

LORENA CARLA VIEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO
PROLONGADA DE ÁCIDO ROSMARÍNICO PARA O
TRATAMENTO DE DOENÇAS OCULARES CAUSADORAS
DE NEOVASCULARIZAÇÃO: OBTENÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS**

BELO HORIZONTE – MG

FACULDADE DE FARMÁCIA - UFMG

2011

LORENA CARLA VIEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO
PROLONGADA DE ÁCIDO ROSMARÍNICO PARA O TRATAMENTO
DE DOENÇAS OCULARES CAUSADORAS DE
NEOVASCULARIZAÇÃO: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS
SISTEMAS**

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

BELO HORIZONTE – MG

FACULDADE DE FARMÁCIA - UFMG

2011

V665d Vieira, Lorena Carla
Desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada de ácido
rosmarínico para o tratamento de doenças oculares causadoras de
neovascularização: obtenção e caracterização dos sistemas /
Lorena Carla Vieira. – 2011.
139 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior.

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

1. Tecnologia de liberação controlada - Teses 2. Ácido
rosmarínico – Teses. 3. Polímeros na medicina - Teses. 4.
Implantes intraoculares – Teses. 5. Tecnologia farmaceutica -
Teses. 6. Oftalmologia - Teses. I. Cunha Júnior, Armando da Silva.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia.
III. Título.

CDD:615.4

FOLHA DE APROVAÇÃO

LORENA CARLA VIEIRA

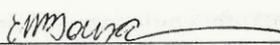
"Desenvolvimento de sistemas de liberação de ácido rosmarínico para o tratamento de doenças oculares causadoras de neovascularização: obtenção e caracterização dos sistemas"

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.

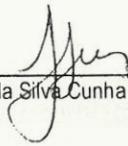
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Jayter Silva de Paula - USP- Ribeirão Preto



Profa. Dra. Edésia Martins Barros de Sousa - CDTN



Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Junior - UFMG

Belo Horizonte, 16 de setembro de 2011

Dedico este trabalho aos meus pais pelo amor e carinho, aos meus irmãos pela amizade, ao Fernando pelo amor e apoio, e à minha avó Irene, que eu tanto amava cujo sofrimento causado pelas complicações do glaucoma me impulsionou ainda mais na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me guiou e me deu forças nos momentos difíceis para trilhar esse longo caminho.

Ao professor Armando da Silva Cunha Júnior pela confiança no meu trabalho, incentivo, amizade, pelos ensinamentos valiosos e por me proporcionar tanto aprendizado.

Aos meus pais que tanto amo, Moacir e Zizinha, que me ensinaram e me deram tudo de mais valioso que há no mundo, pelo amor e apoio em todos os momentos, dizendo para que eu confiasse em Deus e que tudo iria dar certo.

Aos meus irmãos Adriane, Priscila e Diego, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Ao Fernando, pelo amor, carinho e por estar presente em todos os momentos. Pela imensa ajuda que deu a este trabalho, sendo o melhor fotógrafo de membranas corioalantóicas que já conheci!

Ao meu avô João e principalmente a minha querida avó Irene, que sofria pela perda de visão ocasionada pelas complicações do glaucoma e que sem perceber, me deu uma força imensa para que eu desenvolvesse este trabalho. Espero que este trabalho e os outros do nosso grupo de pesquisa ajudem a minimizar o sofrimento de pessoas como a minha avó.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, especialmente ao Samu, Elton, Mateus, Daniel, Tati, Dani, Diego e Gui, pela amizade e grande apoio nos experimentos, além de aliviarem a pressão do dia a dia com os momentos de descontração. A todos os professores do LTF e ao Eduardo pelo apoio.

À Lili, Leilinha, Juliana, Ricardo, Cris, Gabi, Arianne, Marcela e Millena pela ajuda que deram a este trabalho e pela amizade.

À Lívia, pela imensa ajuda sem a qual não teria sido possível a realização deste trabalho, e pela grande amizade que levarei comigo para sempre.

À Doutora Luciana Maria Silva, que abriu as portas do BIOCIB para mim, pelos ensinamentos e grande colaboração a este trabalho.

Aos colegas da FUNED, em especial à Millene, Flávia, Juliana, Pedro, Michelle e Ana Elisa, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Renes pela colaboração, auxílio e por disponibilizar o seu laboratório para os nossos experimentos.

À Doutora Maria Irene Yoshida pela colaboração.

Às professoras Eliana Martins e Sandra Farsky, por me receberem tão bem na UFG e USP.

Aos professores e colegas do laboratório de Química Farmacêutica pela colaboração.

A todos que estiveram presentes na minha vida e que de alguma forma me auxiliaram neste trabalho.

RESUMO

O tratamento de doenças que acometem o segmento posterior do bulbo do olho é limitado uma vez que as formas convencionais de administração de fármacos falham ao disponibilizar doses terapêuticas no vítreo, retina e coróide. Injeções intravítreas vêm sendo utilizadas para transportar fármacos para o segmento posterior do olho, porém, é uma técnica invasiva e apresenta riscos de infecções oculares, descolamento da retina e baixa adesão dos pacientes. Os implantes biodegradáveis são capazes de disponibilizar o fármaco diretamente na cavidade vítrea em doses terapêuticas e por um período prolongado. O ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA) é um polímero sintético biodegradável extensamente utilizado em sistemas de liberação de fármacos devido à sua biocompatibilidade e ausência de toxicidade em testes *in vivo*. Neste trabalho, implantes constituídos de PLGA e ácido rosmarínico, um polifenol com promissora atividade antiangiogênica, foram desenvolvidos e caracterizados por calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), além de ter sido determinado o perfil de liberação *in vitro* do fármaco. Os resultados obtidos mostram que foi possível obter implantes biodegradáveis para a liberação de AR por meio de métodos reprodutíveis que disponibilizam o fármaco presente de forma dispersa nas matrizes poliméricas e na sua forma biologicamente ativa. As técnicas de caracterização empregadas mostraram a ausência de modificações estruturais nos grupos funcionais do AR e do PLGA. A instabilidade do AR nos meios de cultivo celular observada, inviabilizam a utilização de ensaios biológicos *in vitro* para a avaliação da citotoxicidade e atividade do fármaco e dos sistemas desenvolvidos. A avaliação da atividade antiangiogênica *in vivo* do AR e dos sistemas biodegradáveis desenvolvidos, realizada por meio do ensaio da membrana corioalantóica, apresentou resultados satisfatórios para a futura aplicação dos implantes no tratamento de doenças causadoras da neovascularização retiniana.

Palavras-chave: Ácido rosmarínico, polímeros biodegradáveis, implantes intraoculares, segmento posterior do olho, ensaio da membrana corioalantóica.

ABSTRACT

The treatment of diseases of the posterior segment of the eye is limited once the conventional forms of drug administration fail to provide therapeutic levels drug to the vitreous, retina and choroids. 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, retinal detachment and poor patient compliance. The biodegradable implants are able to release drugs directly to the vitreous and to maintain long-term vitreous concentration of drugs in therapeutic range. The poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) is a biodegradable synthetic polymer widely used in drug delivery systems due to its biocompatibility and absence of significant toxicity accessed by *in vivo* studies. In this study, an intraocular implant based PLGA and rosmarinic acid, a polyphenol with promising antiangiogenic activity have been developed and characterized by DSC, FTIR and SEM, and its long-term *in vitro* release profile. The results suggest that it was possible to obtain biodegradable implants for RA release through reproducible methods that provide drug in dispersed and active form in the polymer matrix. The characterization techniques showed the absence of structural changes in RA and PLGA functional groups. The instability of RA in cell culture medium, prevented the use of biological assays for *in vitro* cytotoxicity and activity evaluation of the drug and the systems developed. The assessment of *in vivo* antiangiogenic activity of RA and biodegradable systems, by the chorioallantoic membrane assay, showed satisfactory results for future application of implants in the treatment of diseases that cause retinal neovascularization.

Keywords: Rosmarinic acid, biodegradable polymer, intraocular implants, posterior segment of the eye, chorioallantoic membrane assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema anatômico do bulbo do olho.....	20
Figura 2 – Desenho esquemático da anatomia da retina.....	24
Figura 3 – Desenho esquemático da mácula normal e da mácula afetada pelos dois tipos de degeneração macular relacionada à idade.....	30
Figura 4 - Angiografias mostrando a retina normal (A); retinopatia diabética não proliferativa (B) e retinopatia diabética proliferativa (C). As setas indicam focos hemorrágicos.....	32
Figura 5 - Ácido rosmarínico.....	38
Figura 6 - A córnea como uma barreira à absorção de fármacos pela via tópica.....	40
Figura 7 - A barreira hematorretiniana.....	41
Figura 8 - Fotografia do implante de PLGA e dexametasona de implantação não cirúrgica...	48
Figura 9 – Espectro de varredura do ácido rosmarínico no ultravioleta, onde pode ser observado o λ máximo de absorção em 331 nm.....	62
Figura 10 – Cromatograma do ácido rosmarínico (50 $\mu\text{g/mL}$) com fluxo de 0,6 mL/min.....	63
Figura 11 – Cromatograma do ácido rosmarínico (50 $\mu\text{g/mL}$) com fluxo de 0,8 mL/min.....	63
Figura 12 – Cromatograma do ácido rosmarínico (50 $\mu\text{g/mL}$) com fluxo de 1,0 mL/min.....	64
Figura 13 – Cromatograma obtido do PBS.....	65
Figura 14 – Cromatograma obtido do PLGA 75:25 em PBS após 20 dias de degradação.....	65
Figura 15 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos do PBS, PLGA e AR (50 $\mu\text{g/mL}$), demonstrando que o método é seletivo e específico.....	66
Figura 16 – Curva analítica do AR.....	67
Figura 17 – Implante de PLGA contendo ácido rosmarínico.....	77
Figura 18 – Trocater Transescleral (Accurus® 25 – Gauge System, Alcon, Inc, EUA) utilizado no desenvolvimento dos implantes.....	78
Figura 19 – Curva de DSC do PLGA 75:25.....	79
Figura 20 – Curva de DSC do ácido rosmarínico.....	80
Figura 21 – Curva de DSC da mistura liofilizada de PLGA e AR na proporção de 3:1.....	81

Figura 22 – Espectroscopia na região do infravermelho do PLGA 75:25 branco.....	82
Figura 23 – Espectroscopia na região do infravermelho do ácido rosmarínico.....	83
Figura 24 – Espectroscopia na região do infravermelho da mistura física de PLGA e AR na proporção de 3:1.....	84
Figura 25 – Espectroscopia na região do infravermelho da mistura liofilizada de PLGA e AR na proporção de 3:1.....	85
Figura 26 - MEV dos implantes de PLGA com 4 dias de incubação em aumento de 20X (A); 100X (B) e 500X (C); e com 8 dias de incubação em aumento de 20X (D); 100X (E) e 500X (F)...	86
Figura 27 - MEV dos implantes de PLGA + AR logo após o preparo em aumento de 20X (A); 100X (B) e 500X (C).....	87
Figura 28 - MEV dos implantes de PLGA + RA com 4 dias de incubação em aumento de 20X (A); 100X (B) e 500X (C); e com 8 dias de incubação em aumento de 20X (D); 100X (E) e 500X (F).....	88
Figura 29 – Perfil de liberação do ácido rosmarínico a partir dos implantes de PLGA 75:25..	89
Figura 30 – Membrana corioalantóica (MCA) do embrião de galinha. A) Imagem da MCA de um embrião de 10 dias; B) Localização da MCA (em vermelho) ao redor do embrião de 12 dias e em contato direto com a casca do ovo; C) Ilustração do corte transversal da MCA no 10°-12° dia de incubação: 1. epitélio coriônico; 2. mesoderma com vasos sanguíneos em vermelho; 3. epitélio alantóico.....	96
Figura 31 – Uso dos embriões de galinha para a avaliação de sistemas de liberação de fármacos. Adaptado de (Vargas <i>et al.</i>, 2007).....	98
Figura 32 – Tipos de cultura dos embriões de galinha. A) Modelo <i>in ovo</i>; B) Modelo <i>ex ovo</i>.....	99
Figura 33 – Transformação do MTT em formazan pela enzima desidrogenase mitocondrial presente nas células vivas.....	101
Figura 34– ARPE-19 em aumentos de 20X (A e B) e 100X (C).....	104
Figura 35 – WI26-VA4 em aumentos de 20X (A) e 40X (B).....	104
Figura 36 – Equipamentos utilizados para a incubação dos ovos. A) Incubadora automática; B) Posição vertical dos ovos na incubadora.....	109
Figura 37 – Equipamentos utilizados para a obtenção das imagens da MCA.....	110
Figura 38 – Tratamento das imagens obtidas das MCAs. A) Imagem de uma MCA de um embrião de 7 dias; B) Imagem após a seleção da área referente ao disco de celulose; C) Imagem em preto e branco após o tratamento com a ferramenta Color Threshold; D) <i>Plugin</i> Color Threshold utilizado para selecionar os tons de vermelho da imagem, referentes aos vasos sanguíneos da MCA.....	110
Figura 39 – Efeito do ácido rosmarínico sobre a viabilidade de células ARPE-19 após 24 (•) e 72 (•) horas de tratamento. A viabilidade das células tratadas com AR foi expressa em relação à viabilidade das células do grupo controle, tratado com meio de cultura, fixada em 100%....	112

- Figura 40** – Efeito do ácido rosmarínico sobre a viabilidade de células WI26-VA4 após 24 (•) e 72 (•) horas de tratamento. A viabilidade das células tratadas com AR foi expressa em relação à viabilidade das células do grupo controle, tratado com meio de cultura, fixada em 100%....113
- Figura 41** – Efeito dos implantes desenvolvidos (PLGA branco e com 25% de AR) sobre a viabilidade de células ARPE-19 após 24 (•) e 72 (•) horas de tratamento. A viabilidade das células tratadas com os implantes foi expressa em relação à viabilidade das células do grupo controle, tratado com meio de cultura, fixada em 100%.....114
- Figura 42** – Teste de biocompatibilidade pelo método de difusão em ágar. Nos poços referentes aos implantes de PLGA e PLGA + AR não houve a formação de halo de inibição e as células (ARPE-19) se mantiveram íntegras.....116
- Figura 43** – Cromatograma obtido para o AR (131,55 µg/mL) em DMEM-F12 imediatamente após o preparo da solução.....117
- Figura 44** – Cromatograma obtido para o AR (129,05 µg/mL) em EMEM imediatamente após o preparo da solução.....118
- Figura 45** – Cromatograma obtido para o AR (concentração inicial de 131,55 µg/mL) em DMEM-F12 após 1 hora de incubação, apresentando uma concentração de 128,81 µg/mL, ou seja,97,9% da concentração inicial.....119
- Figura 46** – Cromatograma obtido para o AR (concentração inicial de 129,05 µg/mL) em EMEM após 1 hora de incubação, apresentando uma concentração de 125,41 µg/mL, ou seja,97,2% da concentração inicial.....119
- Figura 47** – Cromatograma obtido para o AR em DMEM-F12 após 2 horas de incubação, apresentando uma concentração de 122,16 µg/mL, ou seja,92,9% da concentração inicial.... 119
- Figura 48** – Cromatograma obtido para o AR em EMEM após 2 horas de incubação, apresentando uma concentração de 119,18 µg/mL, ou seja, 92,3% da concentração inicial... 120
- Figura 49** – Cromatograma obtido para o AR em DMEM-F12 após 16 horas de incubação, apresentando uma concentração de 5,85 µg/mL, ou seja, 4,44% da concentração inicial.....120
- Figura 50** – Cromatograma obtido para o AR em EMEM após 16 horas de incubação, apresentando uma concentração de 5,33 µg/mL, ou seja, 4,13% da concentração inicial..... 121
- Figura 51** – Cromatograma obtido para o AR em DMEM-F12 após 24 horas de incubação tendo o fármaco sido totalmente degradado..... 121
- Figura 52** – Cromatograma obtido para o AR em EMEM após 24 horas de incubação tendo o fármaco sido totalmente degradado..... 122
- Figura 53** – Ensaio da membrana corioalantóica realizado com PBS (controle), bevacizumabe (250 e 500 µg/mL) e AR (250 e 500 µg/mL). O percentual de vasos sanguíneos do grupo tratado foi expresso em relação ao percentual do grupo controle, fixado em 100%. * Significativamente diferente do grupo controle. ** Significativamente diferente do grupo tratado com bevacizumabe (500 µg/mL) (P<0,05)..... 123
- Figura 54** – Ensaio da membrana corioalantóica realizado com PBS (controle) e implantes de PLGA branco e contendo AR (25%). O percentual de vasos sanguíneos do grupo tratado foi expresso em relação ao percentual do grupo controle, fixado em 100%. * Significativamente diferente do grupo controle. ** Significativamente diferente do grupo tratado com PLGA branco (P<0,05)..... 124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos testes, segundo sua finalidade.....	57
Tabela 2 – Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo a sua categoria.....	57
Tabela 3 – Composição do tampão PBS, pH 7,4.....	58
Tabela 4 – Parâmetros cromatográficos adotados na validação do método analítico de quantificação do AR.....	64
Tabela 5 – Dados utilizados na construção da curva de calibração do AR.....	67
Tabela 6 – Repetibilidade do método de quantificação do AR.....	68
Tabela 7 – Precisão intermediária do método de quantificação do AR.....	68
Tabela 8 – Vantagens e desvantagens do uso de embriões de galinha para a avaliação de fármacos e sistemas de liberação de fármacos.....	97
Tabela 9 – Sistemas de liberação de fármacos e formulações avaliadas por meio do ensaio da MCA.....	98
Tabela 10 – Grau de citotoxicidade em função do tamanho do halo de inibição.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Ácido rosmarínico
ARPE-19	Células do epitélio pigmentado da retina
BHR	Barreira hemato-retiniana
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNV	Neovascularização coroidal
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DCCT	Diabetes Control and Complication Trial
DM	Diabetes mellitus
DMRI	Degeneração Macular Relacionada à Idade
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EMA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
EPR	Epitélio pigmentar da retina
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
IL-8	Interleucina 8
MCA	Membrana corioalantóica
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Min	Minuto
MNVC	Membrana neovascular coroidal
NVC	Neovascularização coroidal
Tg	Transição vítrea
Tr	Tempo de retenção
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	18
REVISÃO DA LITERATURA.....	20
1 O BULBO OCULAR.....	21
1.1 O segmento posterior do bulbo do olho.....	22
1.1.1 Esclera.....	22
1.1.2 Coróide.....	23
1.1.3 Corpo vítreo.....	23
1.1.4 Retina.....	23
2 ANGIOGÊNESE.....	27
2.1 VEGF.....	28
3 DOENÇAS OCULARES CAUSADORAS DE NEOANGIOGÊNESE.....	30
3.1 Degeneração macular relacionada à idade.....	30
3.2 Retinopatia diabética.....	32
3.3 Terapias.....	34
3.3.1 Fotocoagulação a laser.....	34
3.3.2 Terapia fotodinâmica com verteporfina (TFD-V).....	35
3.3.3 Vitrectomia.....	35
3.3.4 Terapias antiangiogênicas.....	35
3.3.4.1 Pegaptanibe.....	35
3.3.4.2 Bevacizumabe.....	36
3.3.4.3 Ranibizumabe.....	36
4 ÁCIDO ROSMARÍNICO.....	38
4.1 Atividade antiangiogênica do ácido rosmarínico.....	39
5 LIMITAÇÕES NA ADMINISTRAÇÃO OFTÁLMICA DE FÁRMACOS.....	40
6 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA DE FÁRMACOS.....	44
6.1 Sistemas de transporte de fármacos.....	44
6.2 Sistemas poliméricos.....	45
6.3 Polímeros e copolímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico	47
JUSTIFICATIVA.....	51

OBJETIVOS

1 OBJETIVO GERAL.....54

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....54

PARTE I: Validação da metodologia analítica de quantificação do ácido rosmarínico

1 MATERIAIS E MÉTODOS.....56

1.1 Materiais.....56

1.2 Métodos.....56

1.2.1 Desenvolvimento do método analítico.....56

1.2.1.1 Determinação do comprimento de onda de detecção.....57

1.2.1.2 Determinação da fase móvel e fluxo.....57

1.2.2 Validação do método analítico.....57

1.2.2.1 Especificidade e seletividade.....59

1.2.2.2 Linearidade.....59

1.2.2.3 Precisão.....60

1.2.2.4 Exatidão.....61

1.2.2.5 Limite de detecção.....61

1.2.2.6 Limite de quantificação.....62

1.2.2.7 Estabilidade.....62

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....63

2.1 Desenvolvimento do método analítico.....63

2.2 Validação do método analítico.....65

2.2.1 Especificidade e seletividade.....66

2.2.2 Linearidade.....67

2.2.3 Precisão.....68

2.2.4 Exatidão.....69

2.2.5 Limite de detecção e quantificação.....70

2.2.6 Estabilidade.....70

3 CONCLUSÃO.....71

PARTE II: Desenvolvimento e caracterização de implantes intra-oculares contendo ácido rosmarínico

1 MATERIAIS E MÉTODOS.....73

1.1 Materiais.....73

1.2 Métodos.....73

<u>1.2.1 Determinação do peso médio dos implantes</u>	73
<u>1.2.2 Determinação do teor de AR nos implantes</u>	74
<u>1.2.3 Caracterização dos implantes biodegradáveis desenvolvidos</u>	74
<u>1.2.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</u>	74
<u>1.2.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</u>	75
<u>1.2.3.3 Análise morfológica dos implantes por microscopia eletrônica de varredura (MEV)</u>	75
<u>1.2.4 Estudo de liberação <i>in vitro</i></u>	76
2 RESULTADOS	78
2.1 Preparo dos implantes.....	78
2.2 Determinação do peso médio e teor de ácido rosmarínico nos implantes.....	79
2.3 Caracterização dos sistemas biodegradáveis desenvolvidos	79
<u>2.3.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</u>	79
<u>2.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</u>	82
<u>2.3.3 Análise morfológica dos implantes por microscopia eletrônica de varredura (MEV)</u>	86
<u>2.3.4 Estudo de liberação <i>in vitro</i></u>	90
3 CONCLUSÃO	93
 PARTE III: Avaliação biológica dos sistemas desenvolvidos	
1 INTRODUÇÃO	95
1.1 Ensaio de angiogênese na membrana corioalantóica de embrião de galinha.....	95
<u>1.1.1 Cultura <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> dos embriões de galinha</u>	100
<u>1.1.2 Quantificação da resposta antiangiogênica na MCA</u>	100
1.2 Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	101
<u>1.2.1 Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT</u>	101
<u>1.2.2 Teste de biocompatibilidade dos implantes</u>	102
<u>1.2.2.1 Teste de biocompatibilidade pelo método de difusão em ágar</u>	102
2 MATERIAIS E MÉTODOS	104
2.1 Materiais.....	104
2.2 Métodos.....	104
<u>2.2.1 Avaliação da citotoxicidade do ácido rosmarínico e dos implantes desenvolvidos</u>	104

<u>2.2.1.1 Teste de citotoxicidade do ácido rosmarínico</u>	106
<u>2.2.1.2 Teste de citotoxicidade dos implantes</u>	107
<u>2.2.2 Teste de biocompatibilidade dos implantes</u>	108
<u>2.2.2.1 Teste de biocompatibilidade pelo método de difusão em ágar</u>	108
<u>2.2.3 Estabilidade do ácido rosmarínico no meio de cultura celular</u>	108
<u>2.2.4 Ensaio da membrana corioalantóica (MCA)</u>	108
<u>2.2.4.1 Avaliação quantitativa dos vasos nas imagens obtidas da MCA</u>	110
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
3.1 Teste de citotoxicidade do ácido rosmarínico	113
3.2 Teste de citotoxicidade dos implantes	115
3.3 Teste de biocompatibilidade pelo método de difusão em ágar	116
3.4 Estabilidade do ácido rosmarínico no meio de cultura celular	117
3.5 Ensaio da membrana corioalantóica (MCA)	124
4 CONCLUSÃO	127
CONCLUSÃO	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130

INTRODUÇÃO

As doenças proliferativas da retina, como a degeneração macular relacionada à idade e a retinopatia diabética, são responsáveis pela maioria dos casos de cegueira irreversível no mundo. O impacto econômico e social causado por elas deve-se em maior parte às complicações que encurtam a vida produtiva dos indivíduos, piorando a sua qualidade de vida e onerando os serviços de saúde pública.

Esse cenário, portanto, estimula o desenvolvimento de novos tratamentos para degenerações retinianas e outras doenças que atingem os tecidos posteriores do olho. A eficácia do tratamento depende, basicamente, do sucesso no transporte de doses efetivas de agentes farmacológicos diretamente para os locais a serem tratados. Entretanto, as barreiras naturais do olho, constituídas pela córnea, conjuntiva e sistema hematorretiniano promovem uma baixa penetração dos fármacos no interior do olho limitando os tratamentos disponíveis e exigindo cuidado devido a possíveis ocorrências de efeitos adversos.

Visando a manutenção de níveis terapêuticos adequados no segmento posterior do olho, em particular, no corpo vítreo, na retina e na coróide, a via intravítrea tem sido a de escolha para o tratamento de diferentes doenças oculares. Pesquisas têm sido realizadas a fim de desenvolver sistemas de administração intravítrea que permitam liberar concentrações terapêuticas dos fármacos prolongadamente. Tais sistemas proporcionam inúmeras vantagens, como aumento da biodisponibilidade; liberação prolongada; redução de efeitos adversos sistêmicos e a frequência de injeções intravítreas, reduzindo as suas complicações e aumentando o conforto e a adesão do paciente ao tratamento.

Os polímeros biodegradáveis têm sido largamente utilizados nas áreas médica, como biomateriais, e farmacêutica, como sistemas de liberação de fármacos. Dentre eles, destacam-se derivados do ácido lático e glicólico por apresentar biocompatibilidade e efeito tóxico *in vivo* reduzido.

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de sistemas biodegradáveis de liberação prolongada de ácido rosmarínico, um fármaco com promissora atividade antiangiogênica, para o tratamento de doenças oculares causadoras de neovascularização.

REVISÃO DA LITERATURA

1 O BULBO OCULAR

O bulbo ocular encontra-se situado em uma cavidade óssea, a órbita, cuja principal função é a sua proteção. Ele é formado por estruturas que compõem os segmentos anterior e posterior do olho. O segmento anterior é constituído pela íris, cristalino, 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 *et al.*, 2004).

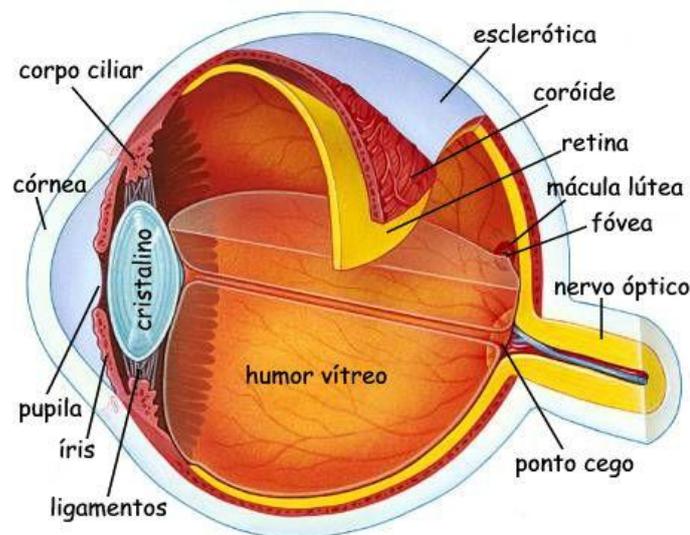


Figura 1 – Esquema anômico do bulbo do olho.

(Disponível em: www.markonline.com.br)

Os anexos do bulbo ocular são constituídos pelas pálpebras, pela conjuntiva, pelo sistema lacrimal, além dos cílios e sobrancelhas, que tem como função a proteção do olho.

O bulbo do olho é formado por três camadas ou túnicas que recobrem os meios transparentes por onde a luz passa antes de atingir a retina, sendo denominadas de túnica fibrosa ou externa, túnica vascular ou intermediária e túnica nervosa ou interna.

A túnica fibrosa é constituída por uma porção anterior transparente, a córnea, um tipo especial de tecido conjuntivo denso que se encontra disposto na forma lamelar. A sua transparência é inerente à sua estrutura tecidual e ao bombeamento contínuo de líquidos intersticiais. Não possui vasos sanguíneos e os nutrientes difundem para o tecido a partir dos vasos do limbo, pelo filme lacrimal ou pelo humor aquoso, sendo o oxigênio absorvido diretamente da atmosfera. A porção posterior da túnica fibrosa é constituída pela esclera, uma camada opaca fibrosa que envolve externamente o olho, conferindo-lhe forma e firmeza (Snell e Lemp, 1998).

A túnica vascular, também denominada úvea ou trato uveal, é formada pela coróide, corpo ciliar e íris, possuindo como principal função o fornecimento de nutrientes e o carreamento de metabólitos para fora do olho.

A túnica nervosa é formada pelo epitélio pigmentado da retina (EPR) e pela retina, tecido que contém as células fotossensíveis ou fotorreceptores representadas pelos cones e bastonetes. Estas células transformam a energia luminosa em sinais nervosos, os quais são transmitidos para o cérebro pelo nervo óptico. Os cones são mais sensíveis à visão das cores e os bastonetes mais sensíveis à baixa intensidade de luz, este último responsável pela visão noturna ou visão de penumbra.

1.1 O segmento posterior do bulbo do olho

1.1.1 Esclera

A esclera (ou esclerótica) é a camada mais externa do segmento posterior e também está presente no segmento anterior, formando 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).

1.1.2 Coróide

A coróide é uma camada localizada entre a esclera e a retina, que 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 *et al.*, 2000; Lloyd *et al.*, 2001).

1.1.3 Corpo vítreo

A recepção dos raios luminosos pela retina é permitida pelo corpo vítreo, estrutura gelatinosa, transparente e incolor localizada na câmara vítrea. É constituído por 98% de água, ácido hialurônico, aminoácidos, proteínas solúveis, sais e ácido ascórbico, além de uma rede de fibrilas de colágeno.

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 (Lloyd *et al.*, 2001).

1.1.4 Retina

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. Ela possui duas regiões especiais: a *fóvea centralis* e o

ponto cego. A fóvea está no eixo óptico do olho, onde é projetada a imagem do objeto focalizado com grande nitidez. É a região da retina especializada para a visão de alta resolução. A fóvea contém apenas cones e permite que a luz atinja os fotorreceptores sem passar pelas demais camadas da retina, maximizando a acuidade visual (Snell e Lemp, 1998).

Classicamente, sob a luz da microscopia óptica, a retina é composta por 10 camadas: membrana limitante interna, camada de fibras nervosas, camada de células ganglionares, plexiforme interna, nuclear interna, plexiforme externa, os fotorreceptores (nuclear externa, segmento interno e o externo) e epitélio pigmentado da retina. A camada dos fotorreceptores é composta pelos cones e bastonetes, que estão próximos à superfície externa da retina. A camada mais externa da retina é o epitélio pigmentado da retina (EPR), o qual está em íntimo contato com os segmentos externos dos fotorreceptores (Heegand, 1997).

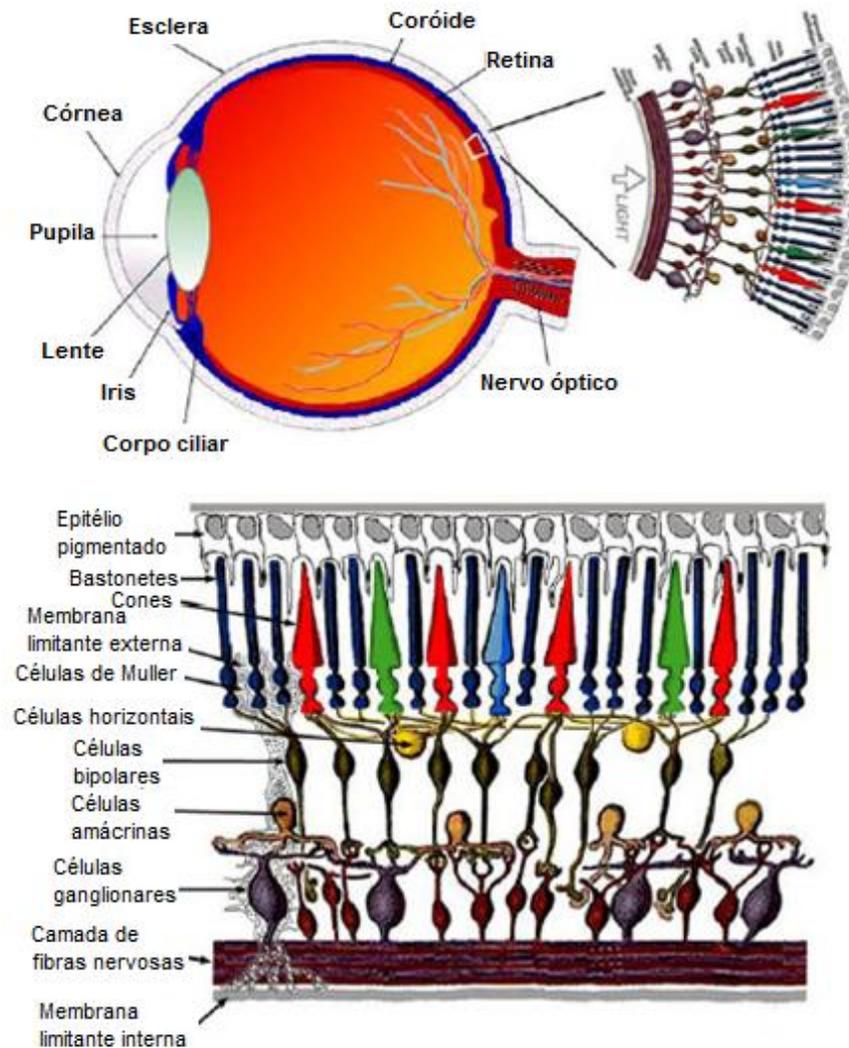


Figura 2 – Desenho esquemático da anatomia da retina.

(Disponível em: webvision.med.utah.edu)

Juntos, os vasos da retina e o epitélio pigmentar formam a barreira hemato-retiniana (BHR), uma forte barreira contra macromoléculas, fazendo da retina neural um tecido imunologicamente privilegiado e propiciando mecanismos para controlar o fluxo de fluidos e metabólitos (Heegand, 1997). O endotélio dos capilares é rodeado, em intervalos irregulares, por células murais chamadas pericitos ou células de Rouget. Há controvérsias se os pericitos exercem papel regulador no fluxo sanguíneo dos capilares, pós-capilares e vênulas, mas a presença de actina, miosina e tropomiosina sugere capacidade contrátil. O que ocorre nos capilares retinianos dos diabéticos é a perda desses pericitos, tornando-os vasos acelulares

ou fantasmas, fato esse que parece permitir o processo angiogênico (Imesch et al., 1997; Hirschi e D'amore, 1997).

Os vasos da retina são caracterizados por células endoteliais contínuas, não fenestradas, com junções intercelulares impermeáveis, que se apresentam para formar a BHR. A interação entre as células endoteliais forma a barreira que permite ao tecido, assim como ao endotélio capilar e ao epitélio pigmentado da retina, criarem condições para um tecido com integridade funcional. A junção intercelular representa um pequeno poro (9 a 11nm) que é responsável pelas trocas transcapilares de água e outras moléculas hidrofílicas menores que 15Å. Podemos encontrar três tipos de junções intercelulares que fazem essa mediação no endotélio: as junções ou zonas de oclusão (*tight junctions*), as zonas de adesão e as junções *gap*. Entre as células endoteliais dos vasos da retina existem apenas zonas de oclusão entremeadas com desmossomos (Bosco et al., 2005).

No diabetes melittus, encontramos com freqüência a ruptura das junções de oclusão. A ruptura destas junções, a chamada quebra da BHR, é considerada a marca da retinopatia diabética e apresenta uma gama de complicações como, por exemplo, edema macular e neovascularização (Hirschi e D'amore, 1997; Ishibashi e Inomata, 1993).

2 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 destes tumores.

Em 1968, experimentos realizados por Greenblatt e colaboradores 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 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. Nas situações onde o organismo perde a capacidade de modular a angiogênese, surgem as doenças relacionadas a essa perda (Polverini, 2002; Tonini *et al.*, 2003).

Enquanto várias doenças isquêmicas podem ser beneficiadas pela indução da angiogênese, em outras esse processo exerce um importante papel no desenvolvimento da doença, como nas inflamações crônicas, artrite reumatóide, retinopatia diabética proliferativa, psoríase, endometriose e adiposidades, além de ser crucial para o crescimento e metástase tumoral. A inibição desse processo então passou a ser uma importante estratégia terapêutica (Griffioen e Molema, 2000).

Esse complexo processo consiste na ativação das células endoteliais por fatores de crescimento, seguida da degradação enzimática da membrana basal, descolamento das proteínas de adesão das células endoteliais, migração das mesmas para o espaço perivascular, proliferação e finalmente, a formação de novos vasos. Essas etapas são altamente reguladas por vários fatores de crescimento e citocinas, sendo o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator básico de crescimento

de fibroblastos (bFGF), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 8 (IL-8) potentes fatores angiogênicos (Folkman e Shing, 1992).

2.1 Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)

Um dos fatores pró-angiogênicos mais importantes já identificados é o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Este fator foi identificado pela primeira vez em 1983 por Senger e colaboradores (1986), que o descreveram como sendo um potente fator de permeabilidade vascular secretado por diversas células tumorais *in vitro*, que leva a um rápido e reversível aumento na permeabilidade microvascular, com a potência 10.000 vezes maior que a da histamina, sem promover, no entanto a degranulação dos mastócitos.

O VEGF é produzido por macrófagos, linfócitos T, células tumorais e, no olho, pelas células do EPR, se liga com alta afinidade aos receptores de membrana com atividade tirosina quinase e sua expressão é induzida principalmente em condições de hipóxia. Sua secreção é polarizada nas células do EPR: em condições normais, a secreção da porção basal é 2 a 7 vezes maior que a da porção apical, e sob hipóxia essa razão é muito maior. A expressão de receptores de VEGF também é maior no endotélio da coriocapilar que está voltado para o EPR, demonstrando indiretamente a importância do VEGF na manutenção da integridade da coriocapilar (Shima *et al.*, 1995).

A família de fatores VEGF é constituída de no mínimo 5 membros, VEGF A, B, C, D e E, sendo a forma A a mais encontrada. Existem pelo menos 4 isoformas da molécula de VEGF A biologicamente ativas em seres humanos, contendo 121, 165, 189 e 206 aminoácidos, e cada uma desempenha um papel diferente no processo de angiogênese. O VEGF₁₆₅ é a isoforma predominante no olho e existem evidências de que seja a responsável pela neovascularização patológica na retina (Ferrara, 2004). Além de ser um potente mitógeno de células endoteliais, possuir ação pró-inflamatória e neuroprotetora, o VEGF aumenta a expressão celular de metaloproteinases, degradando a matriz extracelular e facilitando a penetração dos neovasos no tecido, ao mesmo tempo em que diminui a expressão endotelial de

inibidores de metaloproteinases. Por sua vez, as isoformas VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ não parecem exercer nenhum papel na neovascularização patológica, enquanto o VEGF₁₂₁ parece ser essencial para o funcionamento normal da vasculatura retiniana (Damico, 2007).

O VEGF é um dos principais alvos para o desenvolvimento de terapias anti-angiogênicas devido as suas características: 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; promoção da angiogênese pela ação direta do VEGF sobre as células endoteliais, como uma entidade geneticamente estável. 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 a resistência por parte de linhagens celulares mutantes (Pandya *et al.*, 2006).

3 DOENÇAS OCULARES CAUSADORAS DE NEOANGIOGÊNESE

3.1 Degeneração macular relacionada à idade

Estimativas disponíveis indicam que o custo anual com a cegueira nos EUA chega a U\$13.607,00 por pessoa em benefícios de assistência social e, se houvesse maior empenho em programas de prevenção para o desenvolvimento de doenças oculares com acompanhamentos oftalmológicos regulares e tratamento precoce, a economia para o governo seria de mais de 100 milhões de dólares anuais (Bosco *et al.*, 2005).

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é a principal causa de cegueira em indivíduos acima de 60 anos em países industrializados. A prevalência da perda visual é de 10-15% dos indivíduos acometidos pela doença e estima-se que esse número dobre até o ano de 2030 (Dorrell *et al.*, 2007). Devido à perda progressiva da visão central, a DMRI causa um enorme prejuízo na habilidade dos pacientes em desenvolver atividades diárias, ocasionando um grande impacto em sua qualidade de vida.

A DMRI apresenta-se sob duas formas clínicas distintas: uma forma não exsudativa e uma forma exsudativa ou neovascular (Figura 3). Apesar de a maioria dos pacientes apresentarem a forma não exsudativa da doença, aproximadamente 90% da perda visual relacionada à DMRI é secundária à lesão macular causada pela forma exsudativa (Bressler *et al.*, 2001). A forma neovascular caracteriza-se pelo desenvolvimento de neovasos que penetram no espaço sub-retiniano, pela proliferação de células epiteliais e inflamação, formando a membrana neovascular coroidal (MNVC), um processo conhecido como neovascularização coroidal (NVC) (Brasil, 2008).

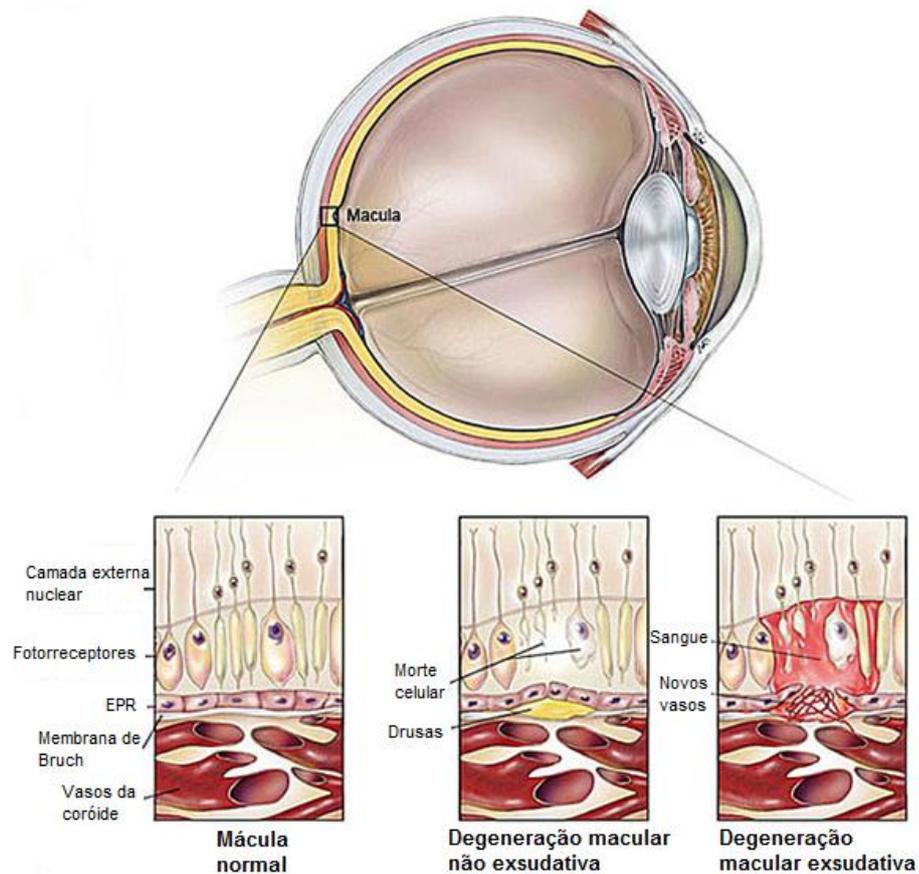


Figura 3 – Desenho esquemático da mácula normal e da mácula afetada pelos dois tipos de degeneração macular relacionada à idade. Fonte: American Health Assistance Foundation (Disponível em www.ahaf.org)

Apesar de ser uma doença complexa e multi-fatorial que envolve tanto a predisposição genética quanto fatores de risco ambientais, existem evidências de que o envelhecimento reduz a capacidade do EPR de reciclar metabólitos, que assim como os lipídeos, se acumulam na membrana de Bruch (Holtz *et al.*, 1994). Esse acúmulo resulta em uma menor capacidade de difusão de oxigênio e VEGF no EPR, levando à hipóxia dos fotorreceptores e atrofia da coriocapilar, que juntamente com a degeneração oxidativa dessas células promove uma inflamação crônica macular. Portanto, o aumento da liberação de VEGF induzida pela hipóxia, associado às alterações na membrana de Bruch resultam na neovascularização e vazamento de fluídos, lipídeos ou lipoproteínas e sangue. Este processo leva à formação de tecido fibroso e cicatricial com desorganização da integridade estrutural da mácula e conseqüente perda irreversível da visão central (Damico, 2007).

Atualmente, o tratamento disponível para a DMRI é apenas paliativo, visando retardar a progressão da doença. Os principais esquemas terapêuticos incluem a fotocoagulação a laser, terapia fotodinâmica com verteporfina, corticosteróides e anti-angiogênicos por meio de injeção intravítrea. Dentre esses tratamentos, apenas dois são cobertos pelo Sistema Único de Saúde: a injeção intravítrea de corticosteróides e a fotocoagulação a laser (Brasil, 2008).

3.2 Retinopatia diabética

A maior causa de perda visual em americanos com idade inferior a 65 anos é o diabetes e suas complicações oculares resultantes do edema macular e neovascularização da retina (Dorrell et al., 2007). Atualmente, estima-se que 7 a 8% da população mundial seja portadora de diabetes mellitus (DM) e, somente nas Américas, em 1996, o número de casos chegou a 30 milhões, o que representa mais de um quarto do total de pessoas acometidas por esse mal no mundo (Bosco et al., 2005). A prevalência no Brasil é comparável à dos países mais desenvolvidos, onde o 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* comprovaram que a hiperglicemia crônica é o fator causal mais importante para o desenvolvimento da microangiopatia, que acomete em particular rins e olhos (Alder e Cringle, 1997). A retinopatia diabética (RD) 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. 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 da doença.

A RD pode ser classificada como proliferativa ou não proliferativa (Figura 4), sendo a primeira a forma mais grave da doença (Kollias e Ulbig, 2010). A RD proliferativa é caracterizada pela formação de novos vasos na retina que crescem em direção à interface vítrea, podendo evoluir para a perda irreversível da acuidade visual,

principalmente pelo descolamento tracional da retina (Alder e Cringle, 1997; Bosco et al., 2005).

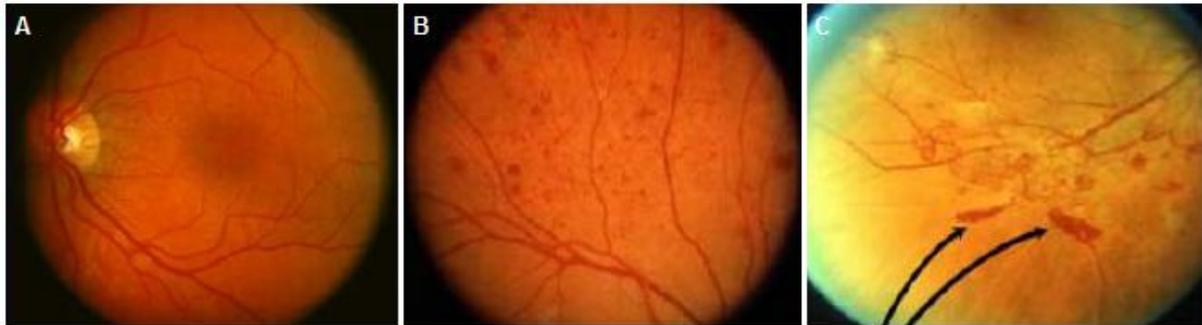


Figura 4 - Angiografias mostrando a retina normal (A); retinopatia diabética não proliferativa (B) e retinopatia diabética proliferativa (C). As setas indicam focos hemorrágicos. Fonte: Mitra, 2010.

Os níveis séricos elevados de glicose induzem a uma série de anormalidades bioquímicas e celulares na retina, que podem provocar as alterações vasculares encontradas na RD. Como exemplo dessas alterações pode-se citar o aumento na atividade da via dos polióis, glicação não-enzimática de proteínas, estresse oxidativo e ativação da proteína kinase C pela síntese de diacilglicerol. Entretanto, até o presente momento, o exato mecanismo, ou o conjunto de mecanismos pelos quais a hiperglicemia leva à retinopatia, permanece obscuro (Fong et al., 2004). Alguns autores demonstraram também que ocorre a adesão dos leucócitos polimorfonucleares à parede do capilar retiniano, levando à sua oclusão, extravasamento vascular, contribuindo para a hipóxia tecidual que estimula, por sua vez, a produção de fatores de crescimento, sendo o fator de crescimento vascular do endotélio o mais importante na angiogênese retiniana (Miyamoto et al., 1999).

Além dos fatores de crescimento, as citocinas inflamatórias, que atuam no sistema imune e no processo inflamatório, também apresentam atividade pró-angiogênica, como as interleucinas, o TNF- α e os interferons α e γ (Cavallo et al., 1991; Andrade et al., 1997). Os vasos neoformados não cumprem a função de barreira, no caso barreira hemato-retiniana, devido ao fato de perderem suas células murais, os pericitos, e tornarem-se acelulares. Desta forma, permitem o extravasamento de componentes séricos e por possuírem o endotélio muito fino, o que os torna frágeis e

fáceis de romper, podem causar hemorragia dentro da cavidade vítrea (Fong et al., 2004).

Os principais esquemas terapêuticos incluem a fotocoagulação a laser, vitrectomia, corticosteróides e anti-angiogênicos por meio de injeção intravítrea. Até o momento, a fotocoagulação é o tratamento comprovadamente eficaz na redução da perda de visão na RD proliferativa (Avard et al., 1996).

3.3 Terapias

3.3.1 Fotocoagulação a laser

A fotocoagulação a laser de argônio ou kriptônio foi desenvolvida a fim de destruir a membrana neovascular coroidal, identificando os neovasos por meio de angiografia, e assim impedir a progressão da doença. Porém, por ser um método destrutivo e não seletivo, a fotocoagulação a laser pode lesionar a parte externa da retina, incluindo os fotorreceptores que estão justapostos ao epitélio pigmentado da retina e à membrana neovascular coroidal, levando à formação de cicatriz fibrogliosa e escotoma no local tratado, além de haver uma alta recorrência ou persistência da neovascularização e aceleração da catarata. (MPS Group, 1991). Dessa forma, as lesões a serem tratadas devem ser bem delimitadas e em localização extrafoveal ou justafoveal para evitar a formação de um escotoma central (Brasil, 2008). Com a substituição do laser de Xenônio pelo de Argônio, o índice de perda visual periférica caiu de 40 para 10% (Ferris, 1993). Atualmente, está sendo utilizado o laser de diodo de comprimento de onda igual a 532 nm, mais eficaz e barato que os citados anteriormente (Kollias e Ulbig, 2010).

Atualmente, as principais indicações para imediata intervenção são a hemorragia vítrea ou pré-retiniana, a neovascularização atingindo um terço ou mais do disco óptico e edema macular, pois a chance de indivíduos que apresentam essas alterações perderem seriamente a visão num período de dois anos é de 25 a 50%, (Leese, 2000).

3.3.2 Terapia fotodinâmica com verteporfina (TFD-V)

A terapia fotodinâmica com verteporfina foi desenvolvida como uma alternativa à termofotocoagulação a laser. Ela consiste na administração intravenosa de um fármaco fotossensibilizante, a verteporfina, seguida de sua ativação por meio de um laser com o mesmo comprimento de onda de absorção do fármaco utilizado, que fica retido no tecido neovascular. Desta forma, o tratamento é seletivo às áreas que contém o corante, reduzindo o risco de lesões na retina em comparação com a fotocoagulação a laser (Bressler, 2001).

3.3.3 Vitrectomia

A vitrectomia é um procedimento cirúrgico realizado para a retirada de hemorragia vítrea recorrente e de longa duração (maior que um mês) e tratamento do descolamento de retina tracional macular provocado pelo tecido fibro-vascular contrátil neoformado (Bosco et al., 2005).

3.3.4 Terapias antiangiogênicas

3.3.4.1 Pegaptanibe

O pegaptanibe sódico foi o primeiro inibidor da angiogênese utilizado na farmacoterapia intraocular. É um aptâmero que se liga com uma alta afinidade e especificidade ao domínio de ligação da heparina da molécula de VEGF₁₆₅, impedindo a sua ligação com o receptor. O pegaptanibe é administrado por meio de injeção intravítrea em intervalos de seis semanas para o tratamento de retinopatias proliferativas (Prasad et al., 2010).

Gragoudas e colaboradores (2004) demonstraram que a injeção de pegaptanibe sódico reduz o risco de perda visual moderada de 70% para 55% e de perda visual severa de 22% para 10% em pacientes com a forma exsudativa da DMRI, com efeitos adversos oculares e sistêmicos insignificantes.

3.3.4.2 Bevacizumabe

O Bevacizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado, produzido por tecnologia de DNA recombinante que assim como o ranibizumabe, se liga a todas as isoformas do VEGF, inibindo desta forma sua ligação aos seus receptores na superfície das células endoteliais. Este anticorpo é constituído por 214 aminoácidos e tem uma massa molecular de aproximadamente 149 kDa (FDA, 2004). O Bevacizumabe foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) em fevereiro de 2004, em janeiro de 2005 pela European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) e está registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desde maio de 2005. Esse fármaco foi aprovado pelo FDA para o tratamento de carcinoma colorretal metastático e é utilizado como um agente quimioterápico em vários tipos de tumores (Prasad *et al.*, 2010), no entanto, a terapia por via sistêmica está associada ao aumento do risco de eventos tromboembólicos (Schouten *et al.*, 2009).

Além da aplicação do Bevacizumabe no tratamento de vários tipos de câncer, o fármaco vem sendo utilizado por meio de injeções intravítreas em doenças oftalmológicas decorrentes da angiogênese excessiva, tais como a RD e a DMRI (Rosenfeld *et al.*, 2005; Augustin, 2006; Bashshur *et al.*, 2006; Pandya *et al.*, 2006).

3.3.4.3 Ranibizumabe

O ranibizumabe, um anticorpo monoclonal humanizado recombinante, foi desenvolvido a partir da fragmentação do bevacizumabe e se liga com alta afinidade

a todas as isoformas do VEGF. Com massa molecular reduzida em relação ao bevacizumabe, o ranibizumabe pode penetrar mais rapidamente no espaço sub-retiniano e coroideano. O tratamento da forma exsudativa da DMRI é realizado por meio de injeções intravítreas mensais, sendo o paciente monitorado quanto à sua acuidade visual. Assim como o pegaptanibe, o ranibizumabe não apresenta efeitos adversos estatisticamente relevantes, porém foi demonstrado um aumento no risco de doenças tromboembólicas (Rosenfeld et al., 2006).

4 ÁCIDO ROSMARÍNICO

Antes mesmo da estrutura química do ácido rosmarínico (AR) ter sido elucidada (Figura 5), essa substância e compostos semelhantes eram conhecidos como um tipo de tanino derivado das espécies da família Lamiaceae. Em 1958, dois químicos italianos, Scarpati e Oriente, isolaram pela primeira vez o ácido rosmarínico a partir das folhas de *Rosmarinus officinalis* L. e mais tarde de outras espécies das famílias Lamiaceae e Boraginaceae. Sua estrutura foi elucidada como sendo um éster do ácido cafeico e do ácido 3,4-dihidroxifenilático (Scarpati e Oriente, 1958). Ellis e Towers (1970) realizaram estudos biogénéticos que demonstraram que o ácido cafeico deriva do aminoácido fenilalanina e o ácido 3,4-dihidroxifenilático da tirosina. Esses resultados foram confirmados em um experimento com culturas de células de *Coleus blumei* realizado por Razzaque e Ellis (1997).

Esse derivado do ácido cafeico solúvel em água apresenta uma série de atividades biológicas, o que levou a uma ampla aplicação na indústria, de conservante alimentício ao uso em cosméticos (Peterson e Simmonds, 2003; Jiang et al., 2005). A atividade antioxidante do AR é maior que a da vitamina E (Lin et al., 2002).

Estudos demonstraram que o AR possui atividade antiviral (Swarup et al., 2007), incluindo uma ação contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (Mazumber et al., 1997; Hooker et al., 2001), antibacteriana, antioxidante, antiinflamatória, anticarcinogênica (Osakabe et al., 2004; Huang e Zheng, 2006; Lee et al., 2007) anti-alérgica (Makino et al., 2001; Sanbongi et al., 2004) e antitrombótica (Zou et al., 1993). Este fármaco é também eficiente contra danos peroxidativos à biomembranas (Liu et al., 1992) e possui uma importante atividade anti-proliferativa (Huang e Zheng, 2006).

Zhang e colaboradores (2011) relataram que o AR inibe a proliferação e induz a apoptose de células hepáticas estreladas, contribuindo assim, para a reversão da fibrose hepática. Além disso, ele é bem absorvido pelo trato gastrointestinal e pela pele, sendo rapidamente eliminado da circulação sanguínea após a administração intravenosa, apresentando uma baixa toxicidade em camundongos, com DL₅₀ de 561 mg/Kg.

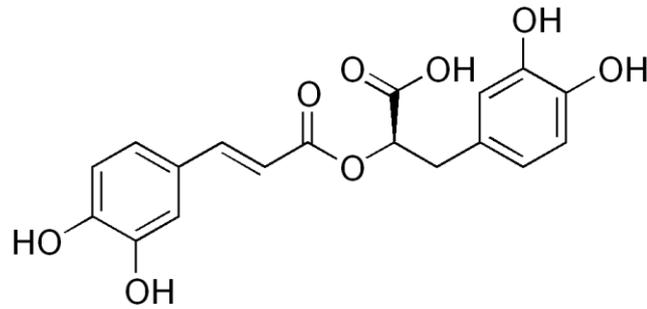


Figura 5 - Ácido rosmarínico

4.1 Atividade antiangiogênica do ácido rosmarínico

A angiogênese é um complexo processo que inclui a degradação da membrana basal, proliferação, migração e adesão das células epiteliais, além da formação de tubo pelas mesmas. Huang e Zheng (2006) demonstraram por meio de um ensaio *in vitro* que o AR inibe todas as etapas importantes do processo da angiogênese citadas acima. Além disso, devido à atividade antioxidante do AR, este promoveu a liberação reduzida de IL-8 e uma redução no nível de espécies reativas do oxigênio nas células endoteliais. Essas espécies estão diretamente relacionadas ao stress oxidativo celular que leva a um aumento na expressão do VEGF e conseqüente neovascularização (Huang e Zheng, 2006).

Kim e colaboradores (2009) demonstraram que o AR inibe significativamente a proliferação induzida por VEGF das células endoteliais da retina e induz a interrupção do ciclo celular na fase G₂/M, que está associada ao aumento da expressão de p21^{WAF1}, o que pode ser a causa de sua atividade anti-proliferativa. O p21 é o alvo transcricional do gene supressor de tumor p53, que leva à paralisação do ciclo celular. Assim, esse estudo demonstrou que o AR pode ser utilizado como um agente antiangiogênico efetivo sem apresentar, no entanto, toxicidade à retina já que a concentração terapêutica encontrada para a inibição da neovascularização da retina em um modelo experimental de retinopatia de prematuridade (50 µM) foi muito menor que a IC₅₀ (480 µM) determinada para as células endoteliais (Huang e Zheng, 2006).

5 LIMITAÇÕES NA ADMINISTRAÇÃO OFTÁLMICA DE FÁRMACOS

As características anatômicas e fisiológicas do bulbo do olho são fatores que limitam o tratamento farmacológico de doenças oculares.

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. Essa via apresenta maior facilidade de aplicação e comodidade para o paciente, entretanto, as preparações tópicas são, muitas vezes, ineficazes em razão de sua baixa biodisponibilidade devido a fatores biológicos que protegem o olho e, conseqüentemente, limitam a entrada dos fármacos. Tais fatores incluem a impermeabilidade relativa do epitélio corneano, a drenagem nasolacrimal e as características físico-químicas implícitas ao fármaco (Fialho e Cunha Junior, 2007; del Amo e Urtili, 2008; Eljarrat-Binstock *et al.*, 2010).

A córnea é constituída por três camadas: o epitélio, o estroma e o endotélio, sendo os dois primeiros os responsáveis pela considerável impermeabilidade deste tecido (Figura 6). O epitélio externo estratificado não pavimentoso e não queratinizado permite a passagem de moléculas pequenas e lipofílicas. Já o estroma, tecido intermediário e hidrofílico constituído por lamelas de tecido fibroso e por grande quantidade de água, é seletivo à penetração de moléculas lipofílicas que apresentam certa afinidade pela porção aquosa, expressa pelo coeficiente de partição óleo em água. Dessa forma, apenas moléculas de pequena massa molecular e de caráter parcialmente lipofílico conseguem atravessar os três tecidos da córnea (Järvinen *et al.*, 1995).

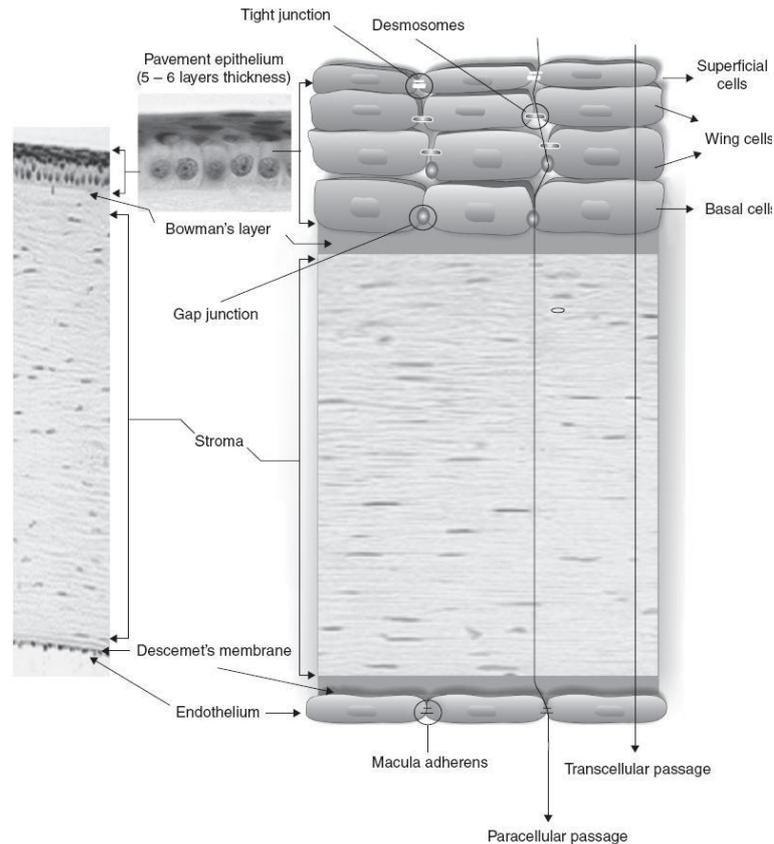


Figura 6 - A córnea como uma barreira à absorção de fármacos pela via tópica. Fonte: Mitra (2010).

Mecanismos de renovação do humor aquoso e a própria existência de vasos sanguíneos são os principais responsáveis pela eliminação precoce dos fármacos, impossibilitando que seja atingida a dose terapêutica efetiva. Os fármacos são eliminados da câmara anterior pela reciclagem do humor aquoso e pela presença de circulação sanguínea na porção da úvea anterior. Aqueles presentes no humor vítreo são eliminados pela câmara anterior, pela barreira hematorretiniana e pela própria circulação sanguínea (Järvinen et al., 1995).

Estima-se que menos de 5% da dose administrada pela via tópica é absorvida e atinge os tecidos intra-oculares, 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 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 facilitam a administração por meio de injeções periorbitais. Os principais riscos relacionados a esta via incluem a perfuração do bulbo do olho, a fibrose dos músculos extra-oculares e a ocorrência de endoftalmite (Olsen *et al.*, 1998; Ambati *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002; Gupta *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 que é a barreira hemato-ocular, compreendida pelas barreiras hemato-aquosa e hematorretiniana (Figura 7). Por esta razão, a utilização dessa 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).

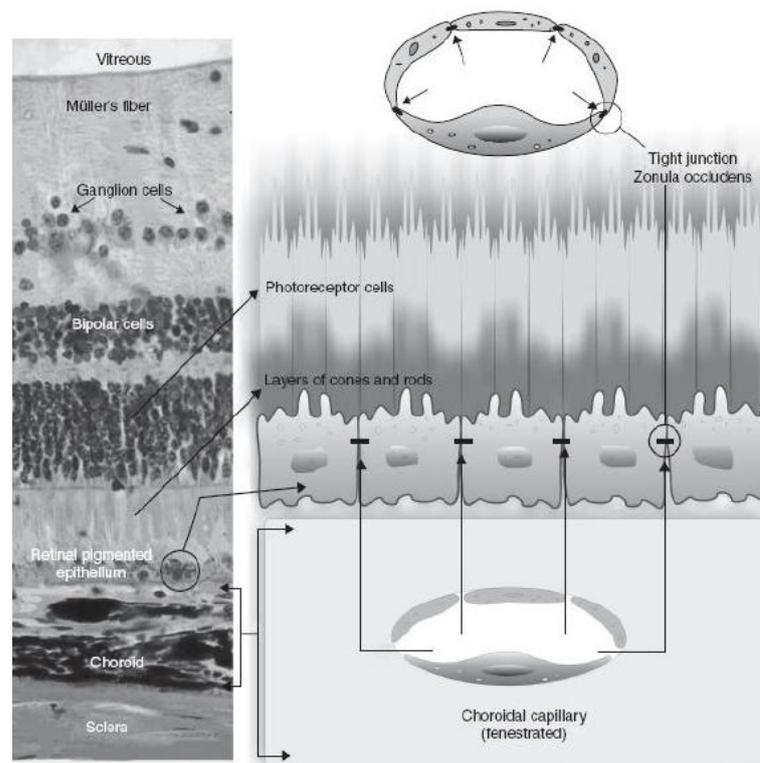


Figura 7 - A barreira hematorretiniana. Fonte: Mitra (2010).

Já a injeção intravítrea constitui uma alternativa à aplicação tópica e sistêmica. 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 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. As injeções intravítreas repetidas, no entanto, podem causar sérias complicações, tais como hemorragia intraocular, descolamento de retina, endoftalmite e catarata, além de proporcionar um enorme desconforto ao paciente (Fialho e Cunha Junior, 2007; Lee *et al.*, 2010).

Pesquisas têm sido realizadas a fim de desenvolver sistemas de administração intra-oculares que permitam liberar concentrações terapêuticas dos fármacos prolongadamente. Tais sistemas proporcionam inúmeras vantagens, como o aumento da biodisponibilidade; liberação prolongada; redução de efeitos adversos sistêmicos e na frequência de injeções intravítreas, reduzindo as suas complicações e aumentando o conforto e a adesão do paciente ao tratamento.

6 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA DE FÁRMACOS

Os termos liberação prolongada, lenta ou sustentada são aplicados às formas farmacêuticas desenvolvidas para liberarem o fármaco gradualmente, mantendo a concentração no local de ação dentro de níveis terapêuticos, por período de tempo prolongado. Essas formas farmacêuticas requerem administrações menos freqüentes 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 forma farmacêutica sólida e a possibilidade de utilização das mesmas em sistemas monolíticos (matriciais) ou multiparticulados (sistemas do tipo reservatório) aumenta a sua versatilidade. Esses sistemas serão posteriormente discutidos.

6.1 Sistemas de transporte de fármacos

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.

Sistemas de liberação controlada tornam-se, dessa forma, essenciais para o tratamento de doenças oculares.

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 importante fator para a aplicação clínica, seja avaliada (Fialho *et al.*, 2003).

Para o tratamento de doenças do segmento posterior do olho, em que são necessárias administrações intraoculares freqüentes, o desenvolvimento de implantes de liberação prolongada de fármacos se torna promissor e constitui um dos campos mais pesquisados em terapêutica oftálmica atualmente.

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 *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 intra-oculares.

6.2 Sistemas poliméricos

Os polímeros utilizados nos sistemas de liberação prolongada de fármacos devem ser quimicamente inertes, não-carcinogênicos, hipoalergênicos e não-causadores de resposta inflamatória no local de aplicação (Athanasίου *et al.*, 1996).

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

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 dessa é dependente de sua difusão pelo sistema, podendo diferir se ela estiver dissolvida molecularmente ou dispersa 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.

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 podem apresentar vantagens sobre os anteriores, pois são totalmente absorvidos pelo organismo, não necessitando de uma remoção posterior, o que proporciona melhor aceitação e adesão do paciente ao tratamento.

Entre os polímeros classificados como biodegradáveis, encontram-se os poliuretanos, os copolímeros do ácido láctico e glicólico e a poli- ϵ -caprolactona.

Para que os sistemas poliméricos sejam eliminados do organismo, três principais mecanismos de degradação são descritos (Merkli, 1998):

- a) **Erosão simples:** este mecanismo está relacionado aos polímeros solúveis em água e que se tornaram insolúveis devido à formação de ligações cruzadas. 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 por meio da rede polimérica, independente da velocidade de degradação matricial. Entre os principais polímeros desta categoria, destacam-se a gelatina, o colágeno e o álcool polivinílico;

- b) **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 - PVM/MA) é um exemplo de polímero que sofre este tipo de erosão;
- c) **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. Esse 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 poliortoésteres e os poliuretanos.

6.3 Polímeros e copolímeros derivados dos ácidos lático e glicólico

Entre as diferentes classes de polímeros biodegradáveis, a dos polímeros e copolímeros derivados dos ácidos lático e glicólico, como o ácido poli-lático (PLA), o ácido poli-glicólico (PGA), e especialmente copolímero de ácido lático e glicólico o ácido poli lático-co-glicólico (PLGA) têm gerado enorme interesse devido às suas propriedades favoráveis, tais como biocompatibilidade, cinética previsível de biodegradação e resistência mecânica (Rajeev, 2000).

No final da década de 1960 e início dos anos 1970, vários grupos de pesquisadores haviam publicado trabalhos sobre a utilidade desses polímeros como fios de suturas. Esses fios apresentavam diversas vantagens como boas propriedades mecânicas, baixa imunogenicidade e toxicidade, biocompatibilidade excelente e cinética previsível de biodegradação. A ampla aceitação dos polímeros de ácido lático / ácido glicólico como material de sutura despertou o interesse de vários pesquisadores quanto as aplicações biomédicas, como a reconstrução de ligamentos, substituição

traqueal, enxertos vasculares, nervosos, dentais e em fraturas. Essas substâncias obtiveram aprovação pelo FDA para a utilização como sistemas de liberação de drogas, existindo diversos estudos demonstrando sua baixa toxicidade (Jain, 1998).

A biodegradação desses polímeros ocorre por erosão, por meio de clivagem da cadeia polimérica por hidrólise, liberando os ácidos lático e glicólico. Esses ácidos, por serem metabólitos naturais do organismo, são eliminados pelo ciclo de Krebs na forma de gás carbônico e água (Fialho *et al.*, 2003).

A presença do grupo metila no polímero derivado do ácido lático confere a este uma maior hidrofobicidade quando comparado ao derivado do ácido glicólico (PGA). O PGA, portanto, por ser bastante sensível à hidrólise, não é adequado para a utilização em sistemas de liberação de fármacos. Com relação ao PLGA, quanto maior a proporção de ácido lático, maior a hidrofobicidade do copolímero, já que absorve menos água, e conseqüentemente, menor será a velocidade de degradação.

Os principais fatores responsáveis por alterações no período de degradação dos polímeros biodegradáveis são: estrutura química e composição do sistema; distribuição da massa molecular dos polímeros; presença de monômeros e oligômeros; tamanho e forma da superfície do sistema; morfologia dos componentes do sistema (amorfo, semicristalino, cristalino); local de implantação do sistema e mecanismo de hidrólise.

A temperatura de transição vítrea (T_g) dos diferentes tipos de PLA e PLGA se encontra acima da fisiológica (37°C) e, nessa condição, eles se encontram na forma cristalina. Desse modo, a cadeia se apresenta como uma estrutura relativamente rígida, proporcionando uma força mecânica significativa e permitindo que sejam formulados como sistemas de liberação de fármacos. Essa característica é, também, um fator determinante da velocidade de degradação dos polímeros já que está relacionada ao grau de cristalinidade e à organização das cadeias poliméricas. Portanto, o polímero que apresenta maior T_g , geralmente se degrada mais lentamente. O PLGA 75:25 apresenta T_g igual a 60°C e seu tempo de degradação é de aproximadamente 2 a 4 meses (Fialho *et al.*, 2003).

Com a finalidade de se obterem níveis terapêuticos adequados do fármaco no segmento posterior do bulbo do olho, sistemas preparados a partir de polímeros biodegradáveis (principalmente os derivados dos ácidos lático e glicólico) estão sendo investigados para utilização no tratamento de várias doenças, dentre as quais pode-se destacar: proliferação vítreo-retiniana, retinite causada por citomegalovírus, endoftalmites, uveítes, DMRI, RD e edema macular pós-operatório.

Fialho e colaboradores (2006) desenvolveram e avaliaram um implante biodegradável contendo dexametasona e PLGA preparado com a finalidade de tratar doenças inflamatórias do segmento posterior do olho. Nesse estudo, a taxa de liberação do fármaco, avaliada *in vivo*, foi considerada adequada e nenhum sinal de citotoxicidade foi observado. Os resultados obtidos demonstraram a viabilidade do sistema desenvolvido e, em um novo estudo, realizado em 2007, um novo implante, também constituído de dexametasona e PLGA, foi desenvolvido (Fialho et al., 2007). Esse implante foi projetado para ser inserido no vítreo através de um trocater transescleral de calibre 25 gauge. Essa forma de implantar o dispositivo pode ser considerada uma revolução, pois o processo torna-se minimamente invasivo (Figura 8). Uma solicitação para avaliação clínica desse implante encontra-se em avaliação junto à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

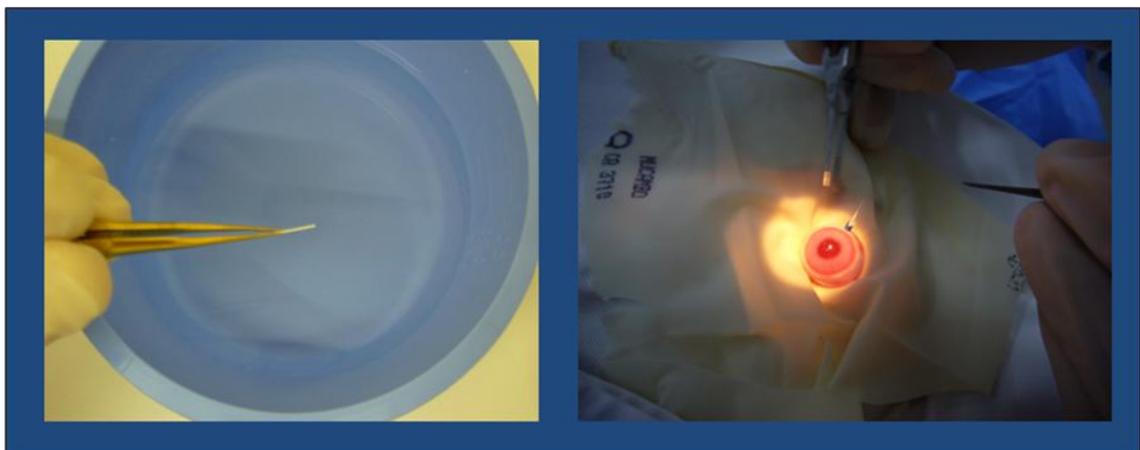


Figura 8 - Fotografia do implante de PLGA e dexametasona de implantação não cirúrgica.

Também utilizando o método acima descrito, Saliba (2011) desenvolveu, caracterizou e avaliou a farmacocinética e a toxicidade de implantes constituídos de

PLGA e ciclosporina A destinados ao tratamento de uveíte posterior. Os resultados obtidos foram considerados promissores e novos estudos encontram-se em andamento, também com o objetivo de subsidiar uma solicitação de estudos clínicos.

JUSTIFICATIVA

A DMRI tem sido a maior causa indolor da perda da visão central e a principal causa de cegueira em pessoas acima de 60 anos. A RD afeta cerca da metade dos pacientes diabéticos e é a maior causa de cegueira legal em indivíduos com menos de 65 anos. Essas doenças são decorrentes de processos de neovascularização no segmento posterior do olho. A administração intravítrea 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 ácido rosmarínico, um polifenol hidrofílico, com promissora atividade anti-proliferativa e antiinflamatória, apresenta baixa toxicidade e baixo custo, além de seu efeito inibidor da angiogênese ser promissor para o tratamento da DMRI e da RD. Assim, o desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada para o ácido rosmarínico, 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.

A presente dissertação constitui a primeira etapa dessa proposta. Nela são descritas as etapas de desenvolvimento e caracterização dos sistemas bem como estudos iniciais de atividade biológica.

OBJETIVOS

1 OBJETIVO GERAL

Este projeto tem como objetivo o desenvolvimento e a caracterização de um sistema de liberação prolongada de ácido rosmarínico a partir de um polímero biodegradável, o PLGA, visando posteriormente, o tratamento de doenças oculares causadoras de neoangiogênese.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolvimento dos sistemas de liberação prolongada contendo o ácido rosmarínico;
- b) Caracterização dos sistemas;
- c) Avaliação da atividade biológica do fármaco livre e a partir do sistema desenvolvido;
- d) Estudo de liberação *in vitro*.

PARTE I

Validação da metodologia analítica de quantificação do ácido rosmarínico

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Materiais

- Ácido rosmarínico, teor de pureza de 96% - Sigma Aldrich, Alemanha;
- Ácido poli(D,L-lático-co-glicólico) na proporção de 75:25 - Boehring Inselheim, Alemanha;
- Cloreto de sódio - Synth, Brasil;
- Fosfato de sódio Bibásico anidro - Synth, Brasil;
- Fosfato de potássio monobásico anidro - Synth, Brasil;
- Metanol grau CLAE – T.J.Baker, USA;
- Água MiliQ.

1.2 Métodos

Para o desenvolvimento do método analítico e posterior quantificação do AR, foram utilizados espectrofotômetro Hewlett Packard® HP 8453 e cromatógrafo a 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 Ace® 5 C18, de 4,6 mm de diâmetro e 250 mm de comprimento, com tamanho de partícula de 5 µm (ACT Ace, Escócia).

1.2.1 Desenvolvimento do método analítico

O método analítico de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) foi empregado para a determinação e quantificação do AR no teste de liberação *in vitro* dos implantes desenvolvidos. A validação foi realizada conforme a RE 899 da

Agência Nacional de Vigilância Sanitária, com o objetivo de demonstrar que o método é apropriado para a determinação quantitativa do fármaco e assegurar a confiabilidade dos resultados (Brasil, 2003).

A fim de definir as condições ideais para análise em CLAE, primeiramente definiu-se os parâmetros de análise, como o comprimento de onda de detecção, a fase móvel e o fluxo.

1.2.1.1 Determinação do comprimento de onda de detecção

A fim de se definir o melhor comprimento de onda de detecção para análise, no qual ocorre o máximo de absorção, foi realizada a varredura do fármaco entre os comprimentos de onda de 200 a 400 nm. Para isso, foi utilizada uma solução de 25 µg/mL de RA em tampão PBS pH 7,4 e espectrofotômetro Hewlett Packard HP 8453.

1.2.1.2 Determinação da fase móvel e fluxo

A fase móvel escolhida para ser utilizada no estudo, metanol/água (0,5% H₃PO₄) na proporção 50:50 (v/v), foi adaptada de Long e colaboradores (2010) e Oliveira (2010). Visando redução de custo e de tempo de análise, foram avaliados três diferentes fluxos para a fase móvel (0,6, 0,8 e 1,0 mL/min).

1.2.2 Validação do método analítico

Na RE RE nº 899, de 29 de maio de 2003, a ANVISA determina os testes a serem realizados para a validação de um método analítico segundo a categoria da análise descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Classificação dos testes, segundo sua finalidade

Categoria	Finalidade do teste
I	Determinação de princípios ativos em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaios limite para determinar impurezas de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (ex. dissolução, liberação de ativo)
IV	Testes de identificação

Fonte: (Brasil, 2003)

Para cada categoria (I a IV), é exigida uma série de testes, especificados na Tabela 2:

Tabela 2 – Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo a sua categoria

Parâmetro	Categoria I	Categoria II Quantitativo	Categoria II Ensaio limite	Categoria III	Categoria IV
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

*Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

**Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária.

Fonte: (Brasil, 2003)

O método analítico desenvolvido nesse trabalho se enquadra na categoria III, visto que será utilizado para a quantificação do AR no teste de liberação *in vitro* dos implantes desenvolvidos. Assim, após a definição das condições cromatográficas mais adequadas, foram realizados os seguintes experimentos para validação do

método: especificidade e seletividade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária e exatidão.

1.2.2.1 Especificidade e seletividade

É a capacidade do método de quantificar exatamente um composto na presença de interferentes, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (Brasil, 2003).

A especificidade do método foi avaliada pela comparação dos picos obtidos da análise de uma amostra de tampão PBS pH 7,4 (Tabela 3), de solução de AR 50 µg/mL em tampão e dos produtos de degradação do polímero PLGA 75:25, obtidos após incubação dos implantes brancos em tampão por 7 dias a 37 °C e rotação de 30 r.p.m.

Tabela 3 – Composição do tampão PBS, pH 7,4

Componentes	Quantidade (g)
Fosfato de sódio bibásico anidro	2,38
Fosfato de potássio monobásico anidro	0,19
Cloreto de sódio	8,0
Água destilada	q.s.p 1000 mL

1.2.2.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo específico. Este parâmetro deve ser avaliado a partir da análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes, sendo os resultados tratados por métodos estatísticos adequados para a determinação do coeficiente de correlação (r), intersecção com o eixo y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos

da regressão linear e desvio padrão relativo. O coeficiente de correlação deve ser, no mínimo, 0,99 (Brasil, 2003).

Para a construção das curvas analíticas foram preparadas três soluções estoque de RA na concentração de 200 µg/mL em tampão PBS pH 7,4, a partir das quais, por meio de diluições seriadas, foram obtidas 6 concentrações teóricas (100, 40, 20, 8, 4 e 2 µg/mL). Os dados obtidos foram tratados estatisticamente para determinação da equação da reta (método dos mínimos quadrados) e dos coeficientes de correlação (r) e (r^2), utilizando o software GraphPad Prism® 5. A curva de calibração foi construída plotando-se os valores referentes às áreas dos picos no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações do analito no eixo das abscissas.

1.2.2.3 Precisão

A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, sendo considerada a precisão intracorrída (repetibilidade) e a intercorrídas (intermediária). A repetibilidade é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e instrumentação. Já a precisão intermediária é concordância entre os resultados do mesmo laboratório obtidos em dias diferentes, com analistas e/ou equipamentos diferentes (Brasil, 2003). Esse parâmetro pode ser expresso como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), devendo os valores ser inferiores a 5%.

$$DPR = \frac{DP}{Y} \times 100 \quad (1)$$

$$DP = \sqrt{\frac{\sum(x-y)^2}{n-1}} \quad (2)$$

Onde:

DPR = desvio padrão relativo

DP = desvio padrão absoluto

Y = área média

X = área medida

n = número de amostras

A repetibilidade foi avaliada pela injeção em triplicata de quatro concentrações diferentes (2, 20, 50 e 100 µg/mL), totalizando 12 determinações. A precisão intermediária foi avaliada do mesmo modo, porém, as análises foram realizadas em dois dias diferentes. O resultado foi expresso em % (DPR).

1.2.2.4 Exatidão

A exatidão avalia a proximidade dos resultados obtidos pela metodologia em estudo em relação ao valor verdadeiro. O parâmetro engloba a análise do fármaco, da forma farmacêutica e de impurezas, devendo ser realizada após determinação da linearidade e especificidade, com no mínimo 9 determinações, ou seja, triplicata de uma concentração baixa, média e alta do analito. É expressa como:

$$Exatidão = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (3)$$

A exatidão foi determinada durante o teste de liberação *in vitro* ao incubar Implantes de PLGA branco em um meio contendo PBS com concentrações conhecidas de AR. As amostras utilizadas para a validação foram diluídas em tampão PBS pH 7,4 até concentração final de 20, 50 e 80 µg/mL, analisadas em triplicata.

1.2.2.5 Limite de detecção

O limite de detecção é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser detectado pelo método que está sendo validado, porém não necessariamente quantificado. Ele pode ser calculado 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.

$$LD = \frac{3DP_a}{b} \quad (4)$$

Onde:

LD = limite de detecção

DP_a = desvio padrão do intercepto médio das três curvas de linearidade

b = coeficiente angular da curva média

1.2.2.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis, sendo calculado da mesma forma que o limite de detecção, porém, multiplicando-se os valores por 10,0.

$$LQ = \frac{10DP_a}{b} \quad (5)$$

Onde:

LQ = limite de quantificação

1.2.2.7 Estabilidade

Foi realizada uma avaliação preliminar da estabilidade do fármaco nas condições utilizadas para o teste de liberação *in vitro*. O RA 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.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Desenvolvimento do método analítico

Através da varredura realizada em espectrofotômetro na faixa de 200 a 400 nm, utilizando uma solução de AR na concentração de 25 µg/mL, determinou-se o comprimento de onda λ de maior absorção do fármaco como sendo de 331 nm, que foi utilizado para as análises em CLAE (Figura 9). O resultado encontrado está de acordo com dados descritos na literatura (Wang et al., 2004).

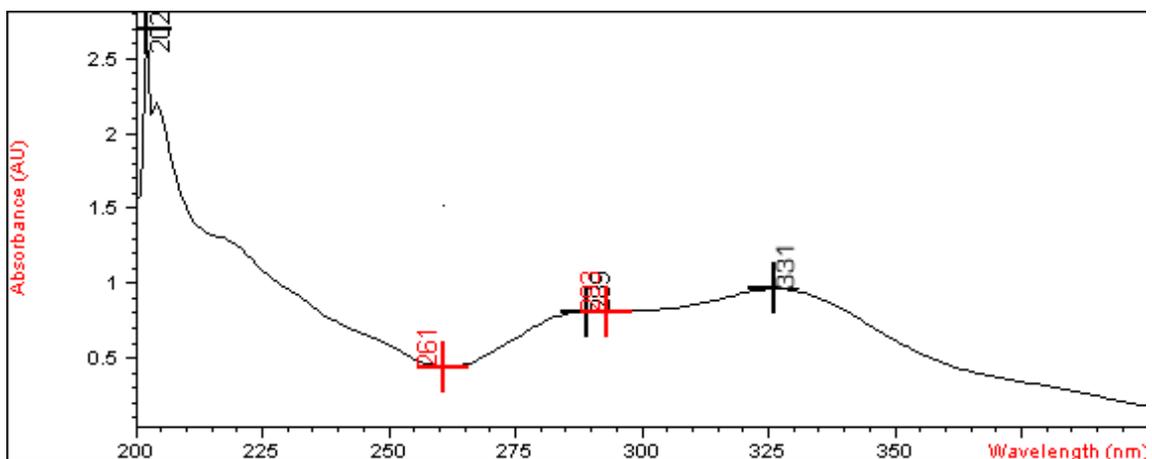


Figura 9 – Espectro de varredura do ácido rosmarínico no ultravioleta, onde pode ser observado o λ máximo de absorção em 331 nm.

Para a determinação dos parâmetros a serem utilizados na CLAE, foi utilizada uma solução de AR na concentração de 50 µg/mL. Foram avaliados os fluxos de 0,6, 0,8 e 1,0 mL/min, sendo considerados para a escolha, a resolução do pico e o tempo de retenção do fármaco. Os cromatogramas obtidos para cada fluxo são mostrados nas Figuras 10, 11 e 12, onde se pode observar que não houve alteração na simetria dos picos com o aumento do fluxo. Contudo, foi escolhido o fluxo de 0,8 mL/min, a fim de se obter uma melhor separação do pico referente ao AR em relação aos picos do

tampão PBS (utilizado no teste de liberação *in vitro*) e dos produtos de degradação do polímero (PLGA). Obteve-se assim, um tempo de retenção (T_r) do AR de 8,63 minutos, sendo o tempo de corrida determinado em 10 minutos. As condições cromatográficas adotadas estão apresentadas na Tabela 4.

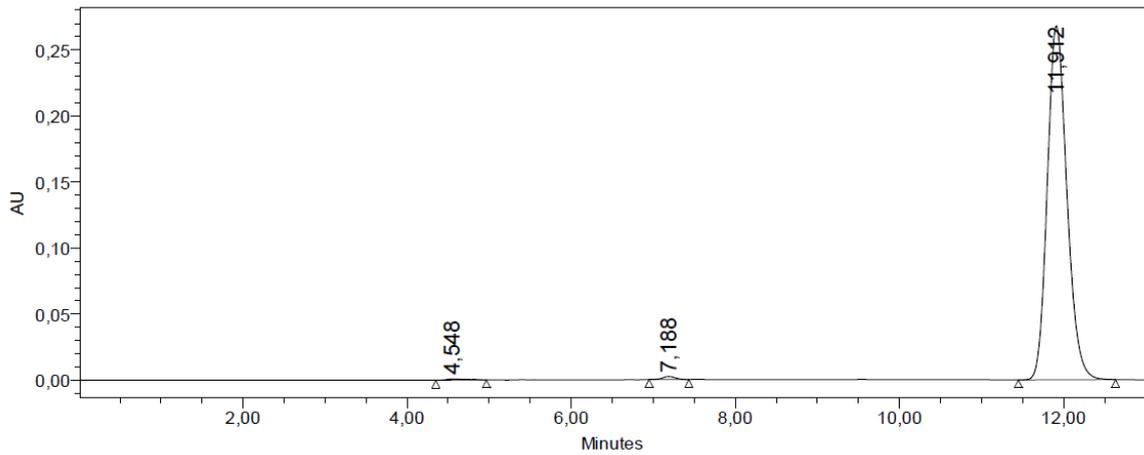


Figura 10 – Cromatograma do ácido rosmarínico (50 µg/mL) com fluxo de 0,6 mL/min.

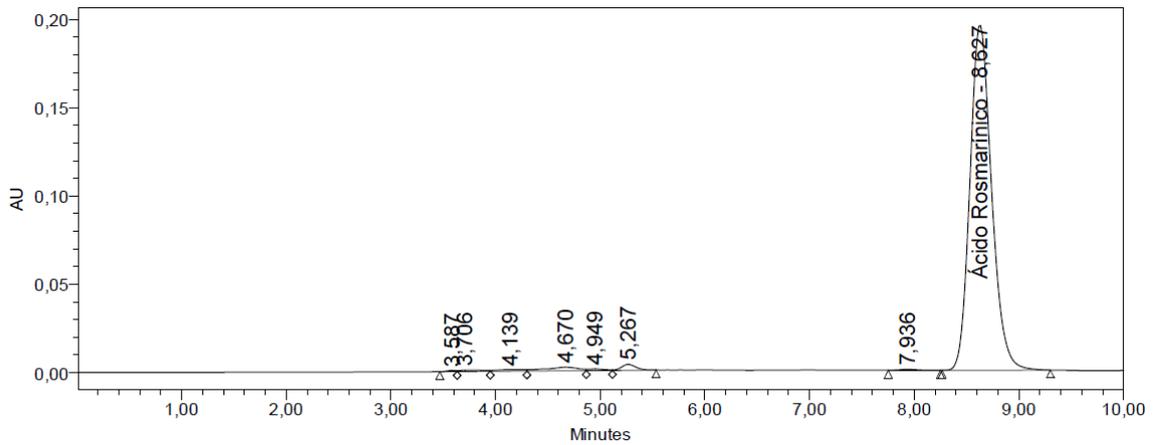


Figura 11 – Cromatograma do ácido rosmarínico (50 µg/mL) com fluxo de 0,8 mL/min.

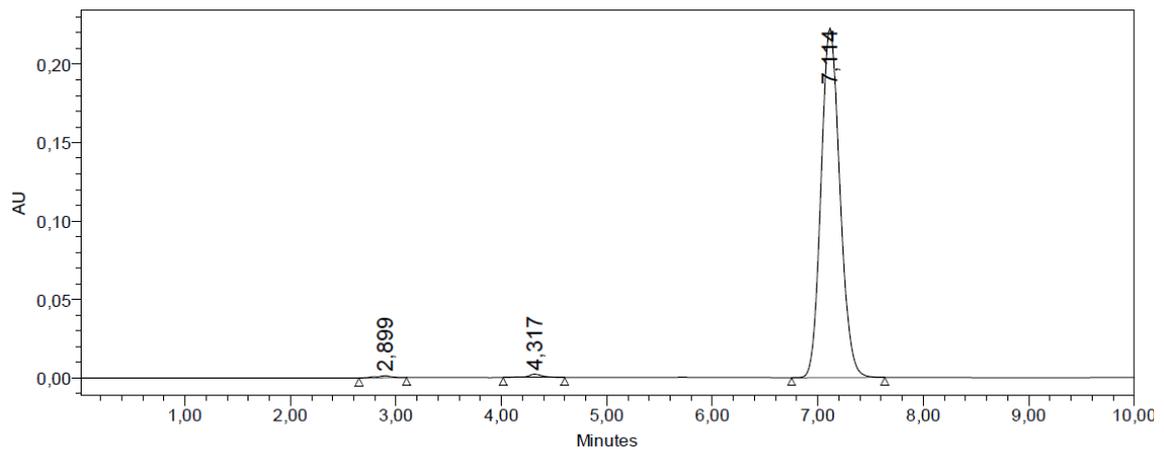


Figura 12 – Cromatograma do ácido rosmarinico (50 µg/mL) com fluxo de 1,0 mL/min.

Tabela 4 – Parâmetros cromatográficos adotados na validação do método analítico de quantificação do AR

Fase móvel	Fluxo (mL/min)	Modo do fluxo	Comprimento de onda no UV (nm)	Volume de injeção	Temperatura
Metanol:Água (0,5% H ₃ PO ₄) (50:50)	0,8	Isocrático	331	20 µL	Ambiente (±25°C)

2.2 Validação do método analítico

Conforme descrito anteriormente, o método desenvolvido nesse trabalho para a quantificação de AR foi validado segundo os parâmetros de especificidade, seletividade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez.

2.2.1 Especificidade e seletividade

Para a avaliação da especificidade do método foram comparados os picos obtidos da análise de uma amostra de tampão PBS pH 7,4 (Figura 13), dos produtos de degradação do PLGA 75:25 (Figura 14) e de uma solução de AR 50 µg/mL em tampão (Figura 15).

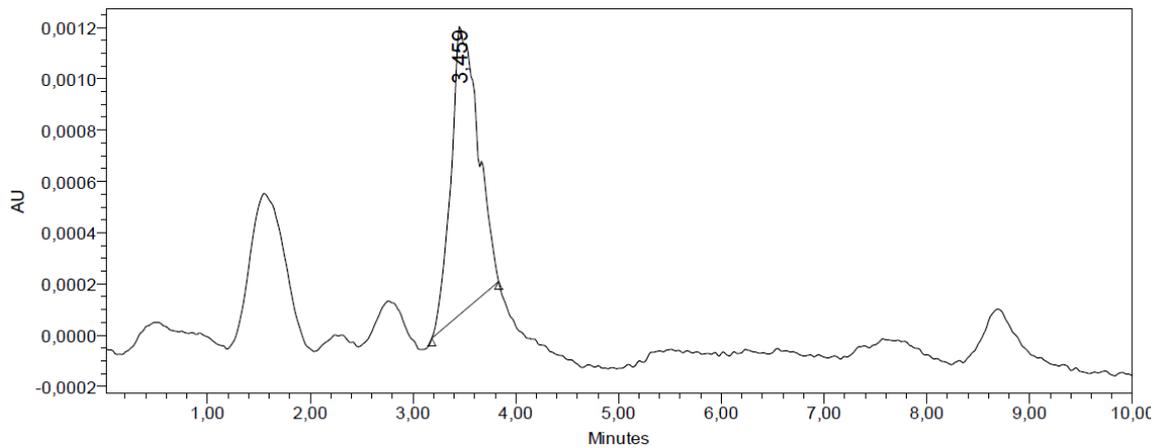


Figura 13 – Cromatograma obtido do PBS.

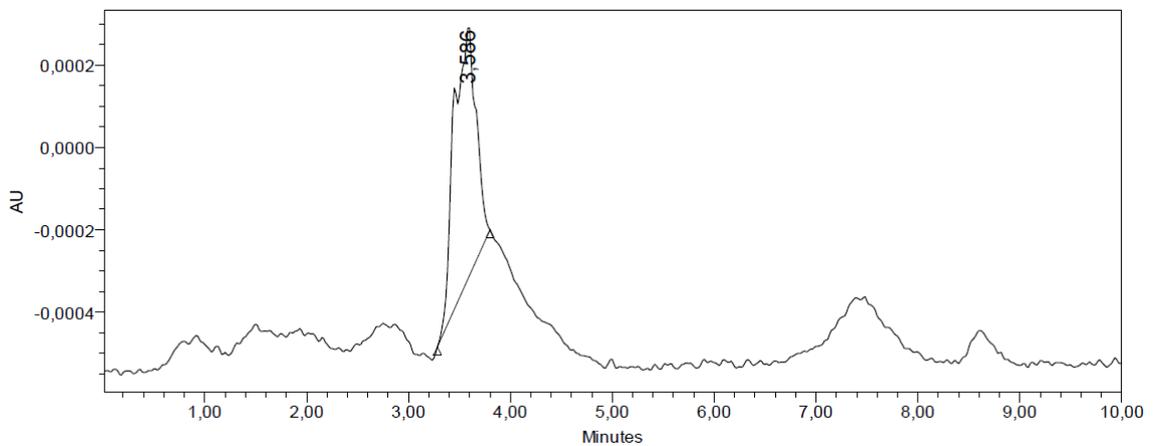


Figura 14 – Cromatograma obtido do PLGA 75:25 em PBS após 20 dias de degradação.

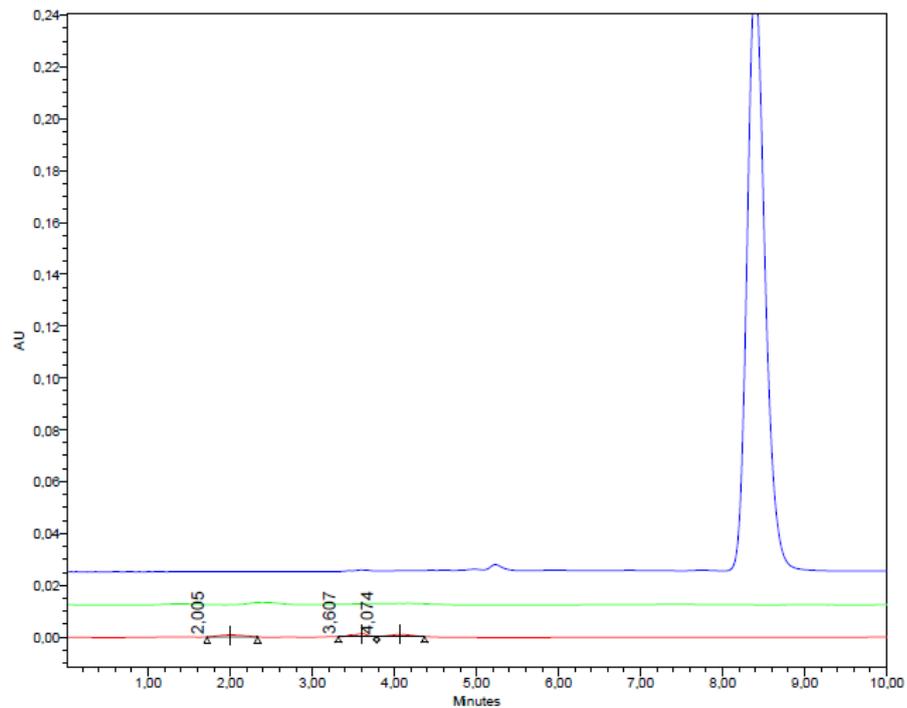


Figura 15 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos do PBS, PLGA e AR (50 µg/mL), demonstrando que o método é seletivo e específico.

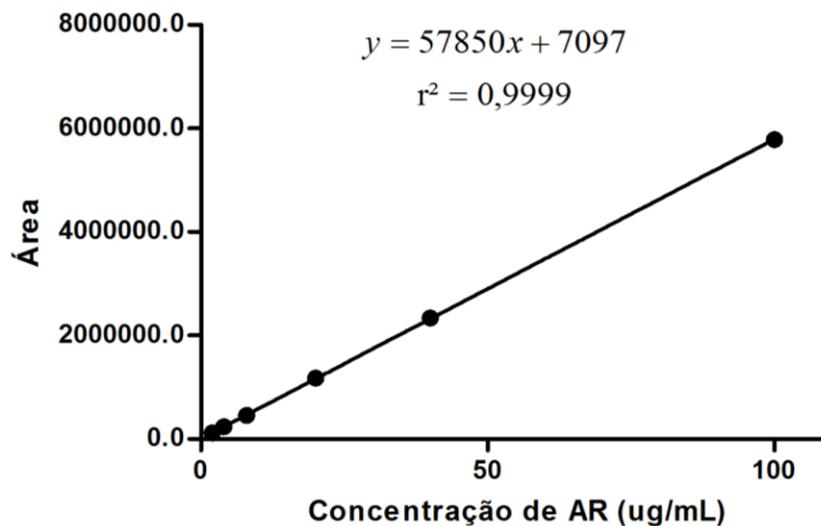
O estudo dos cromatogramas obtidos indica uma boa separação do fármaco, do PBS e do PLGA (Figura 15), não havendo sobreposição ou interferência no pico referente ao AR, comprovando a seletividade e especificidade do método.

2.2.2 Linearidade

Para a determinação da linearidade do método foi construída uma curva analítica a partir dos valores obtidos nas corridas de seis diferentes concentrações do AR (100 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL e 2 µg/mL), realizadas em triplicata. Os resultados são mostrados na Tabela 5 e a curva obtida, assim como o coeficiente de correlação linear e a equação da reta são apresentados na Figura 16.

Tabela 5 – Dados utilizados na construção da curva de calibração do AR

Concentração de AR (µg/mL)	Média das áreas ± DP	DPR (%)
2	115563,3 ± 1055,8	0,91
4	235696,3 ± 3442,0	1,46
8	459353,0 ± 957,4	0,21
20	1175786 ± 51210,7	4,36
40	2337659 ± 6939,6	0,3
100	5783804 ± 73057,2	1,26

**Figura 16 – Curva analítica do AR.**

A curva construída apresentou linearidade na faixa de trabalho especificada, sendo o coeficiente de correlação linear igual a 0,9999.

2.2.3 Precisão

Para a avaliação da repetibilidade do método, foram injetadas em triplicata quatro concentrações diferentes de AR (2, 20, 50 e 100 µg/mL), totalizando 12

determinações. A precisão intermediária foi determinada do mesmo modo, porém, as análises foram realizadas em dois dias diferentes. Os resultados estão apresentados nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Repetibilidade do método de quantificação do AR

Concentração de AR ($\mu\text{g/mL}$)	Média das áreas	DPR (%)
2	115563,3	0,91
20	1175786,0	4,36
50	2904872,0	0,92
100	5783804,0	1,26

Tabela 7 – Precisão intermediária do método de quantificação do AR

Concentração de AR ($\mu\text{g/mL}$)	Média das áreas	DPR (%)
2	118896,7	4,05
20	1159120,0	2,85
50	2894872,0	1,26
100	5880471,0	2,68

2.2.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir dos resultados de recuperação do AR, em concentrações equivalentes aos níveis baixo (20 $\mu\text{g/mL}$), médio (50 $\mu\text{g/mL}$) e alto (80 $\mu\text{g/mL}$). O método permitiu a recuperação de 101,6 % para a concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$; 100,44% para 50 $\mu\text{g/mL}$ e 101,9% para 80 $\mu\text{g/mL}$, o que caracteriza o método como exato, visto que se encontram dentro do limite estabelecido pela ANVISA (98 a 102%).

2.2.5 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação encontrados foram de 0,18 µg/mL e 0,60 µg/mL, respectivamente. Esses valores demonstram que o método apresenta uma capacidade de detecção adequada, uma vez que é possível quantificar o AR em concentrações superiores ou iguais a 0,6 µg/mL.

2.2.6 Estabilidade

Após 7 dias de incubação em PBS a 37°C, verificou-se que a concentração de AR atinge 90% da concentração inicial. A estabilidade foi considerada boa, visto que no teste de liberação a amostra de tampão é sempre renovada num tempo inferior a 3 dias.

Resultado semelhante foi encontrado por Oliveira (2010), que demonstrou que soluções padrão de AR armazenadas a 4 °C apresentaram estabilidade de 30 dias.

3 CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido se mostrou seletivo, específico, preciso e exato, podendo-se concluir que ele é adequado para quantificação do AR durante os estudos de liberação *in vitro* dos sistemas poliméricos desenvolvidos.

PARTE II

Desenvolvimento e caracterização de implantes intra-oculares contendo ácido rosmarínico

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Materiais

- Ácido rosmarínico, teor de pureza de 98% - Sigma Aldrich, Alemanha;
- Ácido poli(D,L-lático-co-glicólico) na proporção de 75:25 - Boehring Inselheim, Alemanha;
- Acetonitrila - T.J.Baker, USA;
- Liofilizador (E-C MODULYO, E-C Apparatus Inc. EUA).

1.2 Métodos

Foram desenvolvidos implantes biodegradáveis de PLGA contendo 25% de ácido rosmarínico.

Os sistemas foram preparados inicialmente, pela incorporação do fármaco ao polímero em acetonitrila, obtendo-se uma solução com proporção entre AR e PLGA de 1:3. Essa foi então submetida ao congelamento por 24 horas a -80°C . Após liofilização por 24 horas (Liofilizador E-C MODULYO, E-C Apparatus Inc. EUA) foi obtida uma massa homogênea contendo AR, que foi moldada a quente na temperatura entre 70 e 90°C na forma de implantes com aproximadamente 0,45 mm de diâmetro e 6 mm de comprimento.

1.2.1 Determinação do peso médio dos implantes

O peso médio dos implantes obtidos foi calculado a partir de 10 implantes selecionados aleatoriamente. O resultado foi expresso em função da média \pm desvio padrão absoluto (DP).

1.2.2 Determinação do teor de AR nos implantes

O teor de AR presente nos implantes de PLGA foi determinado empregando-se o método cromatográfico desenvolvido para a quantificação do fármaco. Os implantes foram solubilizados em 10 mL de acetonitrila e a porcentagem de AR foi determinada pelo cálculo da quantidade de fármaco presente nos 10 mL de solução. Os resultados foram expressos em função da média \pm desvio padrão absoluto (DP).

1.2.3 Caracterização dos implantes biodegradáveis desenvolvidos

A caracterização dos implantes desenvolvidos baseia-se na análise físico-química dos seus constituintes isolados e da mistura destes, assim como na análise morfológica dos implantes desenvolvidos, possibilitando a avaliação do perfil de liberação e degradação das formulações durante os testes de liberação *in vitro*, da estabilidade dos constituintes durante o método de preparo, bem como a interação existente entre os polímeros e o fármaco.

Para a caracterização dos implantes foram utilizadas as técnicas de análise térmica (calorimetria exploratória diferencial), espectroscopia no infravermelho e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

1.2.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise térmica de materiais é uma técnica largamente empregada na caracterização de sistemas poliméricos, uma vez que fornece informações sobre a estabilidade dos materiais, as transformações térmicas, assim como sobre as

interações fármaco-polímero. Com a identificação da temperatura da transição vítrea (T_g), da temperatura de fusão ou da temperatura de recristalinização (T_c), é possível determinar se ocorre interação do polímero ou alguma alteração na estrutura do sistema.

O comportamento térmico dos materiais empregados foi avaliado utilizando o calorímetro modelo DSC50 (Shimadzu), de acordo com a norma ASTM D3418 que regulamenta os procedimentos de análise por DSC. Foram pesados cerca de 4 mg das amostras do AR, do PLGA e da mistura física e liofilizada do polímero contendo 25% de AR, as quais foram seladas em um cadinho de alumínio semi-hermético. As amostras foram submetidas ao aquecimento de 25 a 400°C, com a razão de aquecimento de 10 °C/min e atmosfera inerte de nitrogênio.

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

A espectroscopia no infravermelho (IV) é uma técnica empregada para a identificação de grupos funcionais de moléculas expostas a uma radiação no infravermelho. A interpretação dos espectros obtidos está relacionada com a identificação das bandas características de cada grupo químico.

As análises de FTIR foram realizadas no espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 1000. As amostras do AR, do PLGA e da mistura física e liofilizada do polímero contendo 25% de AR foram pressionadas contra um cristal de seleneto de zinco, e os espectros foram obtidos a partir de 4 varreduras com uma resolução de 4 cm^{-1} , no intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} .

1.2.3.3 Análise morfológica dos implantes por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

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

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um método de obtenção de uma imagem ampliada e tridimensional da amostra a partir da colisão de um feixe de elétrons com esta.

As microscopias foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob a orientação do Prof. Hélio Chiarini Garcia, utilizando o microscópio Zeiss DSM 950 (Carl Zeiss NTS GmbH, Alemanha). Foram realizadas análises morfológicas dos implantes de PLGA branco e PLGA + AR (25%) imediatamente após o preparo e de implantes retirados do estudo de liberação *in vitro* após intervalos de 4 e 8 dias de incubação.

Após serem retirados do meio de incubação, os implantes foram ligeiramente secos em papel absorvente e então colocados em dessecador a vácuo, contendo sílica, por 72 horas. Em seguida foram montados em suportes (stubs) com o auxílio de cola branca e novamente dessecados. As amostras foram metalizadas por 60 segundos. Para a aquisição das imagens, foi empregada uma voltagem de 15 kV e uma distância de trabalho variando entre 12 e 13 mm.

As imagens obtidas foram processadas utilizando os programas Adobe Photoshop e Adobe Illustrator.

1.2.4 Estudo de liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* do AR a partir dos implantes foi realizado em frascos de vidro contendo 2mL de PBS pH 7,4, obedecendo as condições *sink*. Esse estudo foi realizado na incubadora TE-424 (TECNAL, Brasil), com agitação e temperatura mantidas constantes em 30 rpm (± 1) e 37° C ($\pm 0,2^\circ$ C), respectivamente, visando aproximar o experimento das condições encontradas *in vivo*.

Foram utilizados implantes de PLGA brancos e contendo 25% de AR, totalizando 12 implantes (n=6 para cada grupo analisado). 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. O fármaco liberado no meio de incubação foi quantificado por CLAE, de acordo com o método analítico previamente desenvolvido e validado.

2 RESULTADOS

2.1 Preparo dos implantes

Os implantes desenvolvidos apresentaram-se como um sistema compacto e homogêneo, na forma cilíndrica, com aproximadamente 0,45 de diâmetro e 6 mm de comprimento (Figura 17). Para a padronização do diâmetro dos sistemas foi utilizado o Trocater Transescleral (Accurus® 25 – Gauge System, Alcon, Inc, EUA), a fim de obter implantes com a espessura adequada para a posterior aplicação intravítrea (Figura 18).

Fialho e colaboradores (2006) e Saliba e colaboradores (2008) também obtiveram com sucesso implantes para administração intra-vítrea de PLGA contendo dexametasona e ciclosporina, respectivamente, pelo método de moldagem a quente da mistura liofilizada.



Figura 17 – Implante de PLGA contendo ácido rosmarínico.



Figura 18 – Trocater Transescleral (Accurus® 25 – Gauge System, Alcon, Inc, EUA) utilizado no desenvolvimento dos implantes. Fonte: Saliba (2011).

2.2 Determinação do peso médio e teor de ácido rosmarínico nos implantes

O peso médio encontrado para os implantes biodegradáveis desenvolvidos foi de 1,6 ± 0,15 mg.

A determinação do teor de AR nos implantes foi realizada empregando-se o método validado para quantificação do fármaco por CLAE, descrito anteriormente. A porcentagem de AR presente nas amostras analisadas foi de 22,17%. Como foi observado repetibilidade dos valores percentuais de AR durante as diversas quantificações, padronizamos a quantidade de fármaco presente nos implantes como sendo 22,2% p/p, quantidade utilizada para realização dos cálculos durante o teste de liberação *in vitro*.

2.3 Caracterização dos sistemas biodegradáveis desenvolvidos

2.3.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Foram obtidas as curvas DSC para o PLGA, AR e para a mistura liofilizada de PLGA contendo o fármaco na proporção de 3:1.

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.

A Figura 19 apresenta a curva de DSC do PLGA 75:25, onde pode ser observada a ocorrência de um evento endotérmico em 57,5°C, característico da transição vítrea (Tg) do polímero, resultado que está de acordo com o descrito por Fialho e colaboradores (2003). Também foi observado um evento endotérmico que se inicia em 330,5°C e cujo pico se dá em 365,8°C, referente à termodecomposição do PLGA.

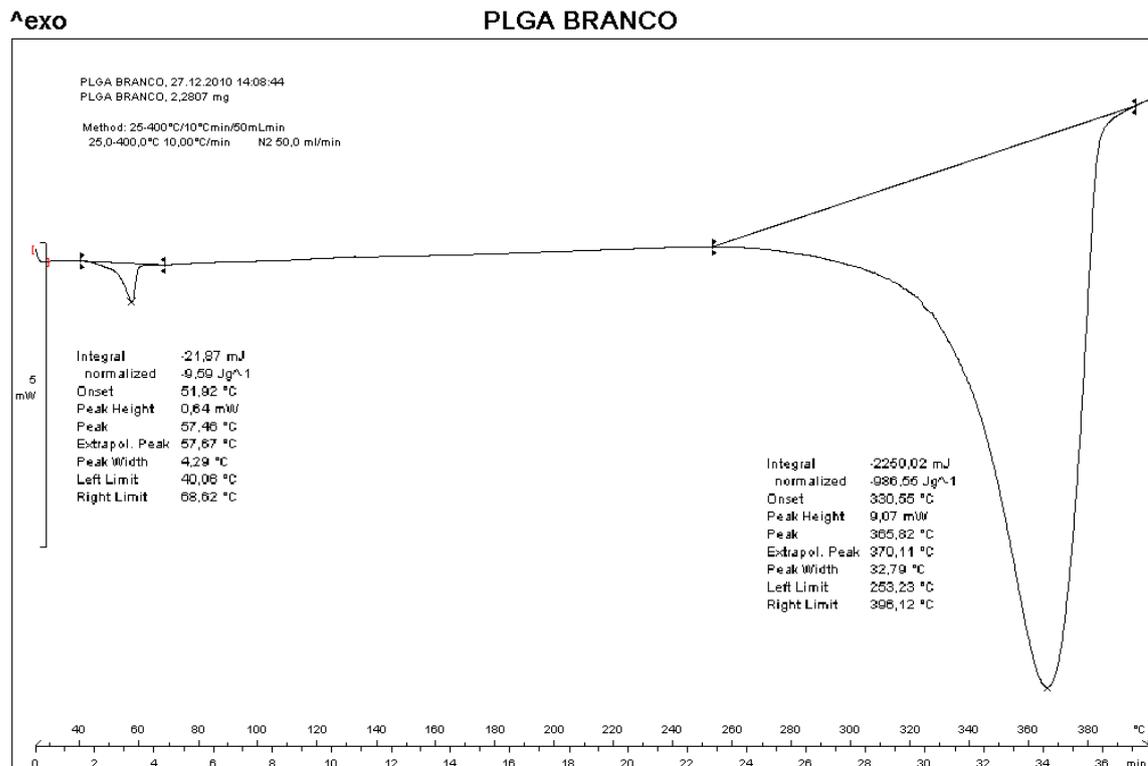


Figura 19 – Curva de DSC do PLGA 75:25.

A curva de DSC do AR (Figura 20) apresentou um evento endotérmico em 65,8°C que pode ser caracterizado como sendo a Tg do fármaco que estaria anteriormente na forma amorfa. Na temperatura de 167,3°C pode ser observado um pico relativo à fusão do AR, o que corresponde com dados presentes na literatura. O evento endotérmico que se inicia após a fusão, em aproximadamente 220°C está relacionado com a termodegradação do fármaco. É importante ressaltar que dentro da faixa de temperatura de 70-90°C não existe nenhum sinal de degradação da amostra, o que viabiliza a utilização do método de moldagem a quente para o preparo dos implantes biodegradáveis contendo o ácido rosmarínico.

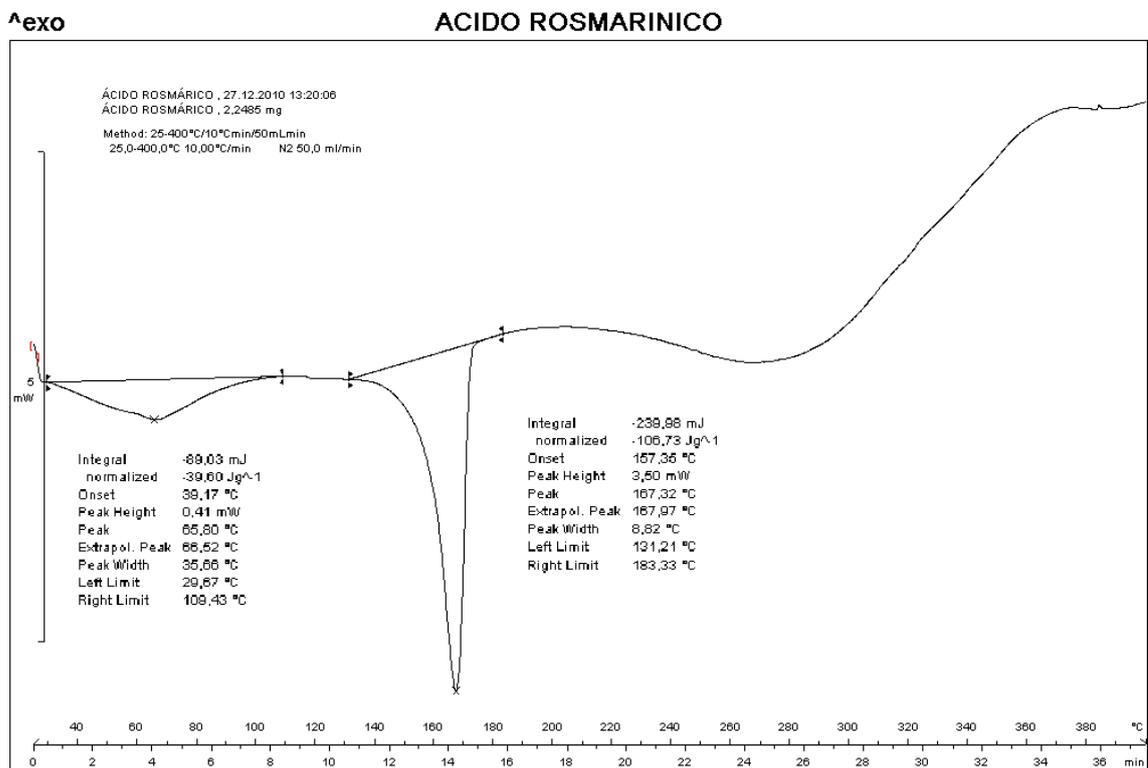


Figura 20 – Curva de DSC do ácido rosmarínico.

Na curva DSC do PLGA contendo ácido rosmarínico (Figura 21) é possível observar uma pequena variação endotérmica em 60°C referente à transição vítrea do polímero. Houve uma alteração na temperatura de fusão do AR possivelmente devido a dispersão do fármaco na matriz polimérica, o que faz com que a energia necessária para a conversão do estado sólido para o líquido seja menor, o que pode

indicar uma possível interação entre o fármaco e o polímero que deve, porém, ser verificada pela análise dos espectros de infravermelho realizados. A termodegradação do fármaco e do polímero ocorre a partir de 230°C.

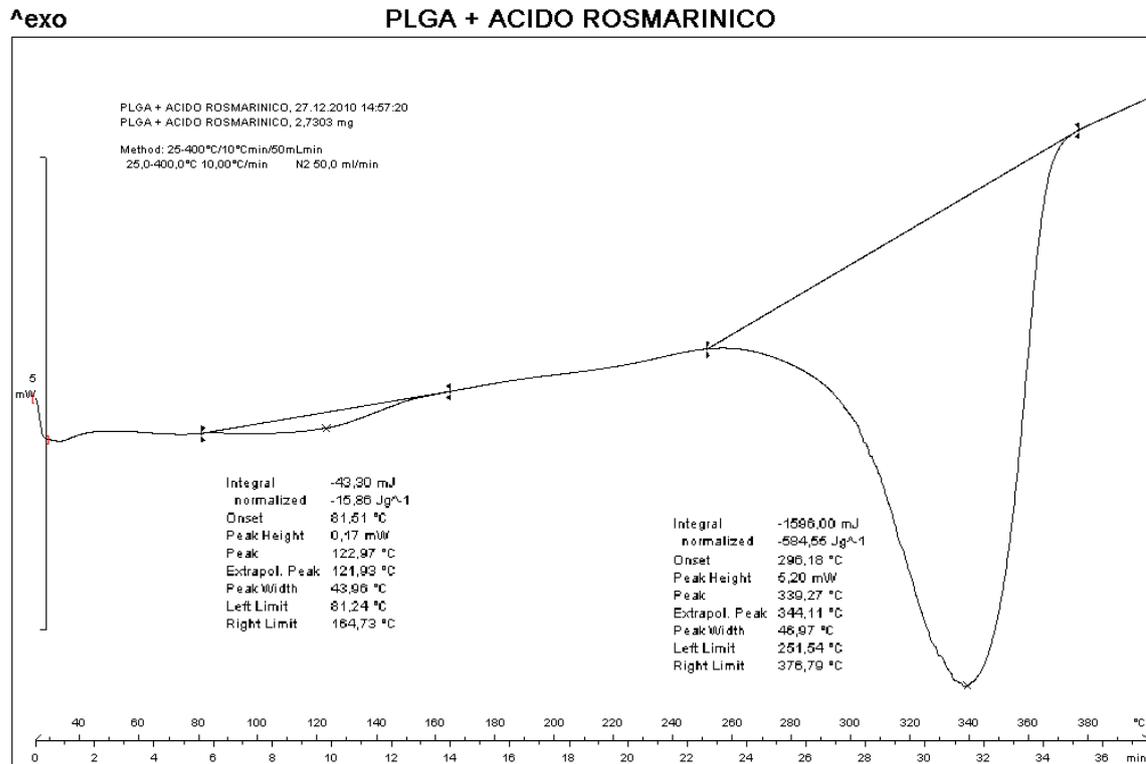


Figura 21 – Curva de DSC da mistura liofilizada de PLGA e AR na proporção de 3:1.

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

A fim de se confirmar ou descartar uma possível interação entre o fármaco e o polímero, foram realizadas análises no infravermelho, já que cada material possui distintos grupos químicos que apresentam bandas específicas nos espectros obtidos. Esses grupos químicos são identificados como grupo éster para o *PLGA* 75:25 e grupos carboxila e hidroxilas fenólicas para o AR.

Para identificação das bandas características do *PLGA* 75:25 e do AR, os espectros no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos a partir das

amostras de AR, do PLGA e da mistura física e liofilizada do copolímero contendo 25% de AR.

O copolímero PLGA 75:25 (Figura 22) apresentou uma banda em 1748 cm^{-1} atribuída à frequência de estiramento de grupos carbonilas (C=O) de ésteres, bandas em 2947 e 2995 cm^{-1} atribuídas ao estiramento dos grupos metila (C-H) presentes na molécula, e de 1460 a 1000 cm^{-1} relativas ao estiramento de ligações (C-O) e (O-H), resultado semelhante ao encontrado na literatura (Yang et al., 2007).

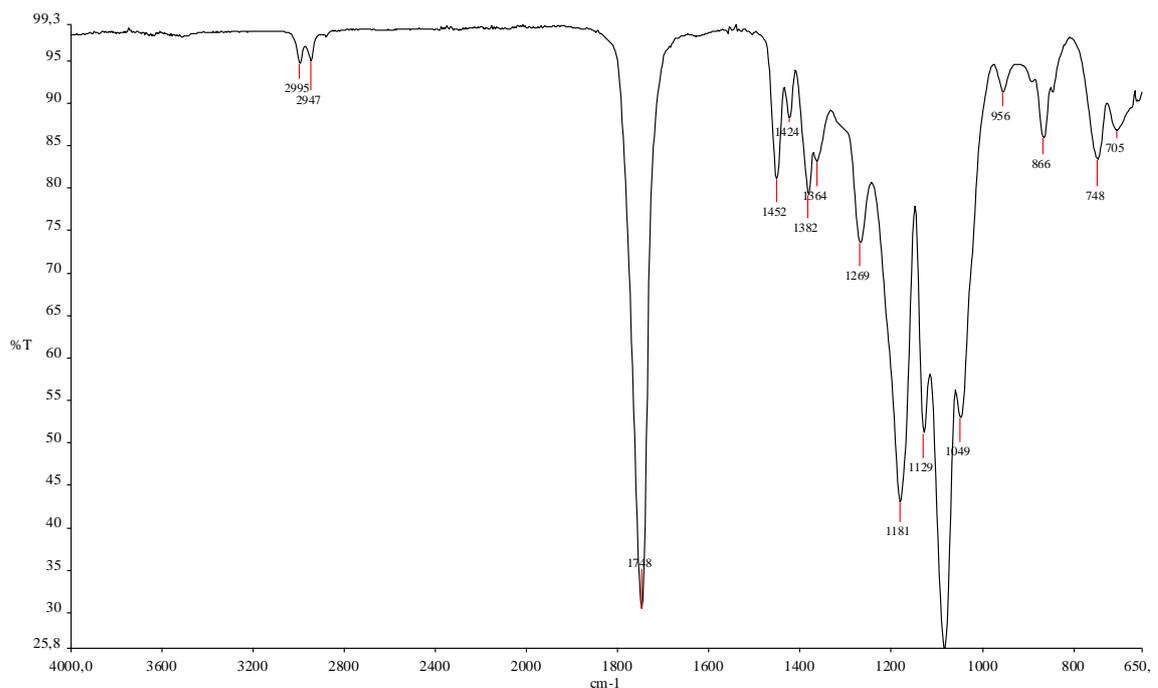


Figura 22 – Espectroscopia na região do infravermelho do PLGA 75:25 branco.

O espectro do AR (Figura 23) apresentou bandas típicas de estiramento vibracional entre 1800 a 700 cm^{-1} , sendo as bandas presentes em 1607 , 1515 e 1464 cm^{-1} atribuídas ao estiramento dos anéis aromáticos (C=C). O pico referente ao estiramento das ligações (C-H) aromáticas ocorreu em 3165 cm^{-1} , na mesma região das bandas referentes às ligações (O-H) carboxílica e fenólicas. Outras evidências dos grupos fenólicos são as bandas em 1348 e 1180 cm^{-1} resultantes, respectivamente, dos estiramentos de (O-H) e (C-O). As bandas em 1724 e 1706

cm^{-1} podem ser atribuídas aos grupos carbonilas (C=O) de ésteres e de ácidos carboxílicos (Stehfest et al., 2004).

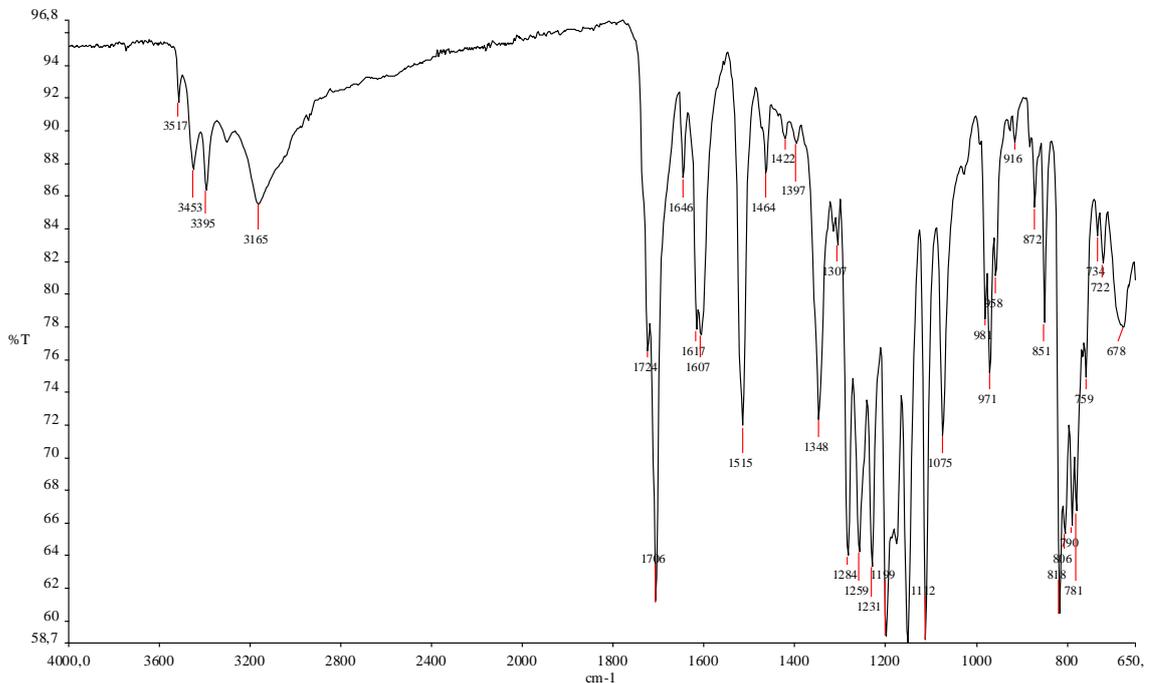


Figura 23 – Espectroscopia na região do infravermelho do ácido rosmarinico.

A Figura 24 apresenta o espectro de infravermelho da mistura física contendo PLGA e AR na proporção 3:1. Como pode ser observado, não houve diferença nas posições das bandas referentes aos grupos funcionais dos compostos na mistura física, principalmente as bandas de 1748 e 1706 cm^{-1} que caracterizam a carbonila do PLGA e do AR, respectivamente, além das bandas referentes às hidroxilas fenólicas do AR em 1348 e 1180 cm^{-1} . Esses resultados confirmam que somente a mistura física não promove interações físico-químicas entre o fármaco e o polímero.

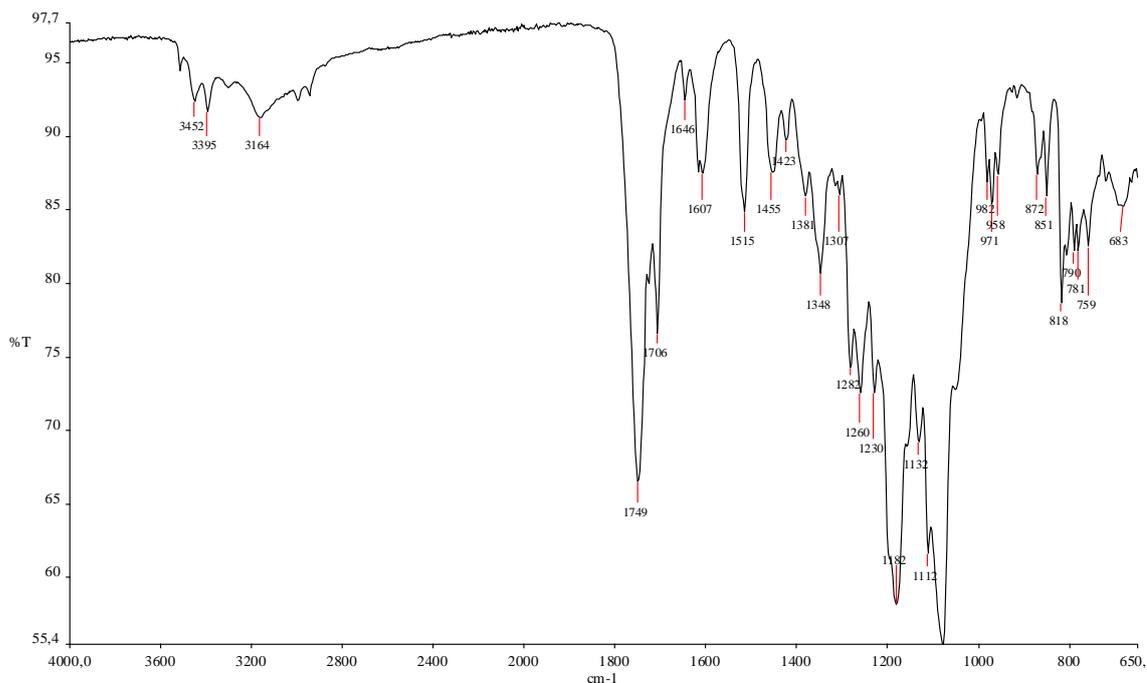


Figura 24 – Espectroscopia na região do infravermelho da mistura física de PLGA e AR na proporção de 3:1.

A partir da análise da Figura 25, pode-se observar que os espectros da mistura física e liofilizada são bastante semelhantes, não havendo deslocamento das bandas referentes aos grupos funcionais das moléculas. O pico referente ao estiramento das ligações (C-H) aromáticas do AR que ocorre acima de 3000 cm^{-1} foi sobreposto pelas ligações (O-H) carboxílica e fenólicas, no entanto, outras evidências dos grupos fenólicos podem ser observadas. As bandas em 1361 e 1179 cm^{-1} são características dos estiramentos de (O-H) e (C-O) dos grupos fenólicos do AR, já a presente em 1746 cm^{-1} é relativa à sobreposição das bandas referentes aos grupos carbonilas (C=O) de ésteres do AR e PLGA e de ácidos carboxílicos do fármaco. Os sinais em 2939 e 2990 cm^{-1} podem ser atribuídos ao estiramento dos grupos metila (C-H) do PLGA.

Pode-se dizer que o processo de obtenção dos implantes poliméricos de AR preservou a estrutura química dos componentes, apesar de terem sido observadas alterações na calorimetria exploratória diferencial. Assim, faz-se necessário a realização de novos ensaios com técnicas de termogravimetria e raio X para verificar as possíveis interações presentes na mistura.

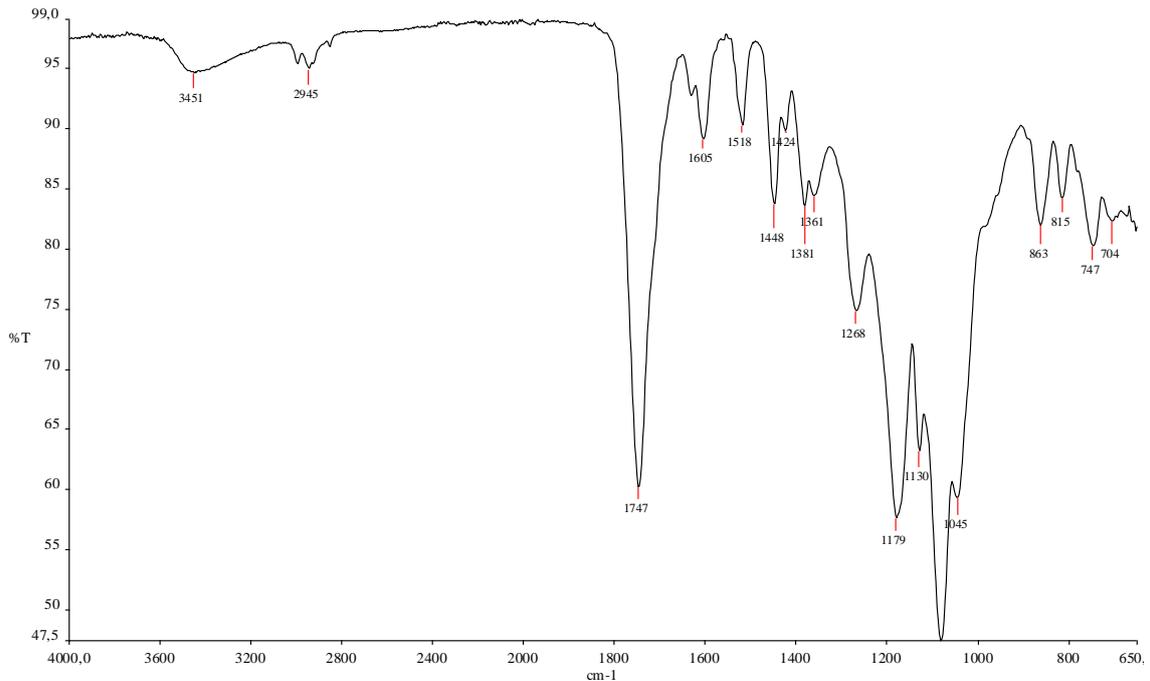


Figura 25 – Espectroscopia na região do infravermelho da mistura liofilizada de PLGA e AR na proporção de 3:1.

2.3.3 Análise morfológica dos implantes por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos implantes de PLGA branco e contendo o fármaco, antes e após 8 dias de incubação, foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura.

Para a aquisição das imagens, inicialmente foi utilizada uma voltagem de 25 kV, entretanto, observou-se que os implantes não resistiam devido, provavelmente, a sensibilidade térmica do polímero. Com isso, optou-se pela utilização de uma voltagem igual a 15 kV.

A superfície dos implantes de PLGA puro (Figura 26) apresentou-se morfológicamente homogênea e ligeiramente irregular após quatro dias de incubação (Figuras 26A a 26C), não sendo observadas alterações após oito dias de incubação (Figuras 26D a 26F). Esse fato se deve, provavelmente, à maior

organização da matriz polimérica na ausência do fármaco, o que retarda a degradação dessa.

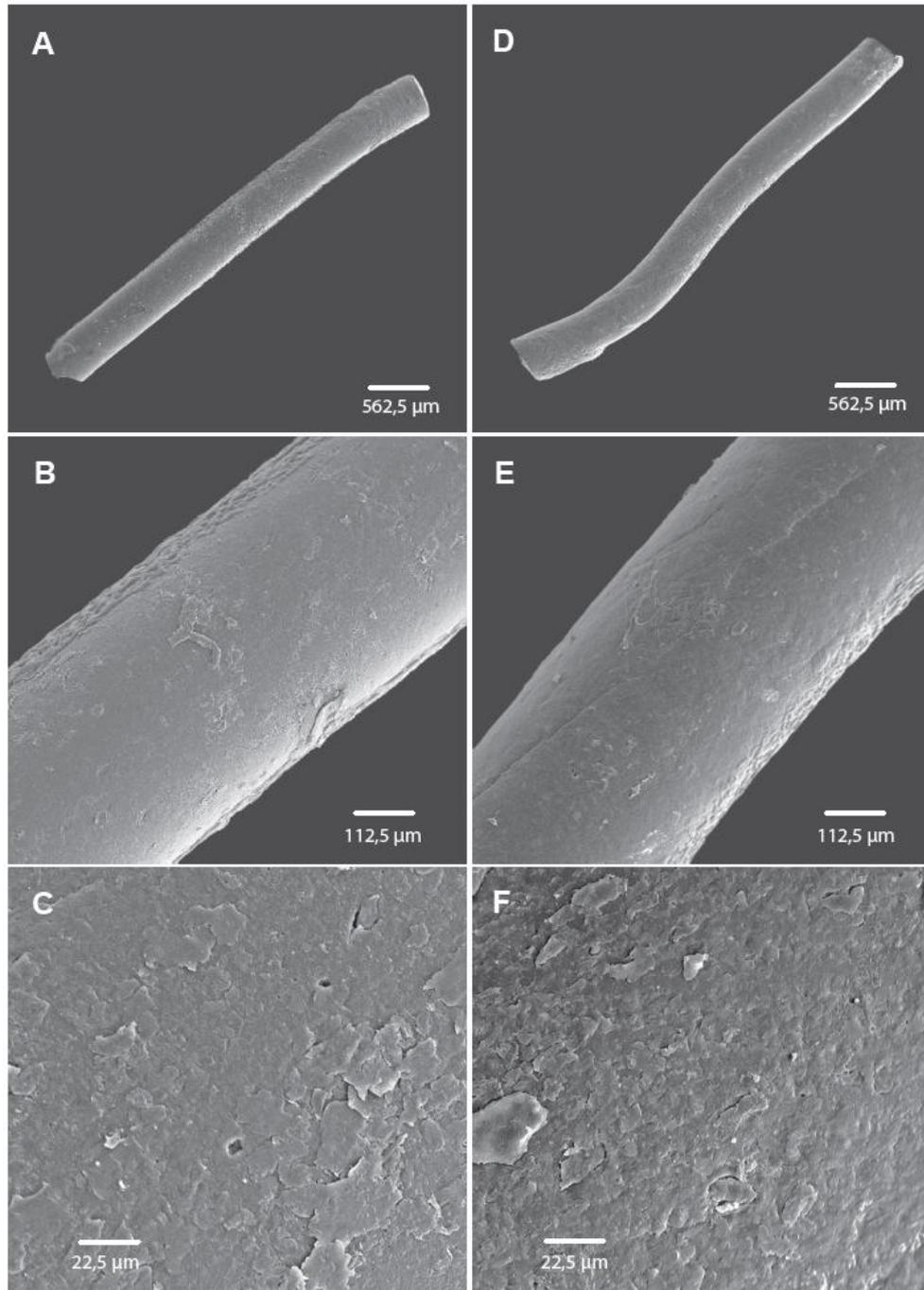


Figura 26 – Imagem obtida através de MEV dos implantes de PLGA com 4 dias de incubação em aumento de 20X (A); 100X (B) e 500X (C); e com 8 dias de incubação em aumento de 20X (D); 100X (E) e 500X (F).

Inicialmente a superfície dos implantes contendo AR se apresentou lisa e homogênea, sem evidência de poros ou canais (Figura 27).

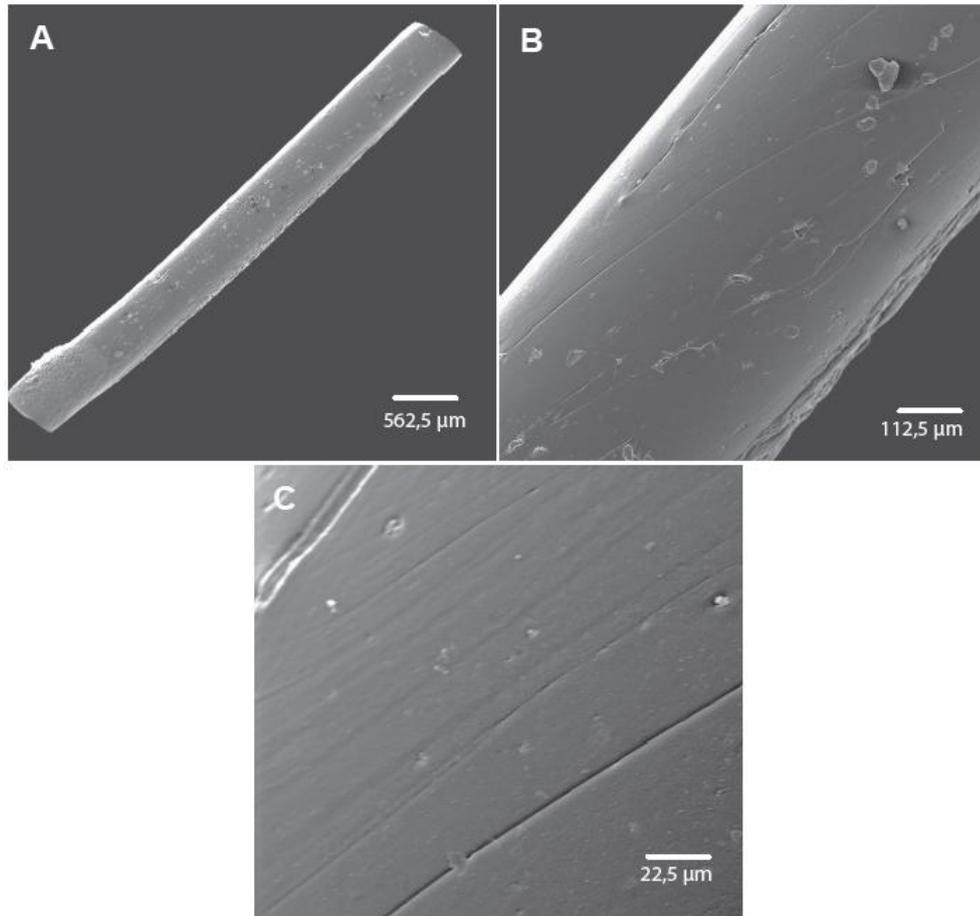


Figura 27 - Imagem obtida através de MEV dos implantes de PLGA + AR logo após o preparo em aumento de 20X (A); 100X (B) e 500X (C).

Entretanto, pode-se observar um crescente aumento na irregularidade e porosidade da superfície dos sistemas desenvolvidos em função do tempo de incubação (Figura 28). Após 4 e 8 dias de incubação, a superfície dos implantes contendo AR apresentou poros homogêneamente dispersos, caracterizando uma degradação externa, o que leva à suposição de que o fármaco liberado durante este período é decorrente tanto da difusão do fármaco, quanto da degradação inicial do polímero.

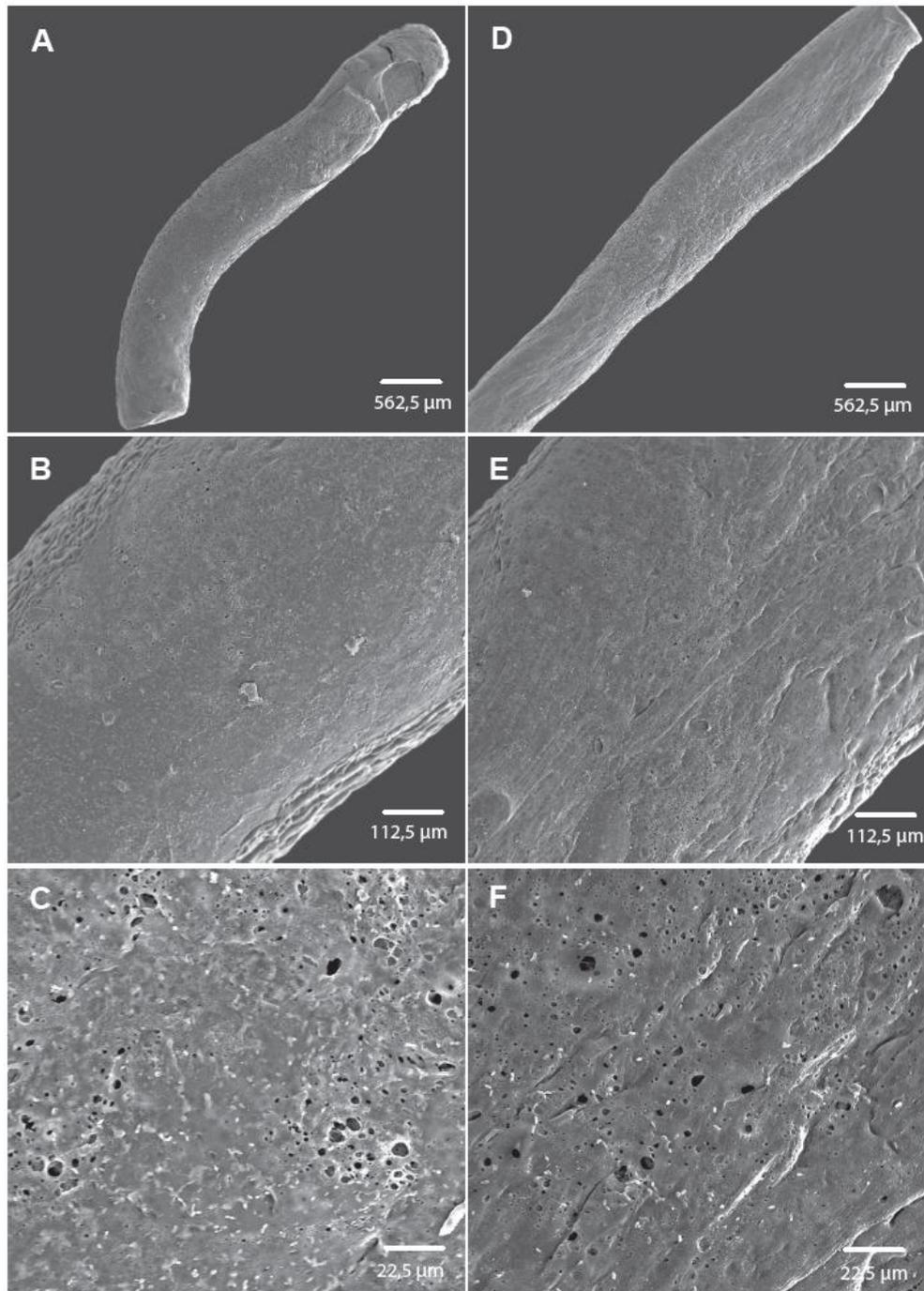


Figura 28 - Imagem obtida através de MEV dos implantes de PLGA + RA com 4 dias de incubação em aumento de 20X (A); 100X (B) e 500X (C); e com 8 dias de incubação em aumento de 20X (D); 100X (E) e 500X (F).

2.3.4 Estudo de liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* do AR a partir dos implantes obtidos foi realizado com o intuito de se determinar o perfil de liberação do fármaco a partir dos sistemas desenvolvidos. O método fundamenta-se na tentativa de simular o meio fisiológico em que os sistemas serão aplicados, adotando-se as condições experimentais descritas anteriormente (2,0 mL de PBS pH 7,4, 37°C e agitação constante de 30 rpm).

O perfil de liberação do AR encontra-se representado na Figura 29, na forma de porcentagem do fármaco liberado em função do tempo em dias.

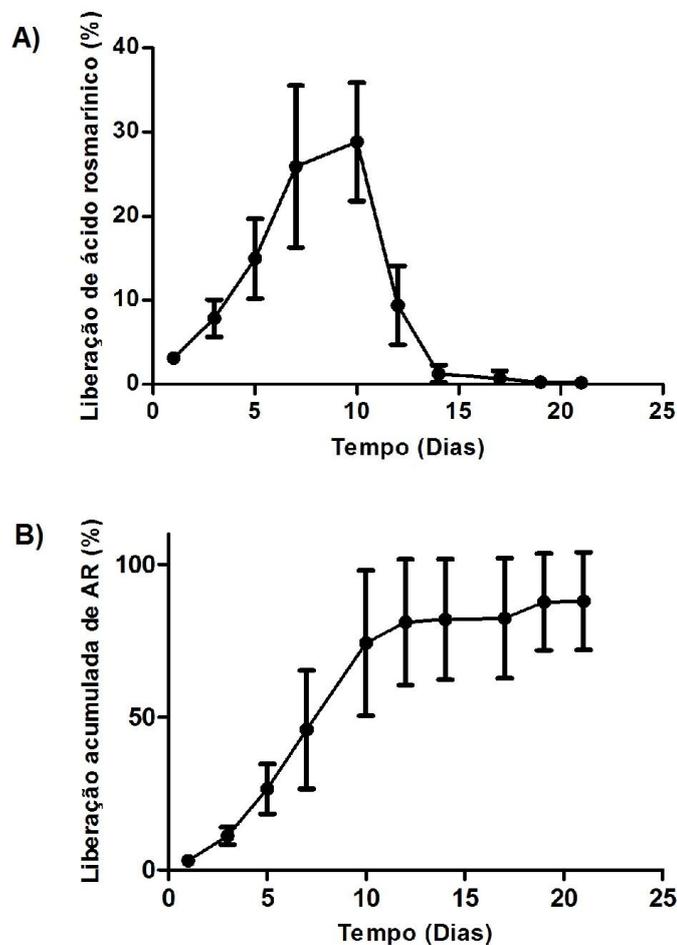


Figura 29 – A) Perfil de liberação do AR a partir dos implantes de PLGA 75:25. B) Perfil de liberação acumulada de AR.

A taxa de liberação acumulada de AR foi de aproximadamente 92,7% durante 21 dias de estudo, sendo 80% do fármaco liberado nos primeiros 10 dias. Além disso, observou-se que os implantes avaliados apresentaram o mesmo comportamento frente ao processo de liberação, podendo-se inferir que o método de preparo garantiu a reprodutibilidade no processo de liberação do fármaco.

Em um sistema matricial, como o desenvolvido nesse trabalho, a liberação do fármaco é controlada por três fatores: difusão pelos poros da matriz, degradação do polímero ou por uma combinação desses fatores (Silva *et al.*, 2010). Em geral, o perfil de liberação pode ser dividido em três etapas: a primeira consiste de uma alta taxa de liberação do fármaco, conhecida como “burst” inicial, possivelmente devido à presença deste na superfície do sistema; a segunda etapa ocorre devido à difusão do fármaco da matriz para o meio externo antes mesmo de ocorrer a erosão da matriz polimérica, e está relacionada com o coeficiente de difusão, saturação do meio de incubação e com a concentração de fármaco no sistema; a terceira fase corresponde a um repentino “burst” devido ao intumescimento e desintegração da matriz propriamente dita (Kunou *et al.*, 2000).

A degradação de implantes compostos por PLGA envolve a quebra das ligações éster da cadeia polimérica pelo ataque hidrolítico de moléculas de água após a sua incubação em meio aquoso, convertendo macromoléculas inicialmente insolúveis, em oligômeros e monômeros hidrossolúveis (Park, 2005). Estudos mostraram um mecanismo heterogêneo de degradação em que produtos do tipo ácido carboxílico, gerados no interior do sistema catalisam o processo, sendo responsáveis pela maior velocidade de degradação no centro do implante. Durante o processo de degradação polimérica vão se formando, portanto, canais que ligam o interior da matriz à sua superfície, permitindo a liberação do fármaco por difusão (Kunou *et al.*, 2000).

A rápida liberação do AR dos sistemas desenvolvidos também pode ser atribuída à sua elevada solubilidade em água.

A utilização de implantes biodegradáveis é uma importante alternativa para o tratamento de doenças que acometem o segmento posterior do olho. Como descrito por Huang (2006) e Kim e colaboradores (2009), o ácido rosmarínico apresenta um grande potencial como agente anti-angiogênico, entretanto, é necessário aprimorar a

formulação aqui desenvolvida, a fim de se obter um perfil de liberação mais prolongado, apesar de também ser interessante uma concentração mais elevada do fármaco no início do tratamento.

3 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que foi possível obter implantes biodegradáveis para a liberação de AR por meio de métodos reprodutíveis que disponibilizam o fármaco presente de forma dispersa nas matrizes poliméricas e na sua forma biologicamente ativa sendo, portanto, sistemas promissores para o futuro tratamento de doenças causadoras de neovascularização retiniana.

As técnicas de caracterização empregadas mostraram a ausência de modificações estruturais nos grupos funcionais do AR e do PLGA. O perfil de liberação encontrado sugere que a formulação desenvolvida deva ser aprimorada a fim de estender o período de liberação do fármaco.

PARTE III

Avaliação biológica dos sistemas desenvolvidos

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ensaio de angiogênese na membrana corioalantóica de embrião de galinha

O ensaio da membrana corioalantóica de embrião de galinha, do inglês “CAM assay”, inicialmente desenvolvido para o estudo de tecidos embrionários, foi adaptado por Folkman em 1974 para o estudo da angiogênese tumoral, assim como para o teste de substâncias pró e antiangiogênicas (Dimitropoulou et al., 1998; Norrby, 2006). Atualmente, esse modelo também é utilizado para a avaliação de sistemas de liberação de fármacos, biomateriais, implantes e reconstituição de tecidos (Vargas et al., 2007; Ribatti, 2008). É um modelo *in vivo* amplamente utilizado devido ao seu baixo custo, simplicidade, possibilidade de monitoramento da reação durante todo o ensaio e como uma alternativa ao uso de modelos animais mais onerosos e que demandam um maior tempo (Brooks et al., 1999; Valdes et al., 2002; Auerbach et al., 2003; Seidlitz et al., 2004; Nowak-Sliwinska et al., 2010).

Leis vigentes que regulam a experimentação animal na União Européia e nos Estados Unidos permitem o uso de embriões de galinha sem a prévia autorização de comitês de ética, com a justificativa de que os ensaios têm seu início e fim antes do nascimento dos animais. No entanto, os ensaios com embriões de galinha devem ter um desenho experimental adequado com o intuito de reduzir o número de embriões utilizados (Vargas et al., 2007).

Hamburger e Hamilton classificaram o embrião com base em suas características externas, durante os 21 dias desenvolvimento até a eclosão do ovo, em 46 etapas, conhecidas como as fases HH, que não são uniformemente distribuídas ao longo do tempo (Hamburger e Hamilton, 1951).

Três membranas extraembrionárias são formadas durante o desenvolvimento: a membrana do saco vitelino, o âmnio e a membrana corioalantóica (MCA). A MCA é uma membrana transparente altamente vascularizada formada pela fusão das camadas mesodérmicas do córion e da alantóide durante o quarto ao quinto dia do

desenvolvimento embrionário (Valdes *et al.*, 2002; Norrby, 2006; Ribatti, 2010). Essa membrana altamente vascularizada está ligada à circulação embrionária pelas artérias e veias alantóicas, sendo responsável pela troca gasosa do embrião com o ambiente externo através da casca porosa até o 19º dia de incubação (Ribatti *et al.*, 2001), além de desempenhar um papel no armazenamento de excreções, transporte de eletrólitos e mobilização do cálcio da casca para iniciar a mineralização óssea (Dimitropoulou *et al.*, 1998; Vargas *et al.*, 2007).

Até o 10º dia de incubação, a MCA é constituída de células relativamente imaturas e indiferenciadas e com alto potencial mitótico. A angiogênese da MCA passa por três fases de desenvolvimento: a fase inicial (5º ao 7º dia) tem como principal mecanismo de crescimento da rede capilar a germinação; na fase intermediária (8º ao 12º dia) o crescimento da rede microvascular prevalece; na fase final (12º ao 13º dia) a angiogênese endógena e a expansão da MCA se completam sob toda a membrana da casca (Norrby, 2006).

Entre o 5º e o 12º dia de incubação, pode ser avaliada a estimulação ou a supressão experimentalmente induzida da angiogênese embrionária endógena, que é governada por uma série de fatores de crescimento, principalmente o VEGF. A aplicação de uma substância antiangiogênica na MCA entre o 5º e o 10º dia promove uma fácil observação da supressão da angiogênese embrionária em curso. A angiogênese *de novo*, ou seja, a indução da angiogênese por um fator pró-angiogênico externo que supera os fatores anti-angiogênicos intrínsecos só pode ser realizada a partir do 12º dia, já que a resposta vasoproliferativa não específica é maior quando o sistema imunológico do embrião está mais desenvolvido (Norrby, 2006).

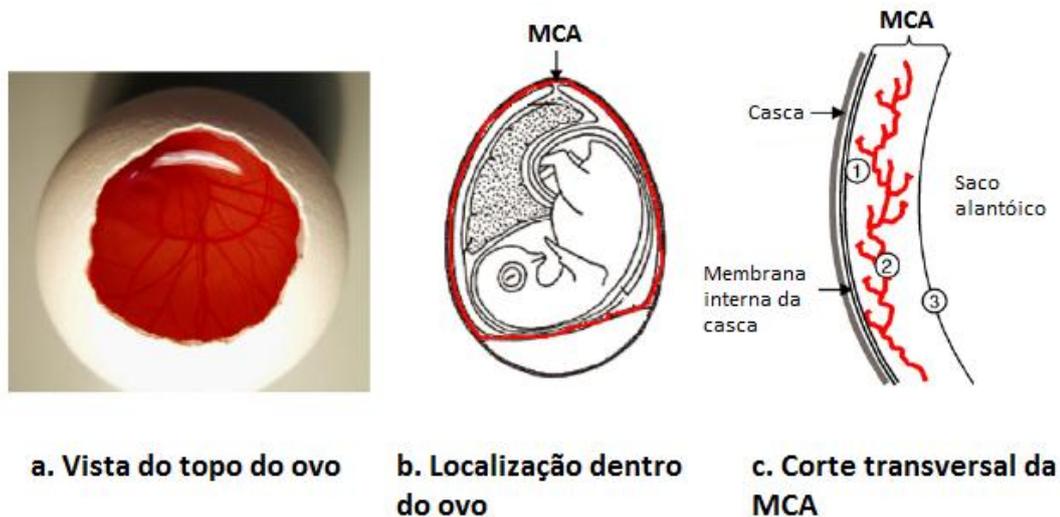


Figura 30 – Membrana corioalantóica (MCA) do embrião de galinha. A) Imagem da MCA de um embrião de 10 dias; B) Localização da MCA (em vermelho) ao redor do embrião de 12 dias e em contato direto com a casca do ovo; C) Ilustração do corte transversal da MCA no 10°-12° dia de incubação: 1. epitélio coriônico; 2. mesoderma com vasos sanguíneos em vermelho; 3. epitélio alantóico. Adaptado de (Vargas *et al.*, 2007).

Existem diversos artefatos que tornam difícil a validação do ensaio de angiogênese da MCA. Qualquer material irritante, como a poeira gerada durante a abertura da casca pode gerar uma reação angiogênica mediada por uma inflamação. A MCA também é extremamente sensível a alterações na tensão de oxigênio, o que faz a vedação da abertura da casca ser crítica. É recomendável esperar 48 horas após a abertura da casca do ovo para adicionar a substância de teste a fim de verificar a presença de qualquer resposta inflamatória. Fármacos que necessitam de ativação metabólica não podem ser avaliados por esse método (Staton *et al.*, 2004; Norrby, 2006).

As formas pelas quais a MCA responde aos materiais aplicados na sua superfície são importantes para avaliar os sistemas de liberação de fármacos aplicados topicamente. Valdes e colaboradores constataram que tanto a resposta inflamatória aguda quanto a crônica da MCA a biomateriais são semelhantes às respostas encontradas em mamíferos (Valdes *et al.*, 2002).

Os embriões de galinha podem ser utilizados para avaliar a atividade e a toxicidade de fármacos na MCA (presença de inflamação ou neovascularização) e no desenvolvimento anatômico do embrião, assim como a influência da via de administração do fármaco. A análise do sangue, a utilização de biossensores e de

angiografias da MCA podem ser utilizados para determinar parâmetros farmacocinéticos, e a biocompatibilidade de sistemas de liberação de fármacos pode ser acessada após a sua aplicação tópica na MCA (Vargas *et al.*, 2007). A Tabela 8 resume as vantagens e as desvantagens do uso de embriões de galinha.

Tabela 8 – Vantagens e desvantagens do uso de embriões de galinha para a avaliação de fármacos e sistemas de liberação de fármacos

Vantagens	Limitações
Barato e rápido	Dificuldade na extrapolação para modelos de mamíferos
Modelo <i>in vivo</i>	Dificuldade na escolha de protocolos
Aspectos legais	Alto índice de contaminações
Rápida triagem de formulações	Rápida mudança da MCA durante o desenvolvimento
Avaliação da toxicidade, biocompatibilidade e atividade de fármacos	Via oral não pode ser testada
Fácil observação das respostas	
Diferentes vias de administração	
Crescimento espontâneo de vasos	
Resposta tecidual da MCA é semelhante à resposta dos mamíferos	
Várias amostras podem ser testadas na mesma MCA	
Rápida detecção de efeitos adversos	

Fonte: Adaptado de (Vargas *et al.*, 2007).

Para a avaliação da atividade antiangiogênica a via de administração mais comumente utilizada é a tópica, sendo as substâncias em estudo geralmente adsorvidas em suportes de colágeno, celulose, poliestireno, etc. (Seidlitz *et al.*, 2004; Staton *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 2007). A Figura 31 mostra os diferentes parâmetros dos sistemas de liberação de fármacos que podem ser avaliados nos embriões de galinha.

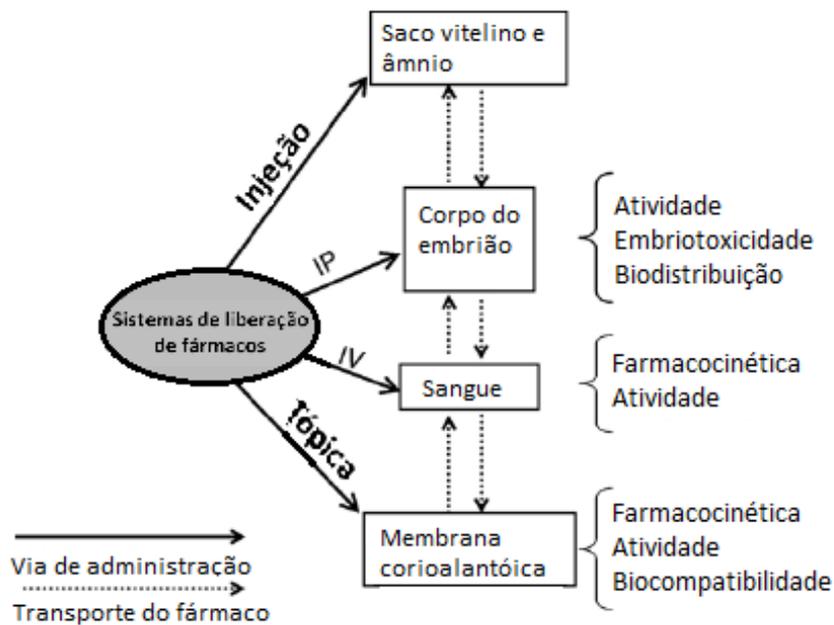


Figura 31 – Uso dos embriões de galinha para a avaliação de sistemas de liberação de fármacos. Adaptado de (Vargas *et al.*, 2007).

Apesar de embriões de galinha não serem ainda amplamente utilizados para a avaliação de novos sistemas de liberação de fármacos, o FDA orienta que o modelo da membrana corioalantóica seja utilizado como uma alternativa a modelos de mamíferos para testes pré-clínicos durante o desenvolvimento de produtos para o tratamento de úlceras cutâneas crônicas e queimaduras (Vargas *et al.*, 2007). A Tabela 9 apresenta formulações que já foram avaliadas por meio do ensaio da MCA.

Tabela 9 – Sistemas de liberação de fármacos e formulações avaliadas por meio do ensaio da MCA

Sistemas de liberação de fármacos	Fármaco	Tipo de fármaco	Via de administração	Parâmetro avaliado
Micropartículas	Paclitaxel	Antiangiogênico	Tópica	Eficácia
Implantes	Calcitrol	Hormônio	Tópica	Eficácia
Implantes	-	-	Tópica	Biocompatibilidade
Soluções	Hipericina	Fotossensibilizador	Tópica	Absorção e eficácia
Microemulsões	-	-	Tópica	Biocompatibilidade
Lipossomas	Doxorrubicina	Antiangiogênico	Tópica	Eficácia
Gel	Amilorida	Antiangiogênico	Tópica	Eficácia

Fonte: Adaptado de (Vargas *et al.*, 2007).

1.1.1 Cultura *in vivo* e *ex vivo* dos embriões de galinha

Os ovos de galinha fertilizados são incubados a 37°C e 60% de umidade relativa do ar. Existem dois tipos de culturas de embriões: o método "*in ovo*", onde os embriões são deixados no interior da casca do ovo durante o seu desenvolvimento e o método "*ex ovo*", onde os embriões são cultivados em placas de petri. A escolha depende da idade do embrião no início do experimento e da natureza da intervenção desejada, entretanto, o primeiro possui a vantagem de não exigir esterilidade do meio de trabalho, alta taxa de sobrevivência e facilidade na manipulação; já o segundo, apesar de possibilitar uma maior área de observação da MCA, possui uma elevada taxa de contaminação, além de não simular as condições fisiológicas de crescimento do embrião (Staton *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 2007). A Figura 32 apresenta o modelo *in vivo* e o modelo *ex vivo* de cultura dos embriões.

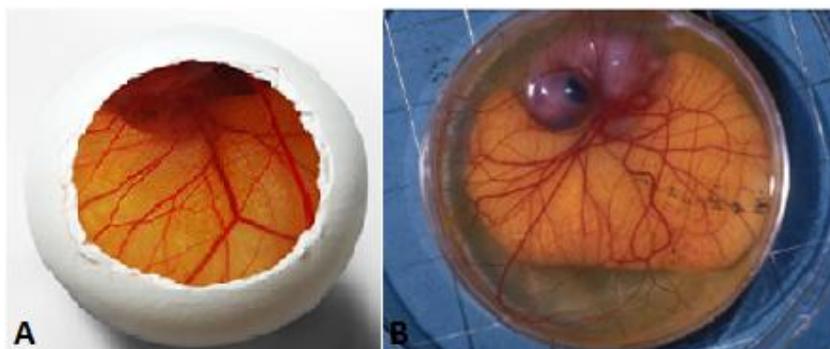


Figura 32 – Tipos de cultura dos embriões de galinha. A) Modelo *in ovo*; B) Modelo *ex ovo*. Adaptado de (Auerbach *et al.*, 2003)

1.1.2 Quantificação da resposta antiangiogênica na MCA

Uma vez que o ensaio da MCA foi realizado deve-se mensurar o efeito causado pelo fármaco ou pelo sistema de liberação de fármacos que foi aplicado. A avaliação desses tratamentos varia de uma simples observação qualitativa, como a avaliação de hemorragias, lise vascular e coagulação, ao tratamento computadorizado das

imagens obtidas dos vasos da MCA, como por exemplo, a análise fractal e as tomografias de infravermelho. A quantificação também pode ser feita via contagem das bifurcações dos vasos, da área branca, ou seja, sem vasos, assim como pode ser atribuído um sistema de pontuações com base no número, diâmetro, comprimento e grau de ramificação das veias (Blacher *et al.*, 2005).

Existem diversos *softwares* disponíveis para a análise digital de imagens e quantificação de vasos sanguíneos. O ImageJ[®] é um programa de domínio público para análise de imagens criado por Wayne Rasband em 1997. Possui mais de 400 *plugins* que possibilitam a sua utilização em diversos campos da ciência e engenharia: imagem na área de medicina, microscopia e ciência dos materiais. Está em linguagem JAVA e pode ser usado com os sistemas operacionais Microsoft, Linux e Macintosh (Collins, 2007; Andrade, 2007).

1.2 Ensaios biológicos *in vitro*

1.2.1 Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT

O ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT, descrito por Carmichael e colaboradores (1987), consiste na redução do MTT (brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil) pela enzima desidrogenase mitocondrial presente somente nas células viáveis, gerando formazan, composto azul-violeta, que uma vez precipitado e solubilizado em DMSO é quantificado por espectrofotometria a 550 nm (Carmichael *et al.*, 1987). As estruturas dos compostos acima estão elucidadas na Figura 33.

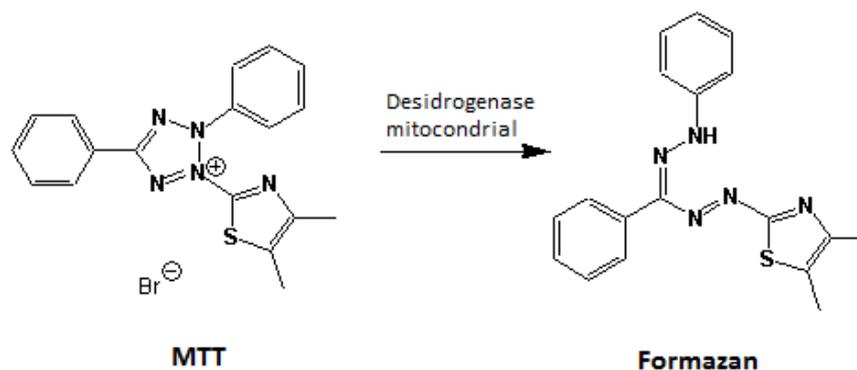


Figura 33 – Transformação do MTT em formazan pela enzima desidrogenase mitocondrial presente nas células vivas. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay.

1.2.2 Teste de biocompatibilidade dos implantes

1.2.2.1 Teste de biocompatibilidade pelo método de difusão em ágar

O teste de biocompatibilidade pelo método de difusão em ágar baseia-se no contato indireto do biomaterial com a monocamada de células, sendo o ágar corado com vermelho neutro o meio pelo qual ocorre a difusão dos componentes do biomaterial.

O vermelho neutro é um corante vital, solúvel em água e que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal (Rogerio *et al.*, 2003). Assim, quando o material testado é nocivo à célula, estas entram em processo necrótico, o que ocasiona o rompimento da membrana e assim, a liberação do corante. Esse processo determina ao redor e sob o material a formação de uma região descorada referente às células mortas, denominada halo de inibição. Na Tabela 10 está a classificação do grau de citotoxicidade em função do tamanho do halo de inibição formado.

Tabela 10 – Grau de citotoxicidade em função do tamanho do halo de inibição

Halo de inibição	Grau	Citotoxicidade
Ausência de descoramento ao redor ou sob a amostra	0	Ausente
Zona de descoramento limitada à área sob a amostra	1	Leve
Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra menor que 0,5 cm	2	Branda
Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra entre 0,5 e 1,0 cm	3	Moderada
Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra maior que 1,0 cm	4	Severa

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Ovos embrionados, da espécie *Gallus domesticus* e da linhagem Ross, foram adquiridos junto à empresa Rivelli, localizada no município de Mateus Leme – MG.

2.2 Métodos

2.2.1 Avaliação da citotoxicidade do ácido rosmarínico e dos implantes desenvolvidos

Para avaliar a citotoxicidade do AR e dos implantes desenvolvidos foram utilizadas duas linhagens celulares: ARPE-19 e WI26-VA4 (Figuras 34 e 35). A primeira é uma linhagem celular que surgiu espontaneamente a partir da cultura primária de células do EPR humano e possui um alto potencial de crescimento (Dunn *et al.*, 1996). O epitélio pigmentado da retina (EPR) desempenha um papel crítico no desenvolvimento e manutenção dos fotorreceptores adjacentes à retina dos vertebrados, além de contribuir com altos níveis de VEGF para os tecidos do segmento posterior do olho (Ayala Somayajula *et al.*, 2009). A segunda, WI26-VA4, é uma linhagem celular de fibroblastos de pulmão humano muito utilizada em ensaios de citotoxicidade de fármacos.

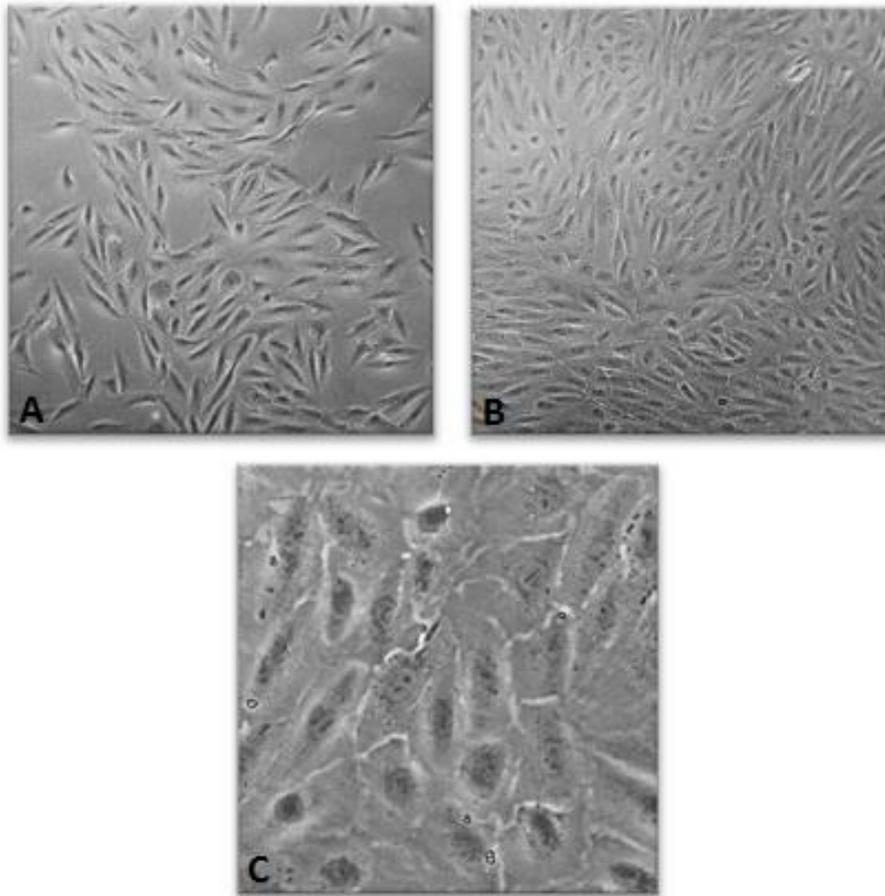


Figura 34– ARPE-19 em aumentos de 20X (A e B) e 100X (C).

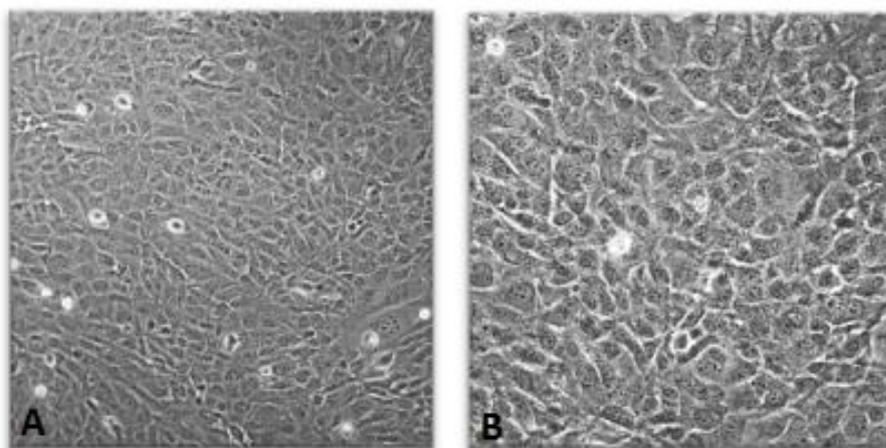


Figura 35 – WI26-VA4 em aumentos de 20X (A) e 40X (B).

2.2.1.1 Teste de citotoxicidade do ácido rosmarínico

A citotoxicidade do AR foi avaliada com as duas linhagens celulares citadas acima. A ARPE-19 foi cultivada com meio DMEM-F12 e a WI26-VA4 com meio EMEM, ambos suplementados com 10% de SBF, tampão hepes (afim de ajustar o pH para 7,2) e normocin. As células foram semeadas em placas de poliestireno de 96 poços na densidade de 1×10^5 células/poço em um volume de 100 μ L/poço de meio suplementado com 10% de SBF e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado e cada poço foi lavado com 100 μ L de PBS, quando se iniciou a aplicação de soluções crescentes de AR (2,5 a 500 μ g/mL), solubilizado em meio de cultura com 1% de SBF. As células foram então incubadas por 24 e 72 horas. Ao final desse tempo, removeu-se o meio adicionou-se 100 μ L de MTT (500 μ g/mL). Após 3 horas de incubação, o formazan formado foi solubilizado em 50 μ L de isopropanol, e os valores de absorvância foram medidos a 550 nm. O desenho das placas está representado no quadro abaixo.

QUADRO 1

Esquema da placa utilizada nos testes de **citotoxicidade do ácido rosmarínico para a ARPE-19 e WI26-VA4.**

Controle	H ₂ O ₂	2,5 μ g/mL	5 μ g/mL	10 μ g/mL	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL	250 μ g/mL	500 μ g/mL		
Controle	H ₂ O ₂	2,5 μ g/mL	5 μ g/mL	10 μ g/mL	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL	250 μ g/mL	500 μ g/mL		
Controle	H ₂ O ₂	2,5 μ g/mL	5 μ g/mL	10 μ g/mL	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL	250 μ g/mL	500 μ g/mL		
Controle	H ₂ O ₂	2,5 μ g/mL	5 μ g/mL	10 μ g/mL	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL	250 μ g/mL	500 μ g/mL		
Controle	H ₂ O ₂	2,5 μ g/mL	5 μ g/mL	10 μ g/mL	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL	250 μ g/mL	500 μ g/mL		
Controle	H ₂ O ₂	2,5 μ g/mL	5 μ g/mL	10 μ g/mL	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL	250 μ g/mL	500 μ g/mL		
Controle	H ₂ O ₂	2,5 μ g/mL	5 μ g/mL	10 μ g/mL	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL	250 μ g/mL	500 μ g/mL		
Controle	H ₂ O ₂	2,5 μ g/mL	5 μ g/mL	10 μ g/mL	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL	250 μ g/mL	500 μ g/mL		

2.2.1.2 Teste de citotoxicidade dos implantes

A citotoxicidade dos implantes foi avaliada com a ARPE-19. O procedimento foi realizado conforme descrito acima, porém, foi adicionado um fragmento dos implantes, de 1 mm de comprimento, em cada poço com meio de cultura, ao invés das soluções de ácido rosmarínico. Os seguintes implantes foram testados: PLGA branco e PLGA + AR (25%). O desenho das placas está representado no quadro abaixo.

QUADRO 2

Esquema da placa utilizada nos testes de citotoxicidade dos implantes desenvolvidos para a ARPE-19.

Controle	H ₂ O ₂	PLGA + RA	PLGA										
Controle	H ₂ O ₂	PLGA + RA	PLGA										
Controle	H ₂ O ₂	PLGA + RA	PLGA										
Controle	H ₂ O ₂	PLGA + RA	PLGA										
Controle	H ₂ O ₂	PLGA + RA	PLGA										
Controle	H ₂ O ₂	PLGA + RA	PLGA										
Controle	H ₂ O ₂	PLGA + RA	PLGA										
Controle	H ₂ O ₂	PLGA + RA	PLGA										

Os resultados obtidos foram expressos como a média da porcentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão. Os dados foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA Two-way) e pelo pós-teste de Bonferroni. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

2.2.2 Teste de biocompatibilidade dos implantes

2.2.2.1 Teste de biocompatibilidade pelo método de difusão em ágar

Para a realização do ensaio, foram utilizadas placas de 6 poços nas quais foram semeadas 2×10^5 células/poço (ARPE-19) e incubadas por 24 horas em meio DMEM-F12 a 10% de SBF. Após esse período, o meio de cultura foi descartado e foi adicionado meio contendo 10% de SBF, 1,5% de ágar e 0,4% de vermelho neutro, sendo o ágar fundido no momento do uso e misturado ao meio concentrado. Os implantes foram colocados sobre o ágar solidificado, sendo o polietileno (tampa de criotubo), comprovadamente atóxico, utilizado como controle negativo. As placas foram novamente incubadas por 24, 48 e 72 horas, sendo o experimento realizado em triplicata. Os seguintes implantes e polímeros foram testados: PLGA branco e PLGA + AR (25%).

2.2.3 Estabilidade do ácido rosmarínico no meio de cultura celular

Foi realizada a avaliação da estabilidade do fármaco nos meios de cultura utilizados nos ensaios biológicos in vitro. Para isso, foram preparadas soluções de AR em DMEM-F12 e EMEM na concentração de 130 µg/mL cujas amostras foram incubadas a 37 °C. Em intervalos de tempo pré-determinados, foram retiradas alíquotas das amostras para análise em CLAE a fim de quantificar o fármaco presente.

2.2.4 Ensaio da membrana corioalantóica (MCA)

A análise da atividade antiangiogênica do AR e do implante de PLGA contendo este fármaco, quando comparados com o Bevacizumabe, foi realizada por meio do ensaio da MCA com a metodologia adaptada de Burt *et al.*, 1995 e Knoll *et al.*, 1999.

Ovos embrionados foram incubados à temperatura de 37°C e 60% de umidade relativa do ar, na posição horizontal e rotação constante, utilizando uma incubadora automática digital Premium Ecológica®. Após 72 horas, ou seja, no 3º dia do desenvolvimento embrionário, foi feita uma abertura circular de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro na região da câmara de ar da casca dos ovos, descartando-se os ovos inviáveis (não embrionados). Retirou-se a membrana interna da casca para a exposição da MCA e selaram-se os ovos com fita crepe. Com auxílio de um suporte de isopor, os ovos foram acondicionados verticalmente na incubadora, onde permaneceram até o 5º dia de desenvolvimento.

Primeiramente, foram colocados sobre a MCA, exceto no grupo tratado com os implantes, discos de celulose de tamanho padronizado, onde foram aplicados 20 µL das soluções dos fármacos a serem testados. Os seguintes grupos de tratamento foram estabelecidos:

- Ácido rosmarínico (250 e 500 µg/mL);
- Implantes de PLGA e ácido rosmarínico (25%);
- Implantes de PLGA branco;
- Bevacizumabe 250 e 500 µg/mL;
- Controle (PBS pH 7,4).

Após 24 horas, ou seja, no 6º dia de incubação, as soluções foram reaplicadas e os grupos dos implantes foram monitorados. No 7º dia de incubação, realizou-se a extração das MCAs após prévia fixação com solução de formaldeído a 3,7% por 10 minutos, que foram posteriormente fotografadas com uma câmera digital acoplada a um estereomicroscópio. As imagens obtidas foram analisadas com o auxílio do programa ImageJ versão 1.44 para a quantificação dos vasos sanguíneos. Os equipamentos utilizados na incubação dos ovos estão na Figura 36.



Figura 36 – Equipamentos utilizados para a incubação dos ovos. A) Incubadora automática; B) Posição vertical dos ovos na incubadora.

O bevacizumabe foi utilizado com o intuito de se validar o experimento, visto que possui atividade antiangiogênica comprovada, sendo utilizado na prática clínica para o tratamento de câncer e de doenças oculares causadoras de neovascularização por meio de injeções intravítreas. Além disso, foi realizada a comparação da resposta obtida no tratamento com o AR e o bevacizumabe.

2.2.4.1 Avaliação quantitativa dos vasos nas imagens obtidas da MCA

As MCAs foram observadas ao estereomicroscópio Motic com câmera Motic Cam acoplada, sendo as imagens obtidas pelo *software* Motic Images Plus 2.0, com um aumento padronizado de 20X. Na Figura 37 estão presentes os equipamentos citados acima.

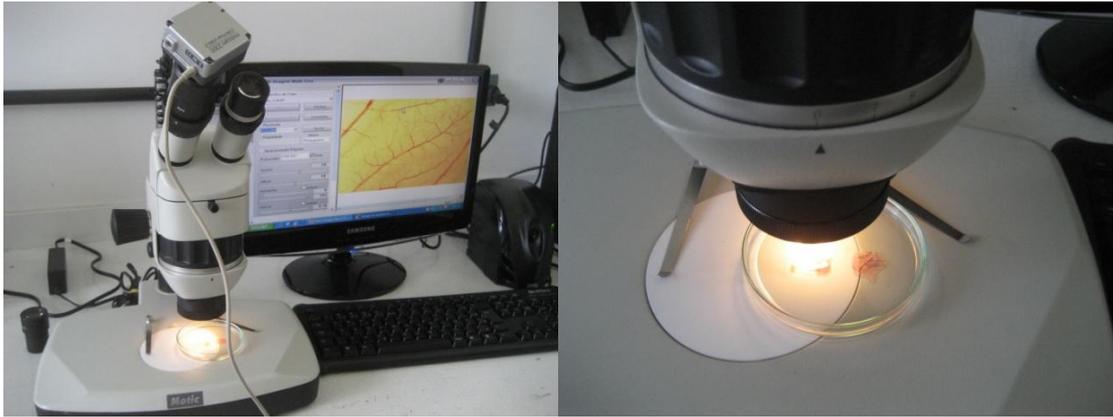


Figura 37 – Equipamentos utilizados para a obtenção das imagens da MCA.

A fim de padronizar a área a ser analisada de cada imagem pelo programa ImageJ, só foram quantificados os vasos presentes na região relativa aos discos de celulose. Assim, inicialmente a área do disco foi selecionada e todo o restante foi apagado (Figura 38 A e B). Após isso, o *plugin* Color Threshold foi utilizado para transformar a imagem em preto e branco e assim selecionar apenas os tons vermelhos da imagem (relativos aos vasos sanguíneos) (Figura 38 C e D). As áreas brancas representam o que foi descartado (sem coloração vermelha).

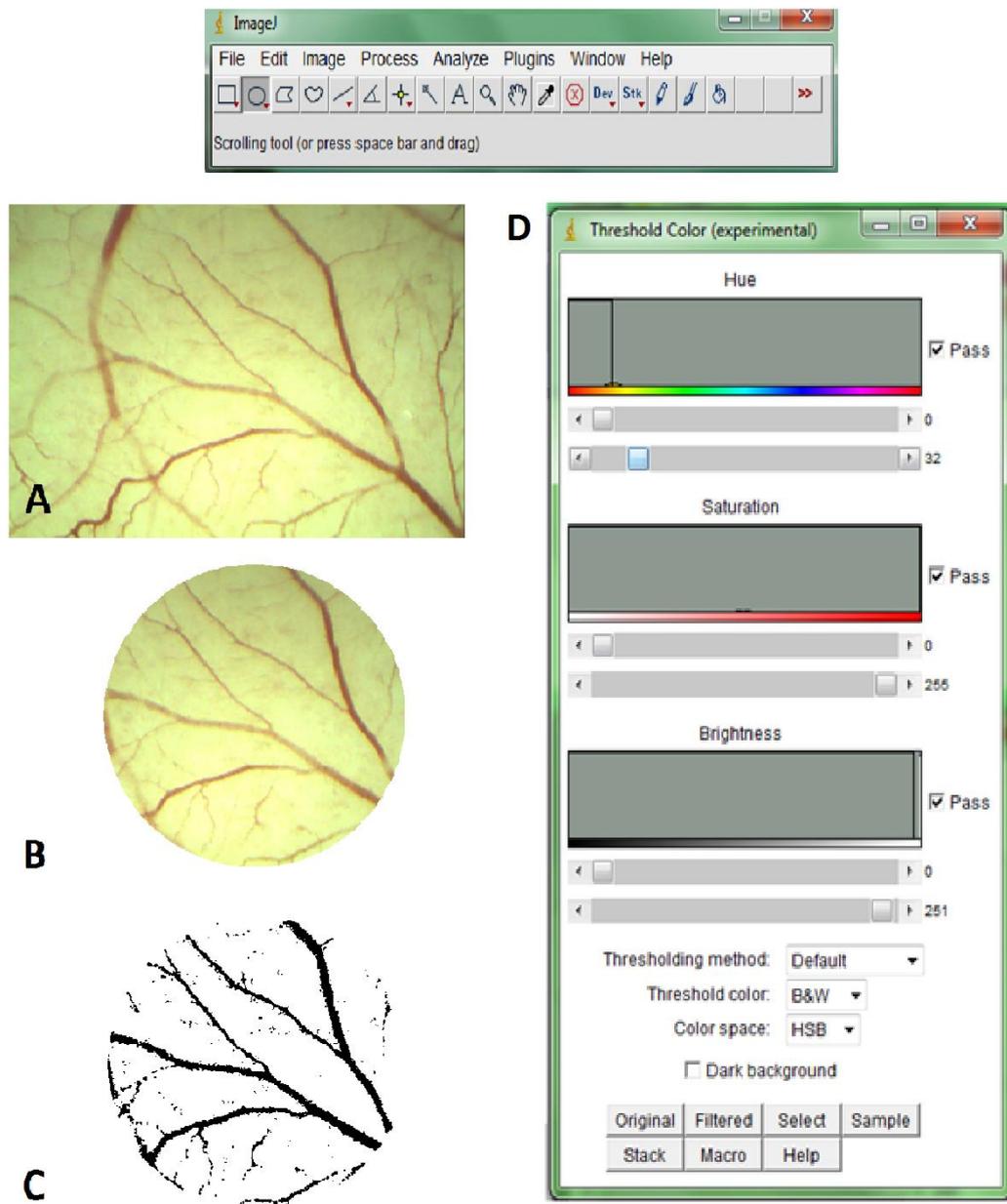


Figura 38 – Tratamento das imagens obtidas das MCAs. A) Imagem de uma MCA de uma embrião de 7 dias; B) Imagem após a seleção da área referente ao disco de celulose; C) Imagem em preto e branco após o tratamento com a ferramenta Color Threshold; D) *Plugin* Color Threshold utilizado para selecionar os tons de vermelho da imagem, referentes aos vasos sanguíneos da MCA.

Após o tratamento das imagens, a quantificação foi realizada utilizando-se o plugin Analyze Particles, sendo a área referente aos vasos obtida em pixels. Os resultados foram expressos como percentual de vasos \pm desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de citotoxicidade do ácido rosmarínico

A fim de se avaliar a citotoxicidade do AR, foi realizado o ensaio de viabilidade celular de conversão mitocondrial do sal de tetrazólio (MTT) com células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19) e fibroblastos pulmonares humanos (WI26-VA4). Foram testadas soluções de concentrações crescentes de AR (2,5 a 500 $\mu\text{g/mL}$) por 24 e 72 horas, sendo o experimento realizado em triplicata. Na Figura 39 e 40 está representada a porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle (tratado com meio de cultura).

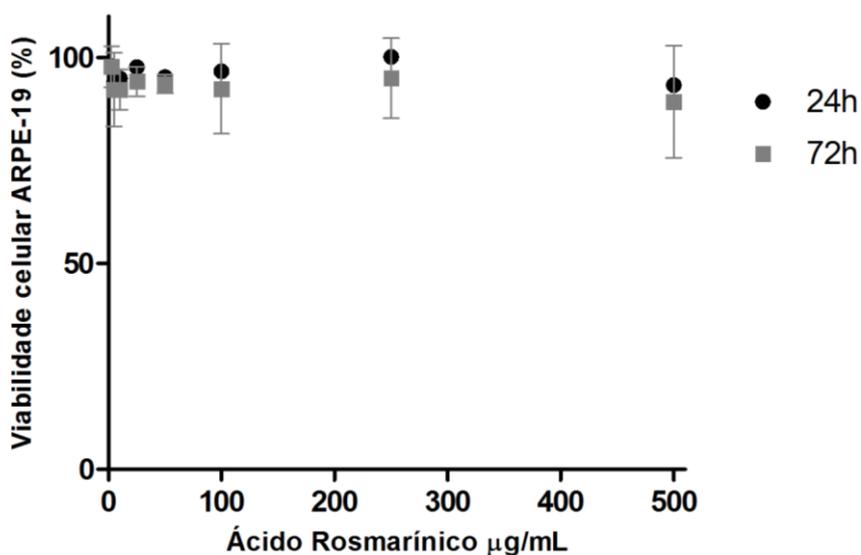


Figura 39 – Efeito do ácido rosmarínico sobre a viabilidade de células ARPE-19 após 24 (•) e 72 (▪) horas de tratamento. A viabilidade das células tratadas com AR foi expressa em relação à viabilidade das células do grupo controle, tratado com meio de cultura, fixada em 100%.

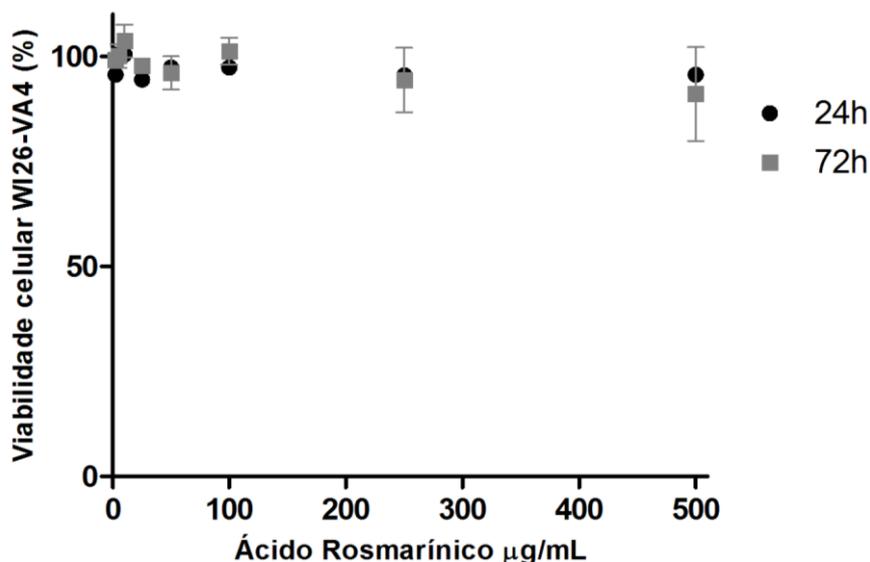


Figura 40 – Efeito do ácido rosmarínico sobre a viabilidade de células WI26-VA4 após 24 (•) e 72 (▪) horas de tratamento. A viabilidade das células tratadas com AR foi expressa em relação à viabilidade das células do grupo controle, tratado com meio de cultura, fixada em 100%.

Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA Two-way) seguida pelo pós-teste de Bonferroni onde $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Inicialmente, os resultados mostraram que o AR, mesmo em concentrações elevadas, não afetou a viabilidade de ambas as linhagens celulares testadas, assim como não houve redução da viabilidade celular com o aumento do tempo de tratamento, já que não houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas referentes a 24 e 72 horas. O valor de p foi determinado em 0,1340 para o ensaio com a ARPE-19 e em 0,6943 para o ensaio com a WI26-VA4. Não foi possível calcular o valor de IC_{50} dentro da faixa de concentrações testadas.

A partir da análise preliminar desses resultados pode-se inferir que dentro da faixa de concentrações testadas, o AR não apresenta um efeito citotóxico significativo, assim como esse efeito não é intensificado com o tempo, sugerindo que o tratamento prolongado poderia ser seguro tanto para tecidos oculares (células do epitélio pigmentado da retina) quanto para células normais (fibroblastos pulmonares).

Resultados semelhantes foram descritos por Huang e Zheng (2006) e Kim e colaboradores (2009) utilizando, porém, células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) e células do endotélio microvascular da retina humana (HRMEC), respectivamente.

3.2 Teste de citotoxicidade dos implantes

Objetivando-se avaliar a citotoxicidade dos implantes poliméricos desenvolvidos, foi realizado o ensaio de viabilidade celular (MTT) com células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19). Foram testados os implantes de PLGA brancos e os que continham 25% de AR homogeneamente disperso na matriz polimérica, por 24 e 72 horas, sendo o experimento realizado em triplicata. Na Figura 41 está representada a porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle (tratado com meio de cultura).

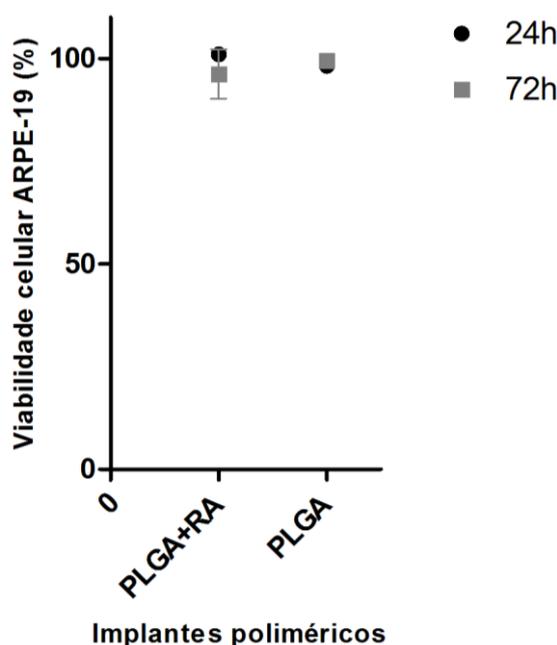


Figura 41 – Efeito dos implantes desenvolvidos (PLGA branco e com 25% de AR) sobre a viabilidade de células ARPE-19 após 24 (●) e 72 (■) horas de tratamento. A viabilidade das células tratadas com os implantes foi expressa em relação à viabilidade das células do grupo controle, tratado com meio de cultura, fixada em 100%.

Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA Two-way) seguida pelo pós-teste de Bonferroni onde $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Os resultados mostraram inicialmente, que os implantes desenvolvidos, tanto os brancos tanto os que continham o AR, não afetaram a viabilidade da ARPE-19, assim como não houve redução da viabilidade celular com o aumento do tempo de tratamento, já que não houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas referentes a 24 e 72 horas de tratamento ($p = 0,4285$). A partir desses resultados pode-se inferir que os implantes desenvolvidos não apresentam um efeito citotóxico significativo, assim como esse efeito não é intensificado com o tempo, sugerindo que o tratamento prolongado com os sistemas contendo AR seria seguro para os tecidos oculares.

3.3 Teste de biocompatibilidade pelo método de difusão em ágar

As placas de 6 poços contendo células ARPE-19, relativas ao tratamento de 24, 48 e 72 horas, foram analisadas macroscopicamente quanto a presença de halo, e microscopicamente quanto a integridade celular ao redor dos implantes.

A toxicidade é constatada pela presença de um halo ao redor do material testado (halo de inibição), cujo diâmetro pode ser mensurado com o auxílio de uma régua milimétrica. Como pode ser observado na Figura 42, após 24 horas de tratamento, os implantes de PLGA branco e PLGA + AR (25%) não apresentaram efeito tóxico pelo método de difusão em ágar, já que as células se mostraram íntegras e sem alterações morfológicas, além de não ter sido observada a formação de halo ao redor ou sob as amostras.

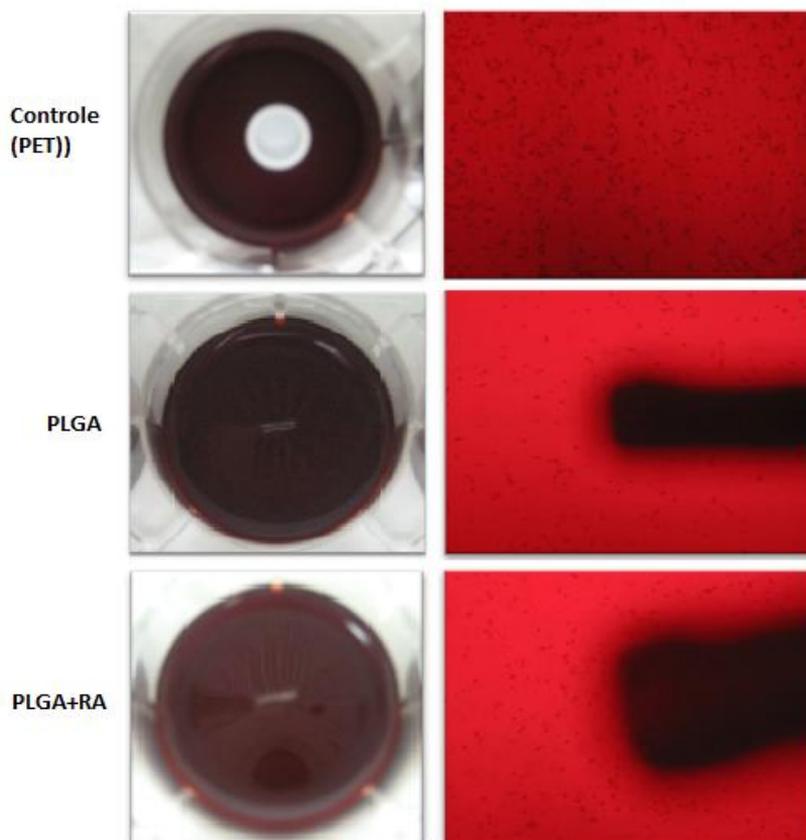


Figura 42 – Teste de biocompatibilidade pelo método de difusão em ágar. Nos poços referentes aos implantes de PLGA e PLGA + AR não houve a formação de halo de inibição e as células (ARPE-19) se mantiveram íntegras.

A partir dos resultados obtidos nos testes de citotoxicidade (MTT) e de biocompatibilidade pelo método de difusão em ágar, pode-se inicialmente inferir que os implantes de PLGA + AR (25%) são biocompatíveis e não citotóxicos, resultados confirmados pelo ensaio da MCA.

3.4 Estabilidade do ácido rosmarínico no meio de cultura celular

Após a obtenção dos resultados relativos aos ensaios biológicos *in vitro*, surgiu o questionamento com relação à estabilidade do AR no meio de cultura das células utilizadas nos experimentos, visto que, mesmo em concentrações elevadas o AR

não promoveu morte celular relevante em ambas as linhagens utilizadas (ARPE-19 e WI26-VA4).

A fim de determinar a estabilidade do AR nos meios de cultura foram preparadas soluções de 130 $\mu\text{g/mL}$ do fármaco em DMEM-F12 e EMEM, cujas amostras foram incubadas a 37 °C. Alíquotas foram analisadas por CLAE imediatamente após o preparo das soluções e após 1, 2, 16 e 24 horas de incubação, quando foi quantificado o AR presente. O resultado foi expresso em quantidade de AR encontrado em relação à concentração inicial (obtida imediatamente após o preparo das soluções), fixada em 100%.

As Figuras 43 e 44 apresentam os cromatogramas obtidos das soluções de AR 130 $\mu\text{g/mL}$ em DMEM-F12 e EMEM, respectivamente, logo após o preparo. Utilizando o método de quantificação do ácido rosmarínico desenvolvido neste trabalho, a concentração real do fármaco nos meios DMEM-F12 e EMEM foi determinada respectivamente em 131,55 e 129,05 $\mu\text{g/mL}$, sendo estes valores fixados como 100% para os cálculos seguintes.

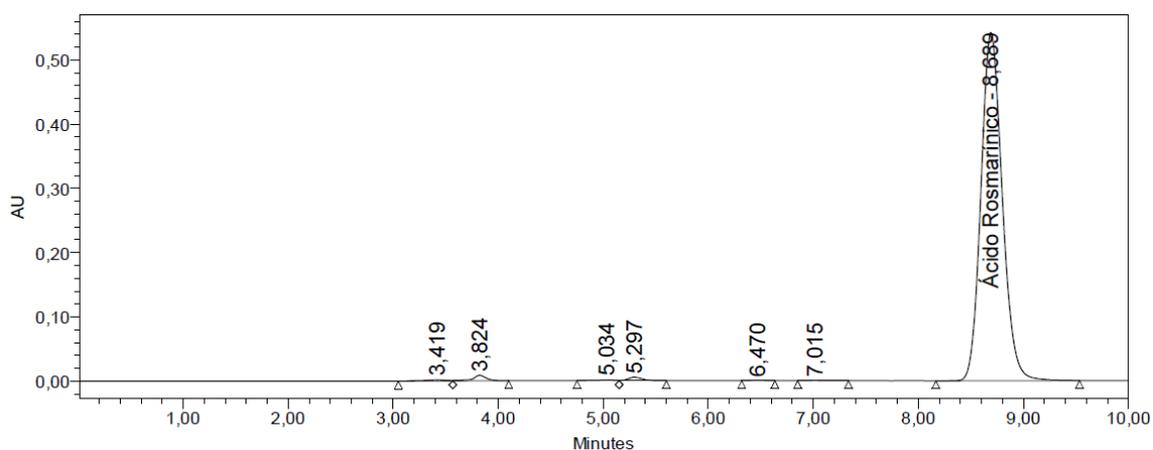


Figura 43 – Cromatograma obtido para o AR (131,55 $\mu\text{g/mL}$) em DMEM-F12 imediatamente após o preparo da solução.

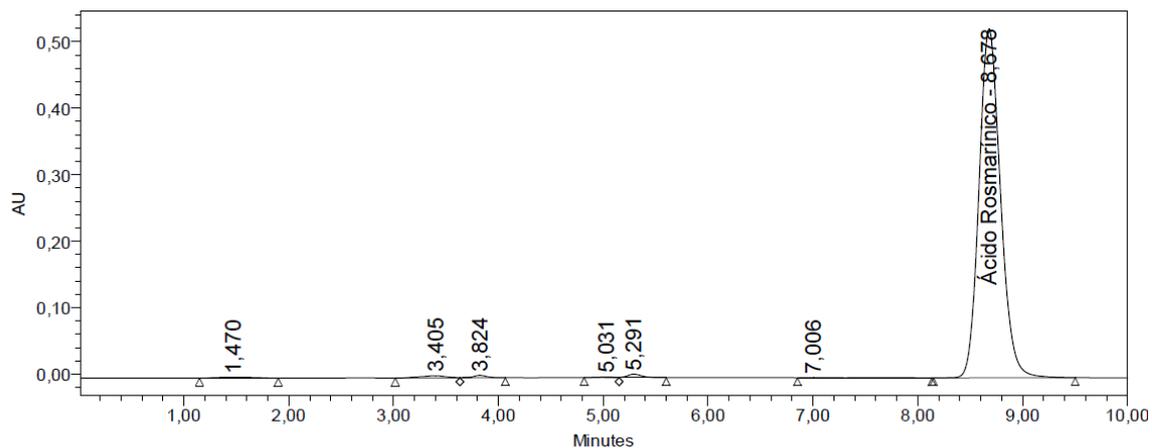


Figura 44 – Cromatograma obtido para o AR (129,05 µg/mL) em EMEM imediatamente após o preparo da solução.

Após 1 hora de incubação, a solução de AR em DMEM-F12 apresentou uma concentração de 128,81 µg/mL, ou seja, 97,9% da concentração inicial. Já a solução de AR em EMEM apresentou uma concentração de 125,41 µg/mL, ou seja, 97,2% da concentração inicial (Figuras 45 e 46).

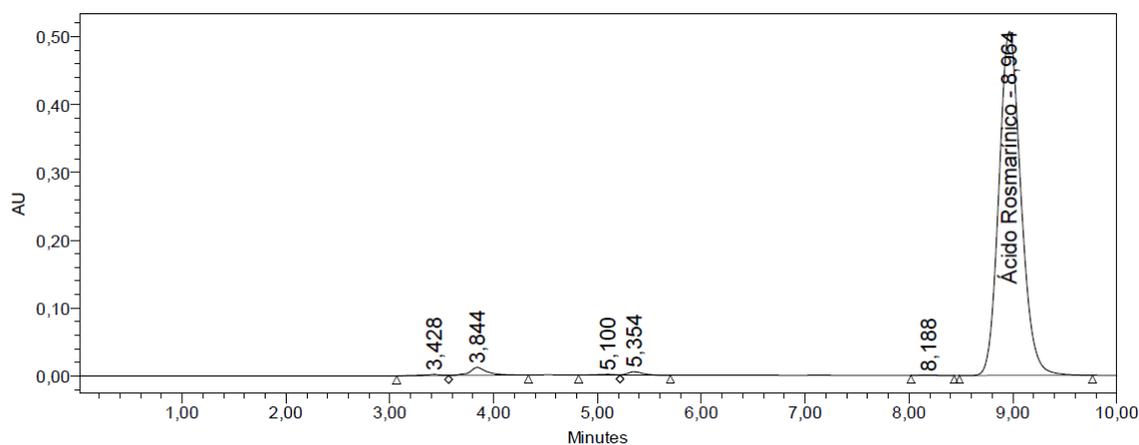


Figura 45 – Cromatograma obtido para o AR (concentração inicial de 131,55 µg/mL) em DMEM-F12 após 1 hora de incubação, apresentando uma concentração de 128,81 µg/mL, ou seja, 97,9% da concentração inicial.

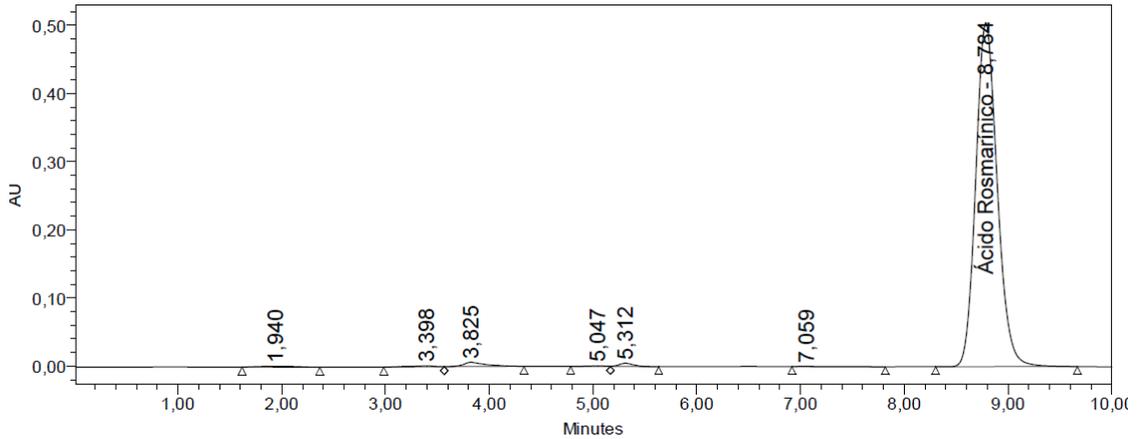


Figura 46 – Cromatograma obtido para o AR (concentração inicial de 129,05 µg/mL) em EMEM após 1 hora de incubação, apresentando uma concentração de 125,41 µg/mL, ou seja, 97,2% da concentração inicial.

Após 2 horas de incubação, a solução de AR em DMEM-F12 apresentou uma concentração de 122,16 µg/mL, ou seja, 92,9% da concentração inicial. Já a solução de AR em EMEM apresentou uma concentração de 119,18 µg/mL, ou seja, 92,3% da concentração inicial (Figuras 47 e 48).

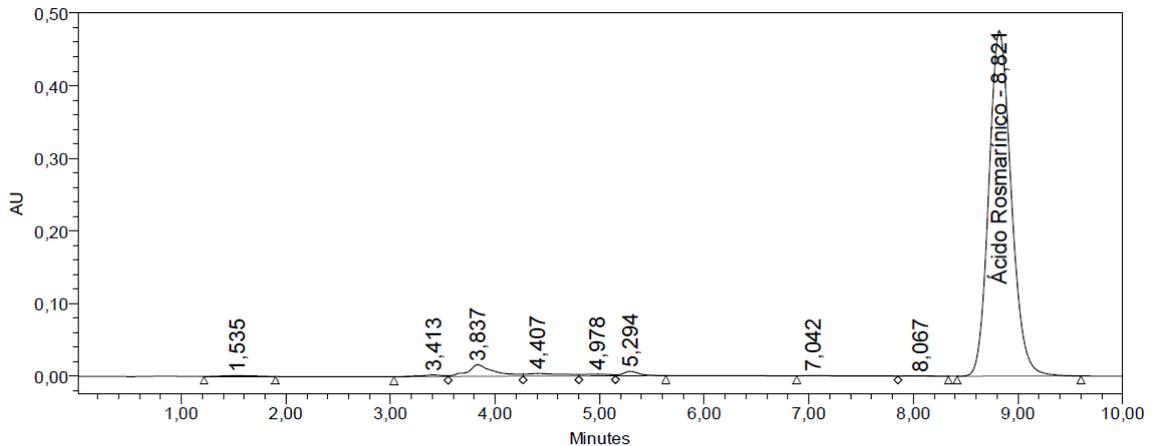


Figura 47 – Cromatograma obtido para o AR em DMEM-F12 após 2 horas de incubação, apresentando uma concentração de 122,16 µg/mL, ou seja, 92,9% da concentração inicial.

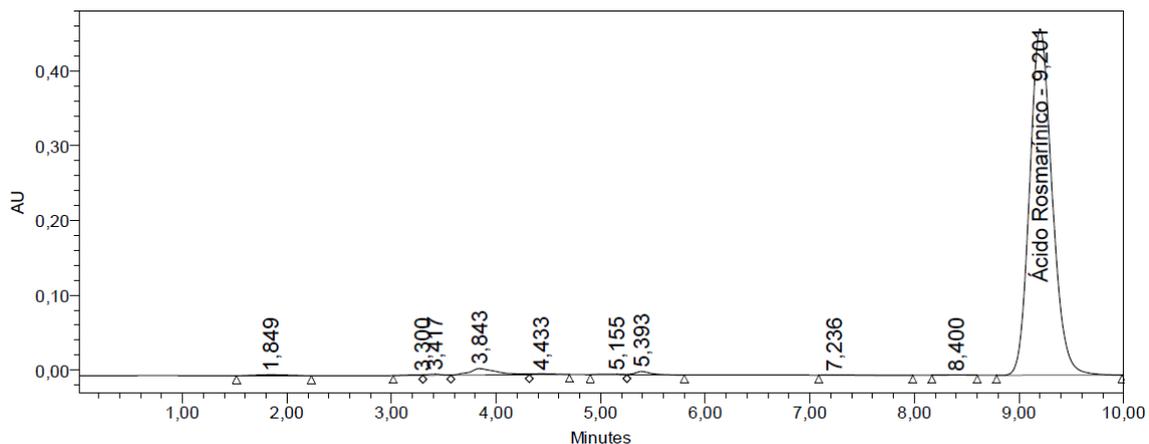


Figura 48 – Cromatograma obtido para o AR em EMEM após 2 horas de incubação, apresentando uma concentração de 119,18 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, 92,3% da concentração inicial.

Após 16 horas de incubação, 95,6% e 95,9% do AR em DMEM-F12 e EMEM, respectivamente, havia degradado (Figuras 49 e 50), sendo que após 24 horas de incubação só foram detectados nas amostras picos referentes aos componentes dos meios de cultura celular e possíveis produtos de degradação do fármaco (Figura 51 e 52). Tal fato inviabiliza a realização de ensaios *in vitro* com o fármaco, visto que estes possuem a duração de no mínimo 24 horas, sendo que foi observada a completa degradação do fármaco nesse período.

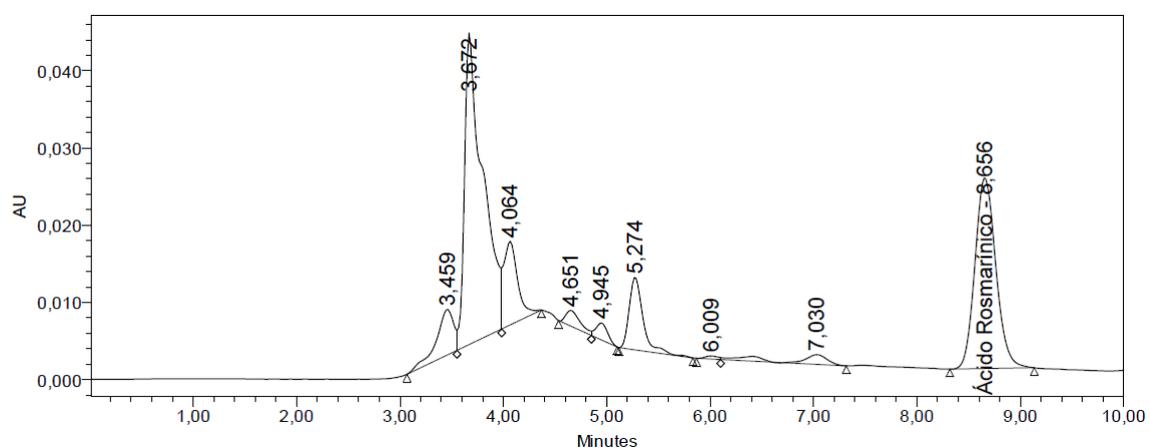


Figura 49 – Cromatograma obtido para o AR em DMEM-F12 após 16 horas de incubação, apresentando uma concentração de 5,85 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, 4,44% da concentração inicial.

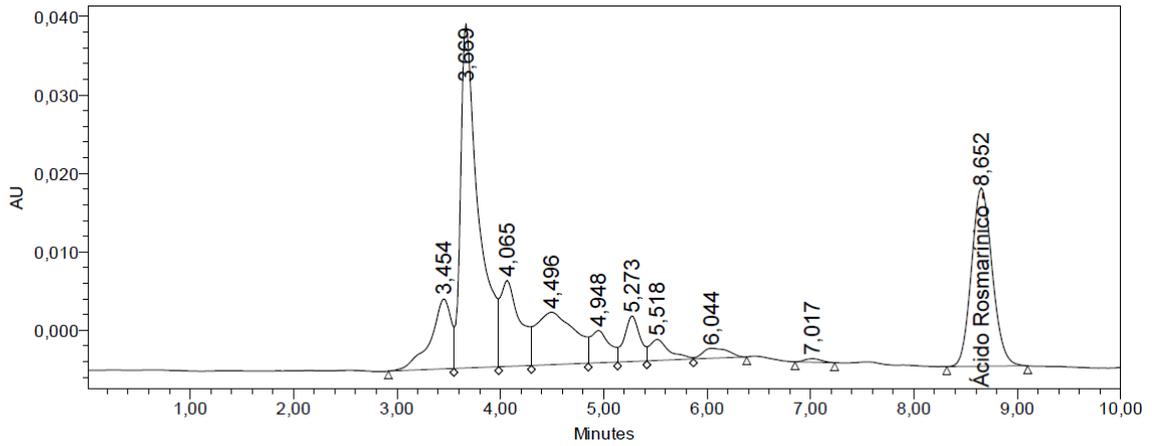


Figura 50 – Cromatograma obtido para o AR em EMEM após 16 horas de incubação, apresentando uma concentração de 5,33 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, 4,13% da concentração inicial.

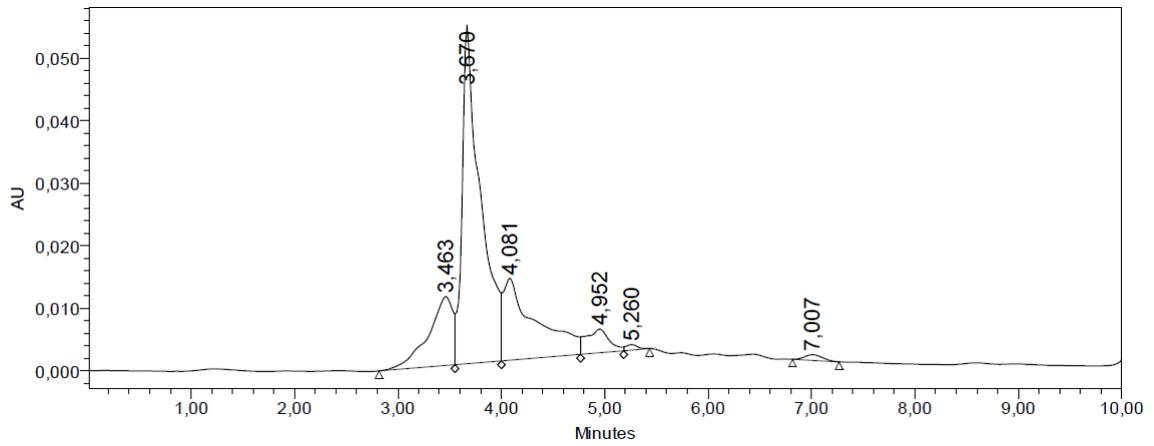


Figura 51 – Cromatograma obtido para o AR em DMEM-F12 após 24 horas de incubação tendo o fármaco sido totalmente degradado.

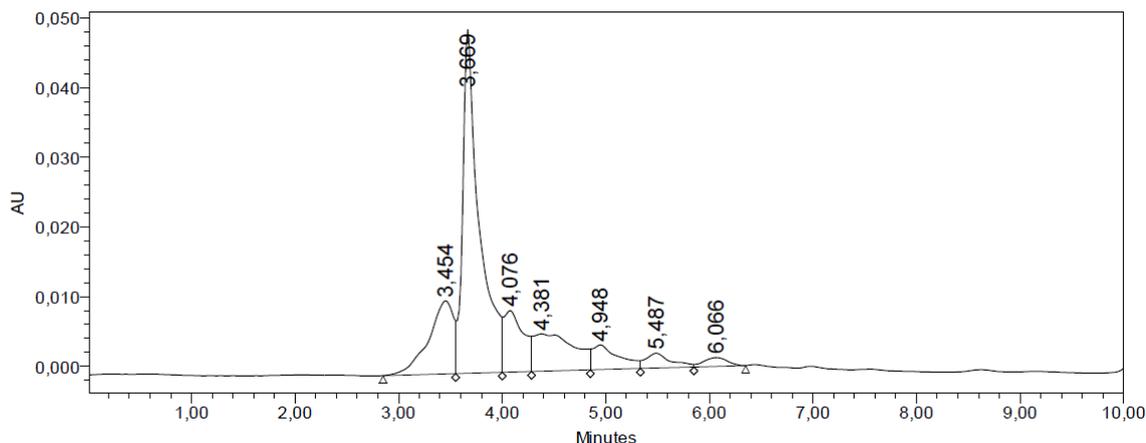


Figura 52 – Cromatograma obtido para o AR em EMEM após 24 horas de incubação tendo o fármaco sido totalmente degradado.

Resultados semelhantes foram encontrados por Long e colaboradores (2010) que relatam a rápida oxidação do AR em três meios de cultura comumente utilizados (DMEM, RPMI e MEM) com a geração de altos níveis de peróxido de hidrogênio como produto de degradação. Entretanto, tendo em vista os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, pode-se dizer que a degradação evidenciada neste trabalho não levou à formação de peróxido de hidrogênio, já que este composto é comprovadamente citotóxico e não foi observada a redução da viabilidade celular de ambas as linhagens estudadas.

Segundo Long e colaboradores (2010), os mecanismos de catálise da oxidação do AR nos meios de cultivo celular estudados foram investigados, porém, não estão completamente elucidados, embora íons bicarbonato e metálicos possam estar envolvidos. É necessário, portanto, a realização de novos experimentos a fim de elucidar o mecanismo de degradação do ácido rosmarínico nos meios estudados.

Tal fato não foi avaliado por diversos autores, que realizaram ensaios com o AR nos meios de cultura citados anteriormente (Konishi, 2005; Lee *et al.*, 2006; Scheckel *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2009; Xavier *et al.*, 2009; Furtado *et al.*, 2010; Vostalova *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011).

Os resultados encontrados inviabilizam então, a utilização de ensaios *in vitro* para a avaliação da citotoxicidade e atividade do AR, sugerindo-se como alternativa a utilização de modelos *in vivo*.

3.5 Ensaio da membrana corioalantóica (MCA)

A análise da atividade antiangiogênica do AR foi realizada por meio do ensaio da membrana corioalantóica do embrião de galinha. Para tal, foram aplicadas nas MCAs soluções de AR (250 e 500 $\mu\text{g/mL}$), soluções de bevacizumabe (250 e 500 $\mu\text{g/mL}$), implantes de PLGA branco e contendo 25% de AR, além de PBS (controle). Para cada grupo foram utilizados 12 embriões ($n=12$). A resposta foi mensurada em função da área (pixels) relativa aos vasos sanguíneos em relação ao grupo controle (PBS).

Os dados obtidos foram avaliados por meio do teste t de student onde $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados são apresentados nas Figuras 53 e 54, sendo expressos como percentual de vasos sanguíneos (média) \pm desvio padrão.

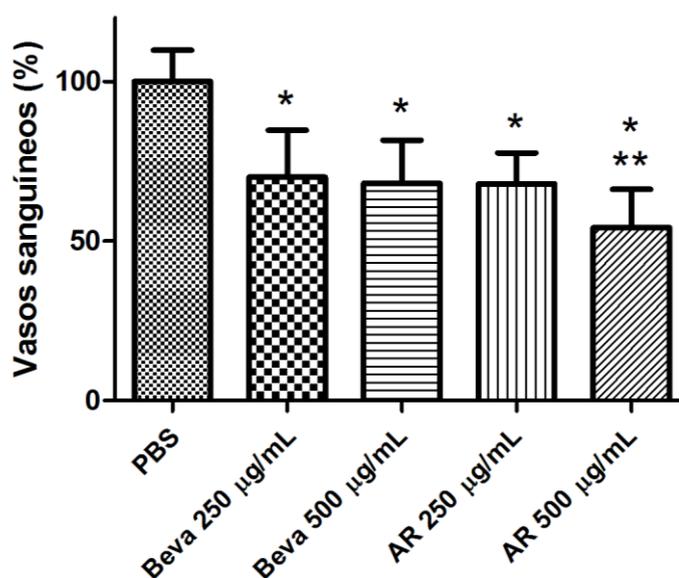


Figura 53 – Ensaio da membrana corioalantóica realizado com PBS (controle), bevacizumabe (250 e 500 $\mu\text{g/mL}$) e AR (250 e 500 $\mu\text{g/mL}$). O percentual de vasos sanguíneos do grupo tratado foi expresso em relação ao percentual do grupo controle, fixado em 100%. * Significativamente diferente do grupo controle. ** Significativamente diferente do grupo tratado com bevacizumabe (500 $\mu\text{g/mL}$) ($P < 0,05$).

O tratamento com bevacizumabe na concentração de 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ promoveu uma redução de $29,93 \pm 5,41 \%$ e $31,86 \pm 5,04 \%$ respectivamente, na porcentagem dos vasos em relação ao grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa na resposta obtida entre os dois grupos tratados. Já a aplicação de soluções de AR nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ levaram a uma redução de $32,04 \pm 3,70 \%$ e $45,70 \pm 4,76 \%$ nos vasos respectivamente, sendo considerada estatisticamente significativa a diferença entre o tratamento com 500 $\mu\text{g/mL}$ de AR e o com 500 $\mu\text{g/mL}$ bevacizumabe ($13,84 \pm 5,59 \%$).

Pode-se dizer então que o tratamento realizado com AR 500 $\mu\text{g/mL}$ foi mais eficiente que o tratamento realizado com a mesma concentração de bevacizumabe, fármaco com importante e comprovada ação antiangiogênica.

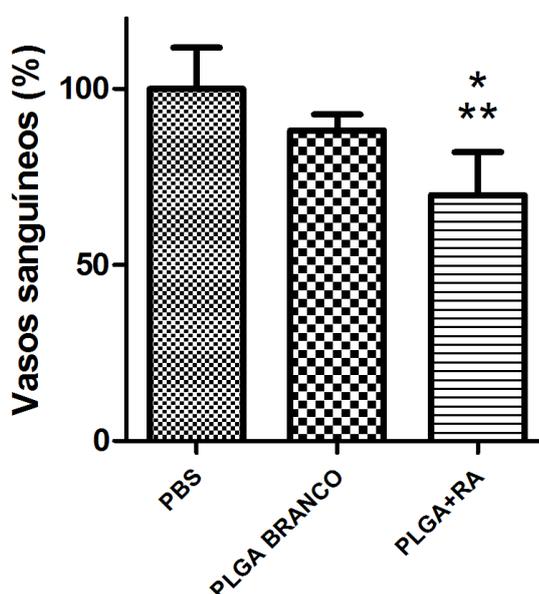


Figura 54 – Ensaio da membrana corioalantóica realizado com PBS (controle) e implantes de PLGA branco e contendo AR (25%). O percentual de vasos sanguíneos do grupo tratado foi expresso em relação ao percentual do grupo controle, fixado em 100%. * Significativamente diferente do grupo controle. ** Significativamente diferente do grupo tratado com PLGA branco ($P < 0,05$).

A aplicação tópica de implantes brancos de PLGA não levou a uma redução estatisticamente significativa dos vasos em relação ao grupo controle. Já o tratamento realizado com os implantes de PLGA contendo AR na concentração de

25% (p/p) promoveu uma redução de $30,19 \pm 7,25$ % dos vasos, resultado semelhante ao apresentado pelo bevacizumabe.

Foi observado que a administração tópica de AR em solução e no implante polimérico inibiu seletivamente a angiogênese dos pequenos vasos e capilares nas condições adotadas. Os grandes vasos preexistentes se mantiveram inalterados apesar de ter sido observado uma pequena redução do seu diâmetro, comportamento relatado por Clark (2007) e Nowak-Sliwinska e colaboradores (2010).

Além disso, após a aplicação dos implantes sobre a MCA não foi observada neovascularização, resposta inflamatória aguda nem lise vascular, indicando que tanto os implantes brancos quanto os contendo AR são biocompatíveis, resultado comprovado pelo teste de biocompatibilidade pelo método de difusão em ágar e pelo MTT.

Os resultados sugerem que o AR, assim como o seu sistema de liberação prolongada de PLGA, possuem um grande potencial para o tratamento de doenças causadoras de neovascularização retiniana, devido à biocompatibilidade e atividade antiangiogênica promissora *in vivo*, avaliada no modelo da MCA.

4 CONCLUSÃO

A instabilidade do AR nos meios de cultivo celular observada nesse trabalho, inviabilizam a utilização de ensaios biológicos *in vitro* para a avaliação da citotoxicidade e atividade do fármaco e dos sistemas desenvolvidos. Como alternativa, sugere-se a posterior utilização de modelos *in vivo* para a avaliação desses parâmetros.

A avaliação da atividade antiangiogênica *in vivo* do AR e dos sistemas biodegradáveis desenvolvidos, realizada por meio do ensaio da membrana corioalantóica, apresentou resultados satisfatórios para a aplicação dos implantes no tratamento de doenças causadoras da neovascularização retiniana. São necessários, entretanto, outros estudos a fim de se confirmar o potencial desses sistemas e avaliar a sua aplicação clínica.

CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi desenvolvido um método analítico que se mostrou adequado para quantificação do AR durante os estudos de liberação *in vitro* dos sistemas poliméricos desenvolvidos.

Os resultados sugerem que foi possível obter implantes biodegradáveis para a liberação de AR por meio de métodos reprodutíveis que disponibilizam o fármaco presente de forma dispersa nas matrizes poliméricas e na sua forma biologicamente ativa. As técnicas de caracterização empregadas mostraram a ausência de modificações estruturais nos grupos funcionais do AR e do PLGA.

No estudo *in vivo* preliminar, realizado por meio do ensaio da membrana corioalantóica para a avaliação da atividade antiangiogênica do AR, foi observada a biocompatibilidade e a viabilidade da aplicação dos sistemas desenvolvidos no tratamento de doenças causadoras da neovascularização retiniana.

Como perspectiva, pretende-se avaliar em estudos de liberação *in vivo*, a segurança e a viabilidade da utilização dos sistemas aqui desenvolvidos quanto à disponibilização de doses terapêuticas efetivas do fármaco no corpo vítreo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDER, V.A.; CRINGLE, S.J. Diabetic retinopathy: early functional changes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 24, p. 785-788, 1997.

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

AMO, E. M.; URTTI, A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment. *Drug discovery today*, v. 13, n. 3, p. 135-43, 2008.

ANDRADE, S.P. *et al.* Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. *Microvascular Research*, v. 54, p. 253-261, 1997.

ANDRADE, T. A. M. Atividade da biomembrana de látex natural da neoformação seringueira *Hevea brasiliensis* na neoformação tecidual em camundongos. *Universidade de São Paulo*. 2007.

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

AUERBACH, R. *et al.* Angiogenesis assays: a critical overview. *Clinical chemistry*, v. 49, n. 1, p. 32-40, 2003.

AUGUSTIN, A.J. Change of treatment paradigms for wet age-related macular degeneration. (Business Briefing) *European Pharmacotherapy*, p. 1-3, 2006.

AVARD, C.; GUYOT-ARGETON, C.; ASSOULINE, M.; MARIE-LESCURE, C.; POULIQUEN, Y.J.M. Full panretinal photocoagulation and early vitrectomy improve prognosis of floid diabetic retinopathy. *Ophthalmology*, v. 103, p. 561-574, 1996.

AYALASOMAYAJULA S. P. *et al.* Fluocinolone inhibits VEGF expression via glucocorticoid receptor in human retinal pigment epithelial (ARPE-19) cells and TNF-alpha-induced angiogenesis in chick chorioallantoic membrane (CAM). *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*, v. 25, n. 2, p.97-103, 2009.

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

BLACHER, S. *et al.* Quantification of angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane (CAM). *Image Analysis & Stereology*, v. 24, p. 169-180, 2005.

BOSCO *et al.* Retinopatia Diabética. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, v. 49(2), p. 217-227, 2005.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 2003.

BRASIL. Inibidores da angiogênese para o tratamento da degeneração macular relacionada à idade. *Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde*, p. 1-13, 2008.

BRESSLER, N.M. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: two-year results of 2 randomized clinical trials-tap report 2. *Archives of Ophthalmology*, v. 119 p.198-207, 2001.

BURT, H. M. *et al.* Controlled delivery of taxol from microspheres composed of a blend of ethylene-vinyl acetate copolymer and poly (d,l-lactic acid). *Cancer Letters*, v. 88, p. 73-79, 1995.

CARMICHAEL, J. *et al.* Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay : Assessment of Chemosensitivity Testing. *Cancer Research*, v. 47, p. 936-942, 1987.

CAVALLO, M.G.; POZZILLI, P.; BIRD, C.; WADHA, M.; MEAGER, A.; VISALLI, N.; *et al.* Cytokines in sera from insulin-dependent diabetic patients at diagnosis. *Clinical e Experimental Immunology*, v. 68, p. 256-259, 1991.

CLARK, A. F. Preclinical efficacy of anecortave acetate. *Survey of Ophthalmology*, v. 52, p. 41-48, 2007.

COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. *BioTechniques*, v. 43, p. 25-30, 2007.

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

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

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

DIMITRIPULOU, C. *et al.* The vascular architecture of the chick chorioallantoic membrane: sequential quantitative evaluation using corrosion casting. *Angiogenesis*, v. 2, p. 255-63, 1998.

DUNN, K. C. *et al.* ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental eye research*, v. 62, p. 155-69, 1996.

DORRELL, M.; UUSITALO-JARVINEN, H.; AGUILAR, E.; FRIEDLANDER, M. Ocular Neovascularization: Basic Mechanisms and Therapeutic Advances. *Survey of Ophthalmology*, v. 52(1), p. S3-S19, 2007.

ELJARRAT-BINSTOCK, E. *et al.* New techniques for drug delivery to the posterior eye segment. *Pharmaceutical research*, v. 27, n. 4, p. 530-43, 2010.

ELLIS, B.E.; TOWERS, G.H.N. Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochemical Journal*, v. 118, p. 291-297, 1970.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.

FERRIS, III F.L. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*, v. 16, p. 322-325, 1993.

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

FIALHO, S. L. *et al.* Implantes biodegradáveis destinados à administração intraocular. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 66, p. 891-896, 2003.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 10931-10934, 1992.

FONG, D. S.; AIELLO, L. P.; FERRIS, F. L.; KLEIN, R. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*, v. 27, p. 2540-2553, 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health & Human Services. AVASTIN™ was approved for commercial marketing or use under § 351 of the Public Health Service Act on February 26, 2004. Rockville, MD, 2004, 9p. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/foi/appletter/2004/125085ltr.pdf>>. Acesso em 24 mar. 2010.

FURTADO, R. A. *et al.* Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. *Journal of applied toxicology*, v. 30, p. 254-9, 2010.

GRAGOUDAS, E.S.; ADAMIS, A.P.; CUNNINGHAM JR, E.T.; FEINSOD, M.; GREENBLATT, M.; SHUBI, P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 41(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*, v. 52, p. 237-268, 2000.

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

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, v. 88, p. 49-92, 1951.

HEEGAND, S. Morphology of the vitreoretinal bander region. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, v. 222, p. 1-31, 1997.

HIRSCHI, K. K.; D'AMORE, P. A. Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *EXS*, v. 79, p. 419-428, 1997.

HOLTZ, F.G.; SHERAIDAH, G.; PAULEIKHOFF, D.; BIRD, A.C. Analysis of lipid deposits extratec from human macular and peripheral Bruch's membrane. *Archives of Ophthalmology*, v. 112(3), p. 402-406, 1994.

HOOKER, C.W.; LOTT, W.B.; HARRICH, D. Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase target distinct phases of early reverse transcription. *Journal of Virology*, v. 75, p. 3095-3104, 2001.

HUANG, S; ZHENG, R. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. *Cancer letters*, v. 239, p. 271-80, 2006.

IDE, A.G.; BAKER, N.H.; WARREN, S.L. Vascularization of the Brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *American Journal of Roentgenology*, v. 42, p. 891-899, 1939.

IMESCH, P. D.; BINDLEY, C. D.; WALLOW, I. H. L. Clinicopathologic correlation of intraretinal microvascular abnormalities. *Retina*, v. 17, p. 321-329, 1997.

ISHIBASHI, T.; INOMATA, H. Ultrastructure of retinal vessels in diabetic patients. *British Journal of Ophthalmology*, v. 77, p. 574-578, 1993.

JAIN, R. *et al.* Controlled drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 24, p. 703-727, 1998.

JARVINEN, K. *et al.* Ocular absorption following topical delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.16, p.3-19, 1995.

JEONG, H.J. *et al.* Rosmarinic acid, active component of Dansam-Eum attenuates ototoxicity of cochlear hair cells through blockage of caspase-1 activity. *PLoS one*, v. 6, n. 4, e18815, 2011.

KIM, J. H. *et al.* Rosmarinic acid suppresses retinal neovascularization via cell cycle arrest with increase of p21(WAF1) expression. *European journal of pharmacology*, v. 615, p. 150-4, 2009.

KIMURA, H.; OGURA, Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. *Ophthalmology*, v. 215, n. 3, p. 143-155, 2001.

KNOLL, A. *et al.* A comparison of two controlled-release delivery systems for the delivery of amiloride to control angiogenesis. *Microvascular research*, v. 58, p. 1-9, 1999.

KOLLIAS, A. N.; ULBIG, M. W. Diabetic retinopathy: Early diagnosis and effective treatment. *Deutsches Ärzteblatt international*, v. 107, n. 5, p. 75-83, 2010.

KONISHI, Y.; KOBAYASHI, S. Transepithelial transport of rosmarinic acid in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 69, n. 3, p. 583-91, 2005.

KUNOU, N. *et al.* Long-term sustained release of ganciclovir from biodegradable scleral implant for the treatment of cytomegalovirus retinitis. *Journal of Controlled Release*, v. 68, p. 263-71, 2000.

LEE, J. *et al.* Rosmarinic acid as a downstream inhibitor of IKK-beta in TNF-alpha-induced upregulation of CCL11 and CCR3. *British journal of pharmacology*, v. 148, p. 366-75, 2006.

LEE, S. S. *et al.* Biodegradable implants for sustained drug release in the eye. *Pharmaceutical research*, v. 27, p. 2043-53, 2010.

LEESE, G.P. Difficult therapeutic decisions in the management of diabetic retinopathy. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*, v. 16, p. 133-137, 2000.

LIN, Y.L. *et al.* Anti-lipid-peroxidative principles from *Tournefortia sarmentosa*. *Journal of Natural Products*, v. 65, p. 745-747, 2002.

LIU, G.T. *et al.* Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. *Biochemical Pharmacology*, v. 43, p. 147-152, 1992.

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

LONG, L. H. *et al.* Instability of, and generation of hydrogen peroxide by, phenolic compounds in cell culture media. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 501, p. 162-9, 2010.

MACULAR PHOTOCOAGULATION STUDY GROUP. Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Five-year results from randomized clinical trials. *Archives of Ophthalmology*, v. 109, p.1109-1114, 1991.

MAKINO, T. *et al.* Effect of oral treatment of *Perilla frutescens* and its constituents on type-I allergy in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 24, p. 1206-1209, 2001.

MAZUMBER, A. *et al.* Curcumin analogs with altered potencies against HIV-1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 40, p. 3057-3063, 1997.

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

MITRA, A. K. Fundamentals of ocular drug delivery, 2010

MIYAMOTO, K. *et al.* Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. 96, p. 10836-10841, 1999.

NORRBY, K. In vivo models of angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 10, n. 3, p. 588-612, 2006.

NOWAK-SLIWINSKA, P. *et al.* Processing of fluorescence angiograms for the quantification of vascular effects induced by anti-angiogenic agents in the CAM model. *Microvascular research*, v. 79, p. 21-8, 2010.

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

OLIVEIRA, K. B. *Determinação do ácido rosmarínico em Salvia officinalis L ., Lamiaceae, e avaliação de sua toxicidade e influência na melanogênese.* Universidade Federal do Paraná, 2010.

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

OSAKABE, N. *et al.* Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: Anti-carcinogenic effects of Perilla frutescens extract in the murine two-stage skin mode. *Carcinogenesis*, v. 25, p. 549–557, 2004.

PANDYA, N.M.; DHALLA, N.S.; SANTANI, D.D. Angiogenesis – a new target for future therapy. *Vascular Pharmacology*, v. 44, p. 265-274, 2006.

PARK, J.H. *et al.* Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. *Molecules*, v.10, p.146-161, 2005.

PETERSON, M.; SIMMONDS, M.S.J. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, v. 62, p. 121–125, 2003.

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

PRASAD, P. S. *et al.* Age-related macular degeneration: current and novel therapies. *Maturitas*, v. 66, p. 46-50, 2010.

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

RAZZAQUE, A.; ELLIS, B.E. Rosmarinic acid production in Coleus cell cultures. *Planta*, v. 137, p. 287–291, 1997.

REN, P. *et al.* Rosmarinic acid inhibits 6-OHDA-induced neurotoxicity by anti-oxidation in MES23.5 cells. *Journal of molecular neuroscience*, v. 39, p. 220-5, 2009.

RIBATTI, D. *et al.* Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *The Anatomical record*, v. 264, p. 317-24, 2001.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of tumor angiogenesis. *Romanian journal of morphology and embryology*, v. 49, n. 2, p. 131-5, 2008.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of angiogenesis and metastasis (p. 130), 2010.

ROGERO, S. O. *et al.* Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

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*, v. 36, p. 331-335, 2005.

ROSENFELD, P.J. *et al.* Ranibizumabe for neovascular age-related macular degeneration. *New England Journal of Medicine*, v. 355, n. 14, p. 1419-1431, 2006.

SALIBA, J. B. *Avaliação biológica de implantes biodegradáveis contendo ciclosporina (A) de administração intravítrea*. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

SALIBA, J. B. *et al.* Development and characterization of an intraocular biodegradable polymer system containing cyclosporine-A for the treatment of posterior uveitis. *Materials Research*, v. 11, n. 2, p. 207-211, 2008.

SANBONGI, C. *et al.* Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 34, p. 971–977, 2004.

SCARPATI, M.L.; ORIENTE, G. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.). *Ricerca Science*, v. 28, p. 2329–2333, 1958.

SCHECKEL, K. A. *et al.* Rosmarinic Acid Antagonizes Activator Protein-1 – Dependent Activation of Cyclooxygenase-2 Expression in Human Cancer and Nonmalignant cell lines. *The Journal of Nutrition and Disease*, v. 138, p. 2098-2105, 2008.

SCHOUTEN, J.S.A.; LA HEIJ, E.C.; WEBERS, C.A.B.; LUNDQVIST, I.J.; HENDRIKSE, F. A systematic review on the effect of bevacizumab in exudative age-related macular degeneration. *Graefe's Archive of Clinical and Experimental Ophthalmology*, v. 247(1), p. 1-11, 2009.

SEIDLITZ, E. *et al.* Quantification of anti-angiogenesis using the capillaries of the chick chorioallantoic membrane demonstrates that the effect of human angiostatin is age-dependent. *Microvascular research*, v. 67, p. 105-16, 2004.

SENGER, D.R.; PERRUZZI, C.A.; FEDER, F.; DVORAK, H.F. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Research*, v. 46, p. 5629-5632, 1986.

SHIMA, D.T.; ADAMIS, A.P.; FERRARA, N.; YEO, T.K.; ALLENDE, R. Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Molecular Medicine*, v. 1(2), p. 182-193, 1995.

SILVA, G. R. *et al.* Implants as drug delivery devices for the treatment of eye diseases. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 46, n. 3, p. 585-595, 2010.

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

SNELL R. S.; LEMP, M. A. The eyeball. *Clinical Anatomy of The Eye*, p 132-213, 1998.

STATON, C. A. *et al.* Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 85, p. 233-248, 2004.

STEHFEST, K. *et al.* Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool to determine rosmarinic acid in situ. *Journal of plant physiology*, v. 161, p. 151-6, 2004.

SWARUP, V.; GHOSH, J.; GHOSH, S.; SAXENA, A.; BASU, A. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. 3367–3370, 2007.

TONINI, T.; ROSSI, F.; CLAUDIO, P.P. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*, v. 22, p. 6549-6565, 2003.

URTTI, A.; SALMINEN, L. Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs. **Survey of Ophthalmology**, v. 37(6), p. 435-456, 1993.

VALDES, T. I. *et al.* The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *Journal of biomedical materials research*, v. 62, p. 273-82, 2002.

VARGAS, A. *et al.* The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, v. 59, p. 1162-76, 2007.

VOSTÁLOVÁ, J. *et al.* Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Archives of Dermatological Research*, v. 302, p. 171-81, 2010.

WANG, H. *et al.* Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry*, v. 87, p. 307-311, 2004.

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

XAVIER, C. P. R. *et al.* Salvia fruticosa, Salvia officinalis, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. *Nutrition and cancer*, v. 61, n. 4, p. 564-71, 2009.

YANG, J. *et al.* Antibody conjugated magnetic PLGA nanoparticles for diagnosis and treatment of breast cancer. *Journal of Materials Chemistry*, v. 17, p. 2695-2699, 2007.

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

ZHANG, J.J. *et al.* Rosmarinic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatic stellate cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*, v. 34, n. 3, p. 343-8, 2011.

ZOU, Z.W. *et al.* Antithrombotic and antiplatelet effects of rosmarinic acid, a water-soluble component isolated from radix Salviae miltiorrhizae (danshen). *Acta Pharmaceutica Sinica*, v. 28, p. 241-245, 1993.

ZHOU, T. *et al.* Development of a multiple-drug delivery implant for intraocular management of proliferative vitreoretinopathy. *Journal of Controlled Release*, v. 5, n. 2, p. 281-295, 1998.