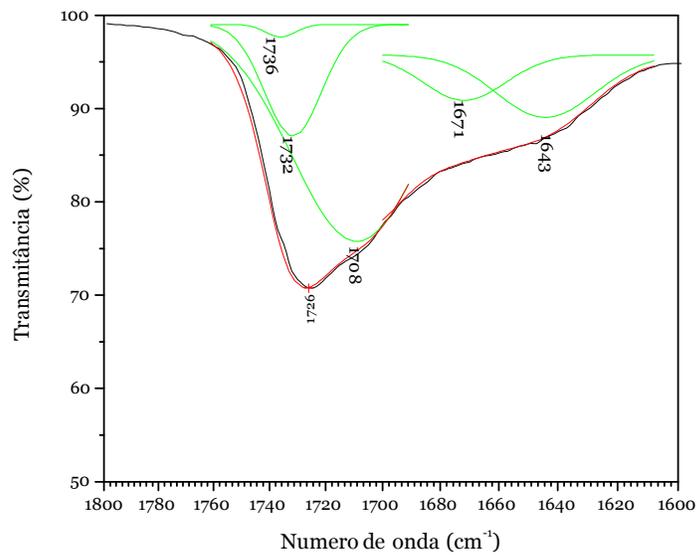


Figura 34 - Curvas de deconvolução da banda na região de estiramento da carbonila (CO) para amostra de PUD5BV

Quando se compara a curva de deconvolução da banda de absorção das carbonilas da amostra de PUD5BV com a da amostra de PUD5, observa-se, na curva do filme contendo o fármaco, um deslocamento das bandas para frequências mais baixas, provavelmente devido ao aumento do número de grupos participantes de ligações de hidrogênio, oriundos não só do polímero, mas também do fármaco.

As Tabelas 7 e 8 apresentam os parâmetros retirados a partir das curvas de deconvolução para as amostras de PUD5 e PUD5BV, respectivamente (Ayres, 2006).

Tabela 7 - Bandas de absorção obtidas a partir da deconvolução da curva referente à amostra de PUD5 na região de absorção das carbonilas

Banda (cm ⁻¹)	Associada com
1670	Uréia livre
1725	Uretano ligado
1740	Éster/ Uretano livre

Tabela 8 - Bandas de absorção obtidas a partir da deconvolução da curva referente à amostra de PUD5BV na região de absorção das carbonilas

Banda (cm ⁻¹)	Associada com
1643	Uréia ligada
1671	Uréia livre
1708	Uretano ligado
1732/1736	Éster/ Uretano livre

Apesar de não aparecer a banda referente aos grupos uréia com interações de hidrogênio na deconvolução da curva referente à amostra de PUD-5, pode-se observar que ela está englobada na banda que aparece em 1670 cm^{-1} , pois não houve uma resolução experimental suficiente para que as duas fossem identificadas isoladamente por meio da deconvolução.

Foi feita também a deconvolução das bandas de estiramento do grupo N-H para as amostras de PUD5 (Figura 35) e PUD5BV (Figura 36).

Segundo Wen et al. (1999), a deconvolução da banda de estiramento do grupo N-H dá origem a três bandas. A primeira banda localizada na região de 3550 cm^{-1} é atribuída ao estiramento de grupos N-H livre. A banda central em torno de 3430 cm^{-1} é atribuída ao estiramento N-H afetado por interações de hidrogênio entre segmento rígido e macio. Finalmente a banda a uma frequência mais baixa (cerca de 3300 cm^{-1}) é atribuída ao estiramento do grupo N-H afetado por interações de hidrogênio entre segmentos rígidos. De acordo com esses autores, as interações de hidrogênio entre segmentos rígidos agem como ligações cruzadas físicas que dificultam a movimentação da cadeia do polímero e acentuam a separação de fases entre segmento rígido e segmento macio.

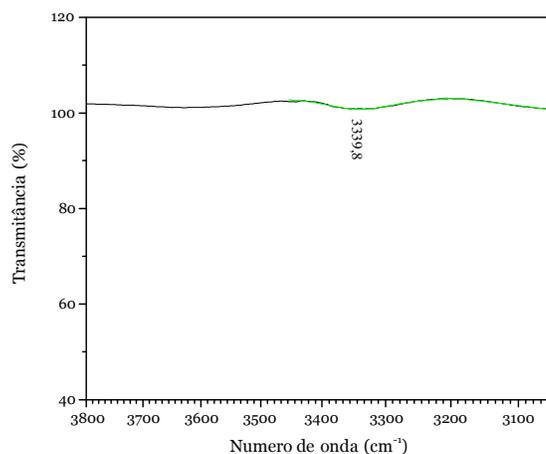


Figura 35 - Curvas de deconvolução da banda na região de estiramento de grupo N-H para amostra de PUD5

A figura 35 mostra a banda de absorção dos grupos N-H com interação de hidrogênio em 3340 cm^{-1} para PUD5, mas não se percebe a banda referente aos grupos N-H livres, o que indica que 100% dos grupos N-H estão ligados.

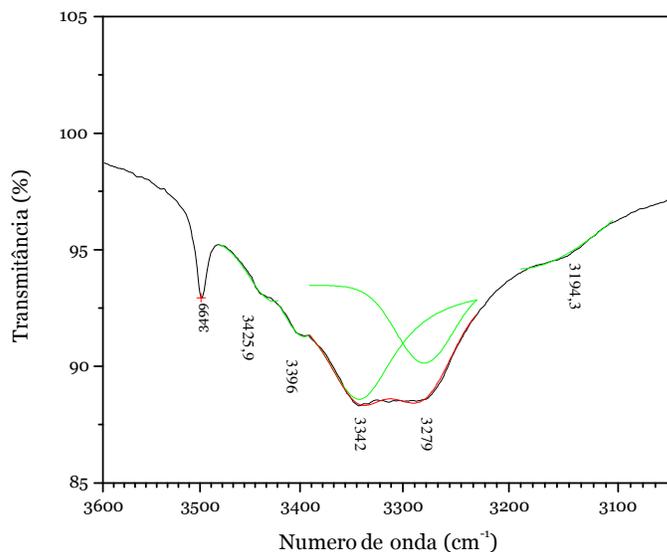


Figura 36 - Curvas de deconvolução da banda na região de estiramento de grupo N-H para amostra de PUD5BV

A figura 36 mostra, além da banda típica de grupos N-H livres em 3499 cm^{-1} , a deconvolução de uma banda larga na região de estiramento de grupos N-H envolvidos em interações de hidrogênio. A banda em 3426 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento N-H afetado por interações de hidrogênio entre segmento rígido e macio. Como esta banda está ausente na curva referente à amostra de PUD5, é possível que o fármaco participe deste tipo de interação. Além disso, há um maior número de bandas próximas à região de estiramento do grupo N-H afetado por interações de hidrogênio entre segmentos rígidos (3300 cm^{-1}), o que indica que há uma interação maior do fármaco com os segmentos rígidos do que com os segmentos macios. Este resultado confirma a hipótese de que a ligação do fármaco com o polímero ocorre mais na região do segmento rígido, sugerida pela análise de DSC. A presença do fármaco entre os segmentos rígidos gerou mais ligações cruzadas devido ao maior número de

interações de hidrogênio, o que provocou um enrijecimento da cadeia do polímero nesta região, dificultando assim a transição vítrea dos segmentos rígidos, que não foi observada pela análise de DSC.

A figura 37 mostra as possíveis interações de hidrogênio que podem ocorrer entre o bevacizumabe e o poliuretano. Pode-se observar que algumas interações entre o fármaco e os grupos pertencentes aos segmentos macios do polímero (derivados da policaprolactona: O-R'-O) podem ocorrer, entretanto a maior parte das interações ocorre entre o fármaco e os grupos pertencentes aos segmentos rígidos do poliuretano (derivados do isocianato).

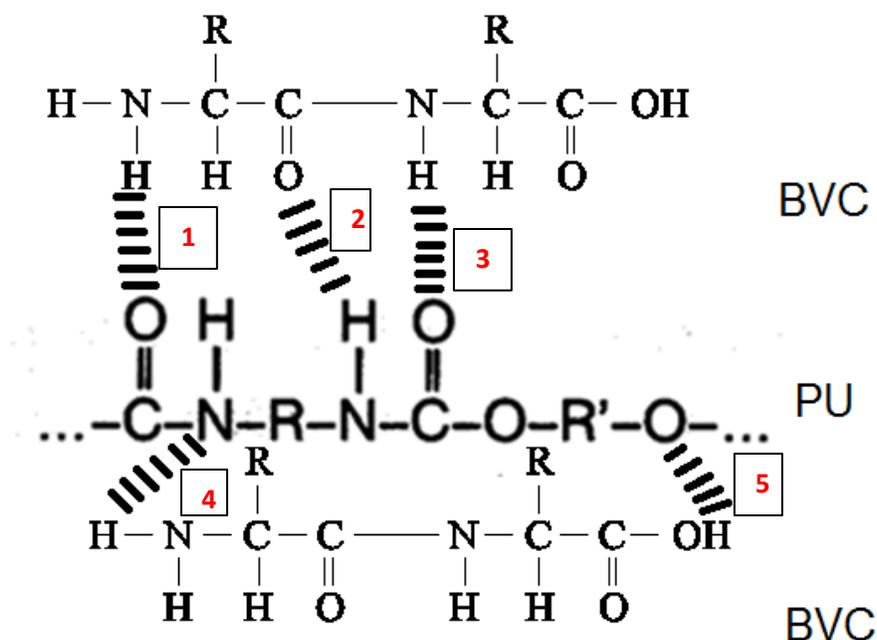


Figura 37 - Possíveis interações de hidrogênio entre o bevacizumabe e o poliuretano. As interações 1-4 ocorrem entre o fármaco e os grupos pertencentes aos segmentos rígidos do polímero. A interação 5 ocorre entre o fármaco e grupos pertencentes aos segmentos macios do poliuretano

6.4 Difração de raios X (DRX)

Na Figura 38 está representado o padrão de difração de raios X obtido em experimento com ângulo razante para PUD5 puro. Bandas de difração amplas foram observadas em $2\theta = 20^\circ$ e $2\theta = 40^\circ$, demonstrando a natureza amorfa deste polímero. A detecção da natureza amorfa do PUD5 deve-se principalmente à presença da poli(ϵ -caprolactona) de baixa massa molar (MM = 1,250 e 2,000 g/mol), incapaz de cristalizar-se como poli(ϵ -caprolactona) de alta massa molar.

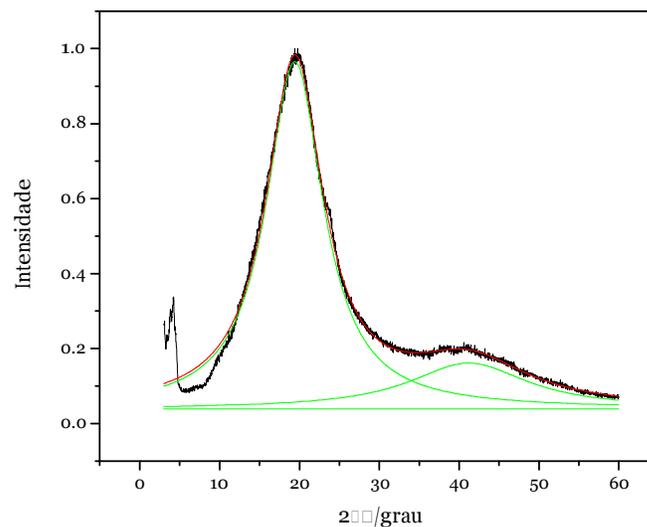


Figura 38 - Difração de raios X com ângulo razante para PUD5

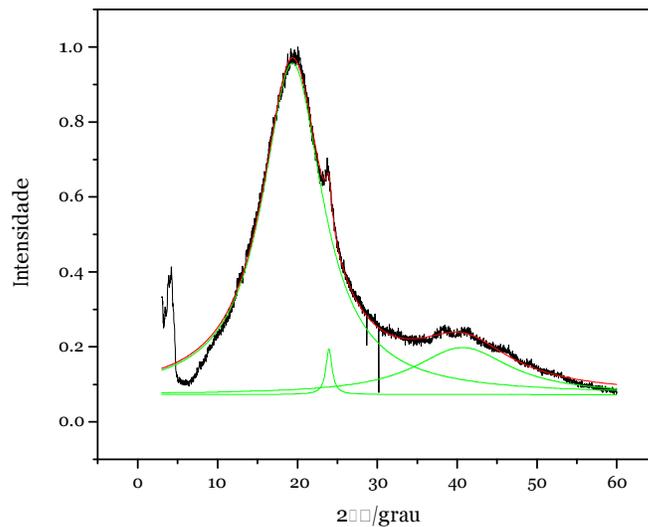


Figura 39 - Difração de raios X com ângulo razante para PUD5BV

Na Figura 39 está representado o padrão de difração de raios X obtido em experimento com ângulo razante para PUD5BV, e na Figura 40 está representado o resultado da subtração espectral entre PUD5BV e PUD5. O pico que aparece a $25^\circ 2\theta$ indica que provavelmente o bevacizumabe apresenta pico de difração que coincide com o do polímero, uma vez que quando o fármaco encontra-se presente há um aumento da intensidade do pico a esse ângulo. Entretanto, devido à impossibilidade de obtenção de um padrão para o fármaco, a comprovação deste fato torna-se difícil, visto que o filme polimérico não foi preparado com o fármaco puro cristalizado, mas com a ampola do medicamento, que contém interferentes, como a trealose e o fosfato de sódio.

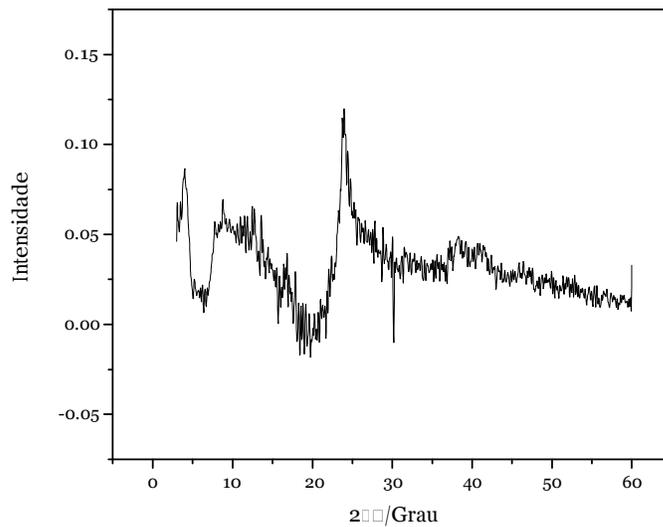


Figura 40 - Subtração espectral entre PUD5BV e PUD5

6.5 Estudo de liberação *in vitro* do bevacizumabe a partir dos implantes

Os sistemas poliméricos não propiciaram a liberação controlada do bevacizumabe, visto que até 40 dias de liberação não foi detectado nenhum pico referente ao fármaco no método analítico desenvolvido, com exceção de uma pequena fração de 10% do total de fármaco presente nos implantes, que foi detectada apenas no primeiro dia de análise. Os filmes utilizados para o teste de liberação *in vitro* foram então solubilizados em metanol a fim de verificar a quantidade de fármaco presente nos implantes, e após análise por HPLC verificou-se que não houve qualquer sinal relativo ao fármaco. Comprovou-se assim a ligação que ocorre entre o poliuretano e o bevacizumabe, discutida ao longo deste trabalho, sendo que a quantificação de 10% do fármaco observada no primeiro dia foi devida muito provavelmente à liberação do fármaco presente na superfície dos implantes.

6.6 Análise morfológica dos filmes por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na figura 41 é mostrada a região de fratura do filme de poliuretano, na qual pode-se observar a aparência compacta e homogênea do polímero, característica de uma síntese bem conduzida.

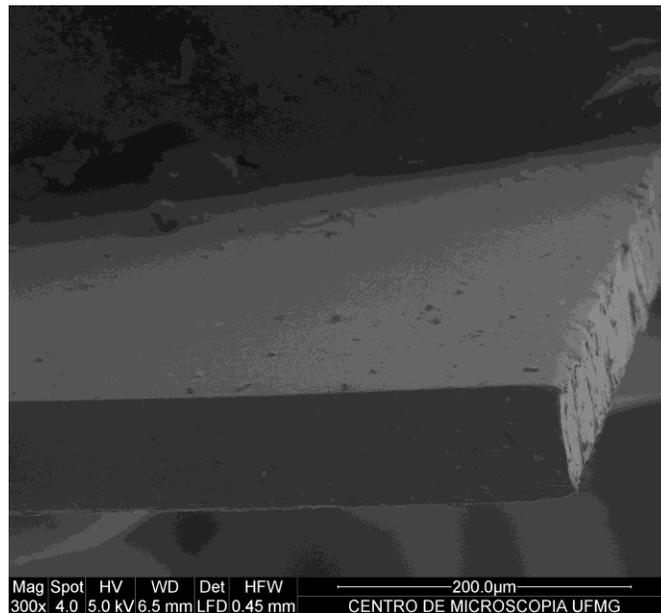


Figura 41 - Micrografia da região de fratura do filme de poliuretano

As micrografias referentes a PUD5 e PUD5BV antes e após 7 dias de incubação em tampão PBS são mostradas na Figura 42. Em comparação com o filme contendo o fármaco, o filme de PUD5 puro apresentou uma superfície de textura mais rugosa indicando um maior grau de degradação. O filme PUD5BV apresentou uma superfície mais lisa, tanto antes de ser submetido à incubação quanto depois de 7 dias incubado, o que indica que a interação do poliuretano com o bevacizumabe resulta em uma maior estabilidade hidrolítica do polímero, provavelmente devido ao maior número de ligações

cruzadas provenientes das interações de hidrogênio, que dificultam a entrada de água na matriz.

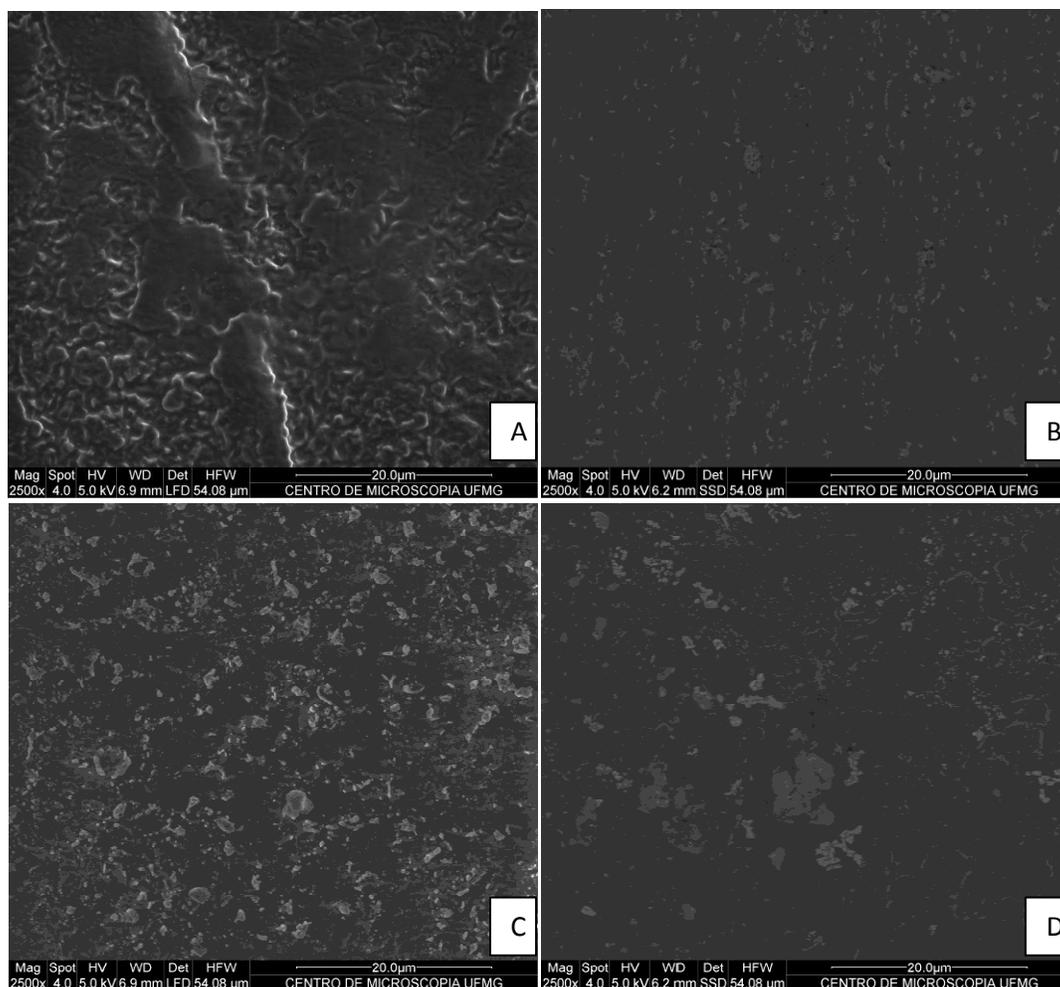


Figura 42 - Micrografias referentes às amostras de PUD5 e PUD5BV, antes e após 7 dias de incubação em tampão PBS: (A) PUD5 antes da incubação; (B) PUD5BV antes da incubação; (C) PUD5 após 7 dias de incubação; e (D) PUD5BV após 7 dias de incubação

7 CONCLUSÕES

Face aos resultados obtidos no presente trabalho, é possível concluir que houve uma interação significativa entre o poliuretano e o bevacizumabe, comprovada pelos fatos que seguem:

1. A mudança no perfil termogravimétrico do filme de PUD5BV, comparado ao perfil de PUD5 e bevacizumabe isolados;
2. A mudança no perfil da curva DSC do filme PUD5BV, com o desaparecimento da transição vítrea dos segmentos rígidos do poliuretano, sugerindo que a presença do fármaco afeta mais esta região do polímero;
3. O deslocamento das bandas de absorção no espectro infravermelho do PUD5BV. O aumento da absorção na região de estiramento do grupo N-H afetado por interações de hidrogênio entre segmentos rígidos comprovou que o fármaco interage mais fortemente com estes segmentos.
4. A ausência de registro de picos nos cromatogramas durante o estudo de liberação *in vitro*, mesmo após solubilização completa do filme.

A interação entre o bevacizumabe e o poliuretano, com o aumento do número de interações de hidrogênio do sistema, aumentou a estabilidade hidrolítica do polímero, o que pôde ser observado pela análise de microscopia.

Apesar da impossibilidade de obtenção de sistemas de liberação prolongada do bevacizumabe por meio da utilização do poliuretano sintetizado neste trabalho, tem-se como perspectiva o desenvolvimento de tais sistemas utilizando outros tipos de polímeros, que não contenham grupos capazes de sofrer interações de hidrogênio com o fármaco. Outra possibilidade é a modificação da estrutura do poliuretano, por meio da

introdução de novos grupos na cadeia polimérica, que diminuam a capacidade de interação do polímero com o fármaco, uma vez que a avaliação *in vivo* mostrou sua potencialidade como matriz para a liberação prolongada do bevacizumabe.

Outro resultado bastante relevante foi o desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação do bevacizumabe, uma vez que a maioria dos trabalhos presentes na literatura utilizam o ELISA para a quantificação. O método desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência é mais simples, rápido e barato, e pode assim ser utilizado em trabalhos futuros para a quantificação do fármaco.

REFERÊNCIAS

ADAMIS, A. P. *et al.* Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *American Journal of Ophthalmology* [S.l.], v. 118, n. 4, p. 445-450, 1994.

AIELLO, L. P. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor in Ocular Fluid of Patients with Diabetic Retinopathy and Other Retinal Disorders. *The New England Journal of Medicine* [S.l.], v. 331, n. 22, p. 1480-1487, 1994.

ALDER, V. A. *et al.* Diabetic retinopathy: early functional changes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* [S.l.], v. 24, n. 9-10, 1997.

AMBATI, J. *et al.* Diffusion of high molecular weight compounds through sclera. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* [S.l.], v. 41, n. 5, p. 1181-1185, 2000.

ATHANASIOU, K. A. *et al.* Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* [S.l.], v. 17, n. 2, p. 93-102, 1996.

AVERY, R. L. *et al.* Intravitreal Bevacizumab (Avastin) for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* [S.l.], v. 113, n. 3, p. 363-372.e5, 2006.

AYRES, E. *Poliuretanos e nanocompósitos biodegradáveis derivados de dispersões aquosas projetados para aplicações biomédicas.* (2006). 196 f. - Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

BAKRI, S. J. *et al.* Absence of Histologic Retinal Toxicity of Intravitreal Bevacizumab in a Rabbit Model. *American Journal of Ophthalmology* [S.l.], v. 142, n. 1, p. 162-164, 2006.

BASHSHUR, Z. F. *et al.* Intravitreal Bevacizumab for the Management of Choroidal Neovascularization in Age-related Macular Degeneration. *American Journal of Ophthalmology* [S.l.], v. 142, n. 1, p. 1-9, 2006.

BEHAR-COHEN, F. Systèmes de délivrance des médicaments pour le segment antérieur: bases fondamentales et applications cliniques. *Journal Français d'Ophtalmologie* [S.I.], v. 25, n. 5, p. 537-544, 2002.

BIRD, A. C. Towards an understanding of age-related macular disease. *Eye* [S.I.], v. 17, n. 4, p. 457-466, 2003.

BLAAUWGEERS, H. G. *et al.* Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *American Journal of Pathology* [S.I.], v. 155, n. 2, p. 421-428, 1999.

BOSCO, A. *et al.* Retinopatia Diabética. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* [S.I.], v. 49, n. 2, p. 217-227, 2005.

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

CAO, Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [S.I.], v. 33, n. 4, p. 357-369, 2001.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* [S.I.], v. 407, n. 6801, p. 249-257, 2000.

CASTRO JUNIOR, G. *et al.* Angiogenesis and cancer: A cross-talk between basic science and clinical trials (the "do ut des" paradigm). *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [S.I.], v. 59, n. 1, p. 40-50, 2006.

CHATTOPADHYAY, D. K. *et al.* The phase mixing studies on moisture cured polyurethane-ureas during cure. *Polymer* [S.I.], v. 47, n. 11, p. 3814-3825, 2006.

COLTHURST, M. J. *et al.* Biomaterials used in the posterior segment of the eye. *Biomaterials* [S.I.], v. 21, n. 7, p. 649-665, 2000.

CRAWFORD, D. M. *et al.* Strain effects on thermal transitions and mechanical properties of thermoplastic polyurethane elastomers. *Thermochimica Acta* [S.I.], v. 323, n. 1-2, p. 53-63, 1998.

CROSS, M. J. *et al.* VEGF-receptor signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences* [S.I.], v. 28, n. 9, p. 488-494, 2003.

CUNHA-VAZ, J. G. The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Experimental Eye Research* [S.I.], v. 78, n. 3, p. 715-721, 2004.

DA SILVA, G. R. *Desenvolvimento de implantes intra-oculares constituídos de poliuretanos biodegradáveis e acetato de dexametasona.* (2009). 124 f. - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

DAMICO, F. M. Angiogênese e doenças da retina. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* [S.I.], v. 70, n. 3, p. 547-553, 2007.

DASH, A. K.; CUDWORTHII, G. C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* [S.I.], v. 40, n. 1, p. 1-12, 1998.

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

DELPECH, M. C.; COUTINHO, F. M. B. Waterborne anionic polyurethanes and poly(urethane-urea)s: influence of the chain extender on mechanical and adhesive properties. *Polymer Testing* [S.I.], v. 19, n. 8, p. 939-952, 2000.

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

EHRMANN, R. L.; KNOTH, M. Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. *Journal of the National Cancer Institute* [S.I.], v. 41, n. 6, p. 1329-1341, 1968.

EUBANK, T. D. *et al.* M-CSF Induces Vascular Endothelial Growth Factor Production and Angiogenic Activity From Human Monocytes. *The Journal of Immunology* [S.I.], v. 171, n. 5, p. 2637–2643, 2003.

FARAH, M. E. *et al.* Degeneração macular relacionada à idade: modalidades terapêuticas. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* [S.I.], v. 64, n. 6, p. 583-588, 2001.

FERRARA, N. *et al.* Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 333, n. 2, p. 328-335, 2005.

FIALHO, S. L. *et al.* Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* [S.I.], v. 66, n. 6, p. 891-896, 2003.

FIALHO, S. L.; SILVA-CUNHA, A. J. Sistemas de transporte de drogas para o segmento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* [S.I.], v. 70, n. 1, p. 173-179, 2007.

FOLKMAN, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *The New England Journal of Medicine* [S.I.], v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971.

FOOD & DRUG ADMINISTRATION, Department of Health & Human Service. AVASTIN™ was approved for commercial marketing or use under § 351 of the Public Health Service Act on February 26, 2004. 9 p. Rockville 2004.

GEROSKI, D. H.; EDELHAUSER, H. F. Transscleral drug delivery for posterior segment disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* [S.I.], v. 52, n. 1, p. 37-48, 2001.

GREENBLATT, M.; SHUBI, P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *Journal of the National Cancer Institute* [S.I.], v. 41, n. 1, p. 111-124, 1968.

GRIFFIOEN, A. W.; MOLEMA, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacological Reviews* [S.I.], v. 52, n. 2, p. 237-267, 2000.

GRISANTI, S. *et al.* Intracameral Bevacizumab for Iris Rubeosis. *American Journal of Ophthalmology* [S.I.], v. 142, n. 1, p. 158-160, 2006.

GUPTA, O. P. *et al.* Proptosis after retrobulbar corticosteroid injections. *Ophthalmology* [S.I.], v. 110, n. 2, p. 443-447, 2003.

HOLZ, F. G. *et al.* Analysis of lipid deposits extracted from human macular and peripheral Bruch's membrane. *Archives of Ophthalmology* [S.I.], v. 112, n. 3, p. 402-406, 1994.

HURWITZ, H. *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin for the treatment of metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* [S.I.], v. 350, n. 23, p. 2335-2342, 2004.

IDE, A. G. *et al.* Vascularization of the Brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *The American Journal of Roentgenology and Radium Therapy* [S.I.], v. 42, n. 6, p. 891-899, 1939.

INGBER, D. E. Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 87, n. 9, p. 3579-3583, 1990.

JOHNSON, D. H. *et al.* Randomized Phase II Trial Comparing Bevacizumab Plus Carboplatin and Paclitaxel With Carboplatin and Paclitaxel Alone in Previously Untreated Locally Advanced or Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* [S.I.], v. 22, n. 11, p. 2184-2191, 2004.

JOHNSON, L. V. *et al.* Complement Activation and Inflammatory Processes in Drusen Formation and Age Related Macular Degeneration. *Experimental Eye Research* [S.I.], v. 73, n. 6, p. 887-896, 2001.

KIMURA, H.; OGURA, Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. *Ophthalmologica* [S.I.], v. 215, n. 3, p. 143-155, 2001.

KRZYSTOLIK, M. G. *et al.* Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Archives of Ophthalmology* [S.I.], v. 120, n. 3, p. 338-346, 2002.

LAI, C.-C. *et al.* Suppression of Choroidal Neovascularization by Adeno-associated Virus Vector Expressing Angiostatin. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* [S.I.], v. 42, n. 10, p. 2401-2407, 2001.

LLOYD, A. W. *et al.* Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials* [S.I.], v. 22, n. 8, p. 769-785, 2001.

MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the Urban Brazilian population aged 30-69 yr. *Diabetes Care* [S.I.], v. 15, n. 11, p. 1509-1515, 1992.

MATSUMOTO, T.; CLAESSEON-WELSH, L. VEGF receptor signal transduction. *Science Signaling* [S.I.], v. 2001, n. 112, p. RE21, 2001.

MERKLI, A. *et al.* Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. *Progress in Polymer Science* [S.I.], v. 23, n. 3, p. 563-580, 1998.

NGUYEN, M. *et al.* Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [S.I.], v. 33, n. 10, p. 960-970, 2001.

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

OLIVEIRA, V. M. S. *Síntese e caracterização de dispersões aquosas de poliuretano.* (2008). 110 f. - Engenharia e Tecnologia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

OSHIMA, Y. *et al.* Regression of Iris Neovascularization After Intravitreal Injection of Bevacizumab in Patients With Proliferative Diabetic Retinopathy. *American Journal of Ophthalmology* [S.I.], v. 142, n. 1, p. 155-157.e1, 2006.

PANDYA, N. M. *et al.* Angiogenesis--a new target for future therapy. *Vascular Pharmacology* [S.I.], v. 44, n. 5, p. 265-274, 2006.

POLVERINI, P. J. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Dental Education* [S.I.], v. 66, n. 8, p. 962-975, 2002.

RAMRATTAN, R. S. *et al.* Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* [S.I.], v. 35, n. 6, p. 2857-2864, 1994.

RODRIGUES, E. B. *et al.* Therapeutic monoclonal antibodies in ophthalmology. *Progress in Retinal and Eye Research* [S.I.], v. 28, n. 2, p. 117-144, 2009.

_____. Tratamento da forma neovascular de degeneração macular relacionada à idade com drogas antiangiogênicas. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* [S.I.], v. 69, n. 5, p. 756-765, 2006.

ROSEN, L. Antiangiogenic Strategies and Agents in Clinical Trials. *The Oncologist* [S.I.], v. 5, n. supl. 1, p. 20-27, 2000.

ROSENFELD, P. J. *et al.* Optical coherence tomography findings after intravitreal injection of Bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging* [S.I.], v. 36, n. 4, p. 331-335, 2005.

SENGER, D. R. *et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* [S.I.], v. 219, n. 4587, p. 983-985, 1983.

SHING, Y. *et al.* Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* [S.I.], v. 223, n. 4642, p. 1296-1299, 1984.

SIVAKUMAR, B. *et al.* Modulating Angiogenesis: More vs. Less. *Journal of the American Medical Association* [S.I.], v. 292, n. 8, p. 972-977, 2004.

SMITH, J. R. *et al.* Lower eyelid herniation of orbital fat may complicate periocular corticosteroid injection. *American Journal of Ophthalmology* [S.I.], v. 133, n. 6, p. 845-847, 2002.

SPAANS, C. J. *et al.* Solvent-free fabrication of micro-porous polyurethane amide and polyurethane-urea scaffolds for repair and replacement of the knee-joint meniscus. *Biomaterials* [S.I.], v. 21, n. 23, p. 2453-2460, 2000.

TONINI, T. *et al.* Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* [S.I.], v. 22, n. 42, p. 6549-6565, 2003.

UNIVERSO VISUAL. Controle da Retinopatia Diabética. n. 53, 2010.

URTTI, A.; SALMINEN, L. Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs. *Survey of Ophthalmology* [S.I.], v. 37, n. 6, p. 435-456, 1993.

WATSON, P. G.; YOUNG, R. D. Scleral structure, organisation and disease. A review. *Experimental Eye Research* [S.I.], v. 78, n. 3, p. 609-623, 2004.

WEN, T.-C. *et al.* The effect of DMPA units on ionic conductivity of PEG-DMPA-IPDI waterborne polyurethane as single-ion electrolytes. *Polymer* [S.I.], v. 40, n. 14, p. 3979-3988, 1999.

YASUKAWA, T. *et al.* Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. *Progress in Retinal and Eye Research* [S.I.], v. 23, n. 3, p. 253-281, 2004.