



Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Engenharia Biomédica

Preparação e caracterização de microsféricas para libertação controlada de fármacos em Oftalmologia

Rosemeyre Amaral Cordeiro

Coimbra, Julho de 2007



Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Engenharia Biomédica

Preparação e caracterização de microsfersas para libertação controlada de fármacos em Oftalmologia

Relatório da cadeira de projecto

Realizado por:

Rosemeyre Amaral Cordeiro

Sob orientação de:

Prof. Doutora Maria Helena Gil

Professora Catedrática

Universidade de Coimbra

Certeza

De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...

Fernando Sabino

Agradecimentos

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição que permitiu atingir os meus objectivos e para que este trabalho fosse realizado. A todos eles deixo aqui o meu sincero agradecimento.

Em primeiro lugar agradeço à Prof. Doutora Helena Gil a forma como orientou o meu trabalho. As notas dominantes da sua orientação foram a utilidade das suas recomendações e a cordialidade com que sempre me recebeu. Estou grata por ambas e também pela liberdade de acção que me permitiu que este trabalho contribuísse para o meu desenvolvimento pessoal e intelectual. Em segundo lugar, agradeço à Mestre Elisa Campos, pela orientação, pelo constante apoio, incentivo amigo, disponibilidade e atenção.

Gostaria também de fazer um agradecimento muito especial à Prof. Doutora Ana Cristina Santos, Investigadora do *Instituto de Biofísica/Biomatemática do Instituto de Investigação Biomédica em Luz e Imagem (IBILI)*, pela realização dos ensaios de citotoxicidade *in vitro*, todos os esclarecimentos e, acima de tudo, a sua imensa disponibilidade. Agradeço também às suas estagiárias, Ana Rita, Sónia e Cláudia pela dedicação e disponibilidade durante a realização dos mesmos. Deixo também uma palavra de apreço ao Dr. Alexandre Pires, responsável pelo Biotério do Centro de Neurociências de Coimbra (CNC), pela cedência dos ratos utilizados no estudo da citotoxicidade e também um agradecimento muito especial ao Prof. Doutor Emanuel Ponciano, investigador do *Instituto de Biofísica/Biomatemática* do IBILI - FMUC, não só pelo tratamento estatístico dos resultados finais como também pela amabilidade com que me recebeu e tirou todas as dúvidas.

Gostaria ainda de agradecer ao *Laboratório de Ensaaios, Desgastes e Materiais (LED&MAT)*, pela disponibilidade na realização dos ensaios de granulometria, microscopia óptica e microscopia electrónica de varrimento.

Deixo também uma palavra de agradecimento a todo o Grupo de Polímeros pela forma com que me acolheram e também todos os meus amigos, em especial à Áurea, minha colega de projecto, com quem partilhei as vivências de um ano de trabalho.

Finalmente, gostaria de deixar um agradecimento muito especial aos meus pais e irmãs pelo apoio incondicional.

Resumo

O objectivo deste estudo prende-se com o desenvolvimento de micropartículas de poliuretana de base de policaprolactona como novo sistema polimérico para libertação controlada de fármacos, em Oftalmologia.

As micropartículas foram preparadas através da polimerização por condensação através da técnica de emulsão, usando poli(caprolactona) diol (PCL) com um isocianato (1,6 – hexanometileno di-isocianato (HMDI), 2,4-tolueno di-isocianato (TDI) ou poli(óxido de propileno) com três grupos isocianatos terminais (TI)). Nesta primeira parte apenas foi testada a composição química (natureza do isocianato, proporção mássica isocianato/PCL e razão volúmica entre as fases orgânica e aquosa) e a influência da presença ou ausência de surfactante (Tween[®]80). Através da microscopia óptica (MO) e microscopia electrónica de varrimento (SEM) confirmou-se a formação de micropartículas esféricas e avaliou-se também o diâmetro médio destas através da difracção *laser*. A formação de grupos uretana foi confirmada através da espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (ATR-FTIR). A partir destes resultados escolheram-se as melhores formulações para dois dos três isocianatos utilizados, correspondendo ao TDI e ao TI. A partir daqui procedeu-se à optimização das condições necessárias para aplicações oftalmológicas tópicas, variando-se a natureza e a velocidade da agitação. Para melhor caracterizar estas micropartículas efectuou-se também a análise das propriedades adesivas (potencial Zeta) e análise térmica (análise termogravimétrica - TGA) e termico-dinâmica (análise dinâmica termomecânica - DMTA)), além da análise morfológica (MO e SEM), análise granulométrica (difracção *laser*) e análise química (FTIR). Destes resultados escolheram-se as melhores formulações, que para ambos os casos corresponderam à preparação das micropartículas com uma proporção mássica isocianato/PCL de 80/20, razão volumétrica fase orgânica/fase aquosa de 1:100 e com agitação mecânica a 1400 rpm.

Finalmente, para estas melhores formulações, realizaram-se os testes de libertação de fármaco (*Flurbiprofeno* (FLU)), degradação *in vitro* em solução PBS e estudo de citotoxicidade *in vitro* para macrófagos peritoneais de rato através do teste colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio).

Índice

Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VI
Índice.....	VII
Lista de Tabelas.....	X
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Siglas.....	XIV
1. Introdução.....	1
1.1 Glaucoma.....	1
1.1.1) Tratamento.....	2
1.1.2) Doseamento de fármacos.....	3
1.2 Microsfemas de poliuretana de base de policaprolactona para aplicação tópica em oftalmologia.....	3
1.2.1 Microsfemas.....	3
1.2.1.1 Microsfemas para aplicação tópica em Oftalmologia.....	3
1.2.2 Poliuretanas.....	3
1.2.3 Polimerização por emulsão.....	4
1.2.4 Polimerização por condensação.....	4
1.2.5 Policaprolactona.....	5
1.3 Caracterização de sistemas biomédicos.....	5
1.3.1 A norma ISO 10993.....	5
1.3.2 Caracterização das microsferas.....	5
1.3.2.1 Microscopia óptica e microscopia electrónica.....	6
1.3.2.2 Difracción <i>laser</i>	7
1.3.2.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com reflexão total atenuada (FTIR-ATR).....	7
1.3.2.4 Análise termogravimétrica e análise dinâmica termomecânica.....	8
1.3.2.4.1 Temperatura de transição vítrea (Tg).....	8
1.3.2.4.2 Análise termogravimétrica.....	9
1.3.2.4.3 Análise dinâmica termomecânica (DMTA).....	9
1.3.2.5 Potencial Zeta.....	11
1.3.2.6 Estudo da libertação controlada de fármaco.....	12
1.3.2.6.1 Cinética de libertação de fármaco.....	12
1.3.2.6.2 O <i>Flurbiprofeno</i>	13
1.3.2.6.1.1 Posologia.....	13
1.3.2.7 Estudo da degradação <i>in vitro</i>	13
1.3.2.8 Teste do MTT.....	14
1.3.2.8.1 Macrófagos.....	14
1.3.2.8.2 MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio.....	14
2. Protocolo experimental.....	15
2.1 Reagentes e equipamento/material.....	15
2.1.1 Reagentes e equipamento/material utilizados na preparação dos sistemas poliméricos.....	15

2.1.2	Reagentes e equipamento/material utilizados nos ensaios de caracterização das microsferas	16
2.2	Preparação dos sistemas poliméricos	18
2.2.1	Preparação de micropartículas	18
2.2.1.1	Preparação da fase aquosa (f.a.)	18
2.2.1.2	Preparação da fase orgânica (f.o.)	18
2.2.1.3	Preparação de micropartículas	18
2.2.1.4	Lavagem, secagem e armazenamento de micropartículas	19
2.3	Ensaio de caracterização das microsferas	21
2.3.1	Morfologia	21
2.3.1.1	Microscopia óptica	21
2.3.1.2	Microscopia electrónica de varrimento	21
2.3.1.3	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com reflexão total atenuada (FTIR-ATR)	21
2.3.2	Propriedades térmicas e termomecânicas	21
2.3.2.1	Análise dinâmico termomecânico (DMTA)	21
2.3.2.2	Análise termogravimétrica (TGA)	22
2.3.3	Distribuição dos tamanhos das partículas	22
2.3.4	Potencial Zeta	22
2.3.5	Degradação <i>in vitro</i>	22
2.3.6	Estudo sobre a libertação <i>in vitro</i> do fármaco	23
2.3.6.1	Preparação de micropartículas com fármaco incorporado	23
2.3.6.1.1	Medição da libertação <i>in vitro</i> do fármaco	23
2.3.7	Estudo de citotoxicidade	24
2.3.7.1	Colheita, isolamento e cultura de macrófagos peritoneais de rato	24
2.3.7.1.1	Esterilização do material	24
2.3.7.1.2	Armazenamento dos reagentes	24
2.3.7.1.3	Sacrifício dos animais	24
2.3.7.1.4	Colheita de macrófagos peritoneais	25
2.3.7.1.5	Isolamento de macrófagos	26
2.3.7.1.6	Teste da viabilidade celular	26
2.3.7.1.7	Cultura de macrófagos	27
2.3.7.2	Preparação do ensaio de citotoxicidade	27
2.3.7.2.1	Teste de citotoxicidade	28
2.3.8	Análise estatística do estudo de citotoxicidade	29
2.3.8.1	Material e métodos	29
2.3.8.2	Modelo experimental	31
3.	Resultados	32
3.1	Análise morfológica	32
3.1.1	MO	32
3.1.2	SEM	34
3.2	Análise granulométrica por difracção <i>laser</i>	36
3.3	Análise química por FTIR-ATR	39
3.4	Análise das propriedades térmicas através do DMTA e TGA	41
3.5	Análise das propriedades adesivas através do Potencial Zeta	42
3.6	Análise da degradação <i>in vitro</i>	44
3.7	Análise da libertação do fármaco <i>in vitro</i> por espectrofotometria UV/Vis	46
3.8	Análise de citotoxicidade através do teste do MTT	47
3.8.1	Dados da contagem de macrófagos	47
3.8.2	Resultados do teste do MTT	48

3.8.3	Resultado da análise estatística do estudo de citotoxicidade	49
4.	Discussão e conclusões	54
5.	Perspectivas de trabalho futuro.....	60
6.	Referências bibliográficas	61
7.	Anexos	64
A.	MO.....	64
B.	Testes de citotoxicidade	66

Lista de Tabelas

Tabela 1 - As principais diferenças entre o microscópio óptico e o microscópio electrónico.	6
Tabela 2 - Reagentes utilizados na preparação das microsferas.	15
Tabela 3 - Equipamento e material utilizado na preparação de microsferas.	15
Tabela 4 - Reagentes utilizados durante os ensaios de caracterização das microsferas.	16
Tabela 5 – Lista de equipamento/material utilizado durante os ensaios de caracterização das microsferas.	16
Tabela 6 - Variáveis dos ensaios realizados com o HMDI.	19
Tabela 7 - Variáveis na preparação de micropartículas.	20
Tabela 8 - Massa medida de microsferas para o teste de degradação.	23
Tabela 9 - Adição de meio de cultura nos diferentes frascos contendo macrófagos peritoneais de rato.	26
Tabela 10 - Localização da adição de meio de cultura e de microsferas na placa de cultura.	28
Tabela 11 - Dados recolhidos no estudo granulométrico.	37
Tabela 12 – Temperatura de transição vítrea das micropartículas.	41
Tabela 13 – Valores do potencial Zeta das micropartículas em diferentes meios de suspensão.	43
Tabela 14 – Valores da percentagem de massa perdida nas microsferas TDI-PCL durante 28 dias.	44
Tabela 15 – Valores da percentagem de massa perdida nas microsferas TI-PCL durante 28 dias.	45
Tabela 16 - Taxa de libertação de fármaco durante 8 horas.	46
Tabela 17 - Contagem de macrófagos para cada rato.	47
Tabela 18 – Taxa de sobrevivência celular durante os 7 dias de estudo na presença de diferentes quantidades de microsferas com TDI na sua formulação.	48
Tabela 19 – Percentagem de sobrevivência celular durante os 7 dias de estudo na presença de diferentes quantidades de suspensão de microsferas com TI na sua formulação.	48
Tabela 20 – Resultado da análise de variância para o modelo de 3 factores como medidas repetidas num factor. A vermelho encontram-se os valores estatisticamente significativos.	50
Tabela 21 - Valores do tratamento a posteriori para a concentração. A vermelho encontram-se os valores estatisticamente significativos.	51
Tabela 22 – Valores do tratamento a posteriori para o tempo. A vermelho encontram-se os valores estatisticamente significativos.	52

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema representativo dos componentes do olho (adaptado de http://curlygirl.naturlink.pt/olho.jpg).	1
Figura 2 - Degradação do nervo óptico ao longo da progressão do glaucoma: estado normal (A), primeiros sinais de danos (B) e danos severos (C) (adaptado de Illustration Copyright 2003 Tim Peters and Company, Inc. Peapack NJ 07977 USA).	1
Figura 3- Aplicação de colírios (adaptado de http://www.evecare.com.br/img/medicamentos.gif).	2
Figura 4 - Representação do grupo uretana.	4
Figura 5 - Reacção entre um isocianato e um álcool formando um grupo uretana.	4
Figura 6 - Bandas de absorção de infravermelho para polímeros (adaptado de Sandler et al., 1998).	8
Figura 7 - Resposta de um material viscoelástico a uma tensão (adaptado de http://www.sealseastern.com/PDF/DynamicMechThermalAnal.pdf).	10
Figura 8 – Estrutura química do Flurbiprofeno (adaptado de http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/image.cfm?id=713&type=img&name=Flurbiprofen-Tablets-chemicalstructure.jpg).	13
Figura 9 - Representação esquemática da colheita dos macrófagos peritoneais: (A) enchimento da seringa com PBS, (B) injeção do PBS e (C) recolha de macrófagos.	25
Figura 10 - Representação esquemática do teste de viabilidade celular: (A) adição de Trypan Blue à aliquota de macrófagos, (B) colocação na câmara de Neubauer e (C) contagem dos macrófagos ao microscópio óptico de contraste de fase.	26
Figura 11 - Esquema da localização dos poços com macrófagos na placa de cultura.	27
Figura 12 - Esquema representativo da disposição das experiências. Cada linha com poços coloridos corresponde a um tipo de microsfera. Os dois primeiros poços correspondem ao controlo, sendo os restantes ocupados pelas diferentes concentrações de microsferas. Cada dia de ensaio tem uma caixa de cultura.	28
Figura 13 - Aparelho de microELISA com placa de cultura para leitura das absorvâncias após realização do teste do MTT.	29
Figura 14 – Visualização por microscopia óptica das micropartículas de HMDI-PCL com diferentes razões mássicas isocianato/PCL, na presença ou ausência de surfactante (Tween®80): (A) 80/20 sem Tween®80 (ampliação 5×), (B) 80/20 com Tween®80 (ampliação 5×), (C) 50/50 com Tween®80 (ampliação 5×) e (D) 20/80 com Tween®80 (ampliação 20×).	32
Figura 15 – Visualização por microscopia óptica das micropartículas de TDI-PCL com diferentes razões mássicas isocianato/PCL, na presença ou ausência de surfactante (Tween®80): (A) 80/20 sem Tween®80 (ampliação 5×), (B) 80/20 com Tween®80 (ampliação 5×), (C) 50/50 com Tween®80 (ampliação 20×) e (D) 20/80 com Tween®80 (ampliação 5×).	33
Figura 16 – Visualização por microscopia óptica das micropartículas de TI-PCL com diferentes razões mássicas isocianato/PCL, na presença ou ausência de surfactante (Tween®80) (ampliação 5×): (A) 80/20 sem Tween®80, (B) TI 80/20 com Tween®80, (C) 50/50 com Tween®80 e (D) 20/80 com Tween®80. ...	33

Figura 17 - Visualização por microscopia electrónica de varrimento das micropartículas de HMDI com diferentes razões mássicas isocianato/PCL, na presença ou ausência de surfactante (Tween®80): (A) 80/20 sem Tween®80 (ampliação 500×), (B) 80/20 com Tween®80 (ampliação 200×) e (C) 20/80 com Tween®80 (ampliação 1000×).	34
Figura 18 - Visualização por microscopia electrónica de varrimento das micropartículas de TDI-PCL com diferentes razões mássicas isocianato/PCL, na presença ou ausência de surfactante (Tween®80): (A) 80/20 sem Tween®80 (ampliação 200×), (B) 80/20 com Tween®80 (ampliação 500×) e (C) 50/50 com Tween®80 (ampliação 500×).	35
Figura 19 - Visualização por microscopia electrónica de varrimento das micropartículas de TI-PCL com diferentes razões mássicas isocianato/PCL, na presença ou ausência de surfactante (Tween®80): (A) 80/20 sem Tween®80 (ampliação 100×), (B) 80/20 com Tween®80 (ampliação 100×) e (C) 50/50 sem Tween®80 (ampliação 200×).	35
Figura 20 - Diâmetro médio das microsferas obtido nas diferentes formulações.	38
Figura 21 – Espectro FTIR-ATR de TDI, PCL e micropartículas de TDI-PCL preparadas com diferentes razões mássicas icocianato/PCL (os números dos ensaios encontram-se indicados entre parêntesis).	39
Figura 22 - Espectro FTIR-ATR de TI, PCL e micropartículas de TI-PCL preparadas com diferentes razões mássicas isocianato/PCL (os números dos ensaios encontram-se indicados entre parêntesis).	40
Figura 23 - Termograma das microsferas para diferentes formulações (entre parêntesis está indicado o número do ensaio).	41
Figura 24 - Curva termogravimétrica obtida para a PCL e micropartículas de TDI-PCL e TI-PCL com razão mássica isocianato/PCL 80/20.	42
Figura 25 – Valores do potencial Zeta das micropartículas em diferentes suspensões.	43
Figura 26 - Estudo da degradação in vitro em solução PBS das microsferas de TDI-PCL durante 28 dias.	44
Figura 27 - Estudo da degradação in vitro em solução PBS das microsferas de TI-PCL durante 28 dias.	45
Figura 28 - Curva de libertação do fármaco in vitro para as micropartículas de TDI-PCL e TI-PCL (na figura TDI e TI, respectivamente).	46
Figura 29 - Taxa de sobrevivência celular dos macrófagos durante os 7 dias de estudo na presença de diferentes quantidades de microsferas de TDI-PCL.	48
Figura 30 – Percentagens de sobrevivência celular dos macrófagos peritoneais de rato durante os 7 dias de estudo na presença de diferentes quantidades de microsferas de TI-PCL.	49
Figura 31 – Valores médios da absorvância e respectivos limites de confiança para as formulações com TDI (1) e TI (2).	50
Figura 32 – Valores médios da absorvância e respectivos limites de confiança para as concentrações estudadas: controlo (0), 30 µl (1), 5 µl (2) e 0,5 µl (3).	51
Figura 33 - Valores médios da absorvância e respectivos limites de confiança para os tempos estudados (dia 1, dia 3, dia 5 e dia 7).	52
Figura 34 - Valores médios da absorvância e respectivos limites de confiança para a interacção Tempo*Formulação.	53

Figura 35 - Estrutura química de PCL (A) (La Gatta et al., 2005), TDI (B) e TI (C) (Queiroz & Norberta de Pinho, 2005).	55
Figura 36 - Estrutura química das micropartículas de TDI-PCL (A) e TI-PCL (B) (adaptado de Queiroz & Norberta de Pinho, 2005), com o grupos uretana marcados a cheio e o grupo ureia marcado a tracejado.	56
Figura 37 - Visualização microscópica das microsferas de TDI-PCL (A) e TI-PCL (B) (ampliação 10×).	64
Figura 38 - Visualização microscópica das microsferas de TDI-PCL (A) e TI-PCL (B) (ampliação 10×).	64
Figura 39 - Visualização microscópica das microsferas de TDI-PCL (A) e TI-PCL (B) (ampliação 10×).	64
Figura 40 - Visualização microscópica das microsferas de TDI-PCL (A) e TI-PCL (B) (ampliação 10×).	65
Figura 41 - Visualização microscópica dos macrófagos após 1 dia de contacto com as microsferas de TDI-PCL e depois da adição adição de MTT. [Controlo (A), 30 µl (B), 5 µl (C), 0,5 µl (D)].	66
Figura 42 - Visualização microscópica dos macrófagos após 1 dia de contacto com as microsferas de TI-PCL e depois da adição adição de MTT. [Controlo (A), 30 µl (B), 5 µl (C), 0,5 µl (D)].	66
Figura 43 - Visualização microscópica dos macrófagos após 3 dias de contacto com as microsferas de TDI-PCL e depois da adição adição de MTT. [Controlo (A), 30 µl (B), 5 µl (C), 0,5 µl (D)].	67
Figura 44 - Visualização microscópica dos macrófagos após 3 dias de contacto com as microsferas de TI-PCL e depois da adição adição de MTT. [Controlo (A), 30 µl (B), 5 µl (C), 0,5 µl (D)].	67
Figura 45 - Visualização microscópica dos macrófagos após 5 dias de contacto com as microsferas de TDI-PCL e depois da adição adição de MTT. [Controlo (A) e 0,5 µl (B)].	68
Figura 46 - Visualização microscópica dos macrófagos após 5 dias de contacto com as microsferas de TI-PCL e depois da adição adição de MTT. [Controlo (A), 5 µl 0,5 µl (B)].	68
Figura 47 - Visualização microscópica dos macrófagos após 1 dia de contacto com as microsferas de TI-PCL e depois da adição adição de MTT. [Controlo (A), 30 µl (B), 5 µl (C), 0,5 µl (D)].	69
Figura 48 - Visualização microscópica dos macrófagos após 1 dia de contacto com as microsferas de TI-PCL e depois da adição adição de MTT. [Controlo (A), 30 µl (B e, 5 µl (C)].	69

Lista de Siglas

Sigla	Significado
DMTA	Análise dinâmica termomecânica
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier
FTIR-ATR	Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada
HMDI	1,6 – hexametileno di-isocianato
MO	Microscopia óptica composta
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio
PCL	Policaprolactona diol
SEM	Microscopia electrónica de varrimento
TDI	2,4 – tolueno di-isocianato
TDI-PCL	Microsféras formuladas com TDI e PCL
Tg	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
TI	Poli(óxido de propileno) com três grupos isocianato terminais
TI-PCL	Microsféras formuladas com TI e PCL

1. Introdução

1.1 Glaucoma

O glaucoma é uma doença causada pela deficiente drenagem do humor aquoso (fluido ocular transparente produzido pelo corpo ciliar e localizado entre a córnea e o cristalino) (Figura 1), levando a um aumento da pressão intraocular e, conseqüentemente, comprometendo o nervo óptico (Guyton & Hall, 2002:575-577).

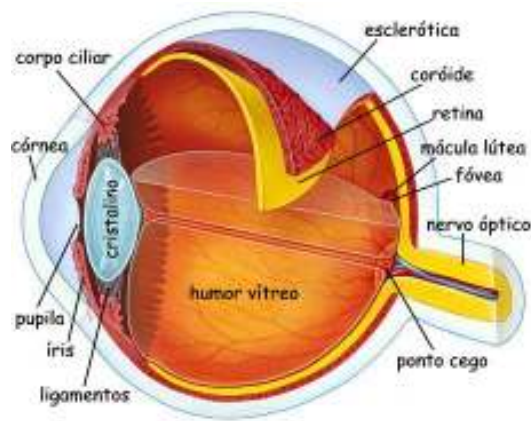


Figura 1 - Esquema representativo dos componentes do olho (adaptado de <http://curlygirl.naturlink.pt/olho.jpg>).

As células do nervo óptico têm a função de transformar a luz visível em impulsos eléctricos que podem ser ‘compreendidos’ pelo cérebro. Se estas células morrem, alguma visão pode ser perdida, induzindo assim alterações no campo visual. Se os danos são muitos pode ocorrer a total perda de visão (Figura 2).

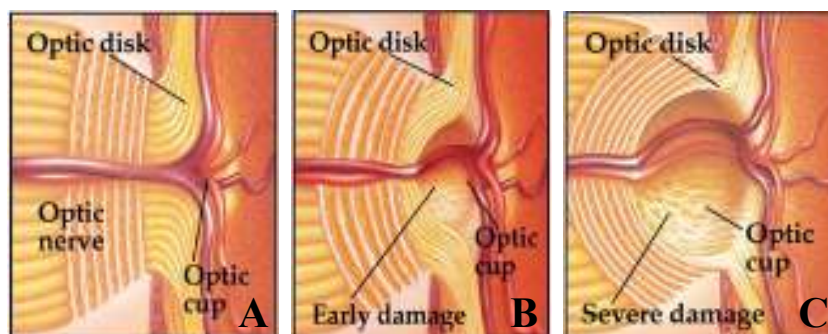


Figura 2 - Degradação do nervo óptico ao longo da progressão do glaucoma: estado normal (A), primeiros sinais de danos (B) e danos severos (C) (adaptado de Illustration Copyright 2003 Tim Peters and Company, Inc. Peapack NJ 07977 USA).

O glaucoma é uma das principais causas de cegueira, sobretudo nas pessoas mais idosas. No entanto, quando detectada e tratada precocemente, a perda de visão pode ser evitada.

A maioria dos tipos de glaucoma é crónica e estão presentes em pessoas de certa idade. No entanto, existem alguns tipos que ocorrem cedo, mas a maioria desenvolve-se muito lentamente, durante meses ou anos.

Estão em risco de desenvolver a doença pessoas com:

- idade superior a 35 anos;
- miopia;
- história familiar de glaucoma (hereditariedade);
- lesões oculares prévias;
- medicação à base de esteróides.

1.1.1) Tratamento

O tratamento é instituído de modo a diminuir a pressão intraocular para um nível que não provoque danos no nervo óptico, a maior parte das vezes através de colírios, aplicados várias vezes ao dia (Figura 3), podendo estar associados a outros medicamentos. Nas situações mais graves é utilizado o *laser* ou bisturi de modo a alterar certas estruturas no olho (<http://www.eyecare.com.br/Glaucoma.aspx> e <http://www.wills-glaucoma.org>).

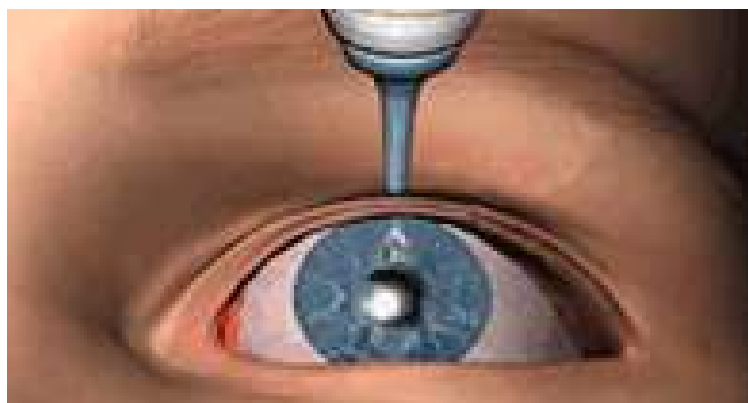


Figura 3- Aplicação de colírios (adaptado de <http://www.eyecare.com.br/img/medicamentos.gif>).

1.1.2) Doseamento de fármacos

A maioria dos medicamentos para utilização tópica ocular, usados no tratamento do glaucoma, necessita de várias aplicações por dia para manter a concentração do princípio activo no nível terapêutico recomendado (Ludwig, 2005). No entanto, tem a vantagem de se aplicar directa e comodamente no órgão-alvo, evitando-se deste modo o metabolismo hepático. Assim, o desenvolvimento de um sistema de libertação controlada de fármaco para aplicação tópica permitiria não só reduzir o número de aplicações diárias mas também manter, sem grandes oscilações, o nível terapêutico adequado. Este sistema aumentaria a eficácia do medicamento e a qualidade de vida do paciente.

1.2 Microsferas de poliuretana de base de policaprolactona para aplicação tópica em oftalmologia

1.2.1 Microsferas

As microsferas são partículas sólidas com um diâmetro entre 1 e 100 μm . Estes sistemas apresentam pequeno volume e tamanho mas grande área de superfície. Geralmente o fármaco encontra-se disperso na matriz polimérica ou ligado covalentemente à cadeia do polímero (Swarbrick & Boylan, 1997 e Kawaguchi, 2000).

1.2.1.1 Microsferas para aplicação tópica em Oftalmologia

As microsferas para aplicação tópica em Oftalmologia precisam de ser biocompatíveis, bioadesivas (para não serem facilmente removidas pelos fluidos lacrimais), biodegradáveis, esterilizáveis e terem um diâmetro entre 5 a 10 μm . Em relação ao tamanho, o limite inferior está relacionado com a fácil remoção pelos fluidos lacrimais e o limite superior com a sensação de corpo estranho no olho (Zimmer & Kreuter, 1995).

1.2.2 Poliuretanas

As poliuretanas são caracterizadas quimicamente pela presença de ligação uretana (Figura 4), a qual aparece repetida várias vezes, mas não necessariamente de uma forma regular.

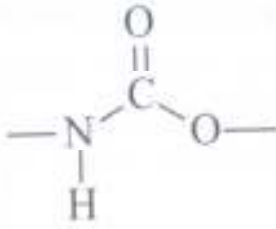


Figura 4 - Representação do grupo uretana.

A reacção para formação de um grupo uretana necessita de dois reagentes, um isocianato e um composto com uma função álcool (Figura 5).

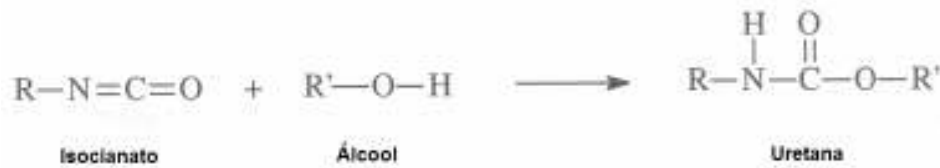


Figura 5 - Reacção entre um isocianato e um álcool formando um grupo uretana.

Os isocianatos podem, no entanto, reagir com outros compostos que contenham hidrogénios móveis, como por exemplo a água.

O processo mais utilizado na produção das poliuretanas é o que envolve a reacção de um composto, com dois ou mais grupos funcionais álcool, tal como, um poliálcool poliéter ou poliálcool poliéster, com um isocianato di ou polifuncional.

As poliuretanas têm elevada aplicação no campo biomédico devido às excelentes propriedades mecânicas, resistência à biodegradação, boa compatibilidade celular e sanguínea (Melo *et al.*, 2004:35-55; Melnig, Apostu, Tura & Ciobanu, 2005; Stevens, 1999:70-73).

1.2.3 Polimerização por emulsão

A polimerização por emulsão é uma técnica simples e reprodutível. Além disso, permite controlar algumas das características principais das micropartículas, nomeadamente o tamanho e a sua distribuição, ajustando diversos parâmetros de manufactura, como a velocidade e natureza da agitação, concentração de polímero, uso de surfactante e temperatura de estabilização (Patil, 2003).

1.2.4 Polimerização por condensação

A polimerização por condensação é a reacção em que polímeros são formados com a libertação de moléculas pequenas, geralmente a água (Chang, 1994:1096).

1.2.5 Policaprolactona

A policaprolactona é um poliéster biodegradável, semi-cristalino e alifático. A biodegradabilidade do polímero é devida à susceptibilidade da ligação alifática éster à hidrólise, sendo os produtos gerados metabolizados pela via do ciclo do ácido tricarbóxico ou eliminados directamente por excreção renal (Kweon, Cha, Park & Lim, 2000).

1.3 Caracterização de sistemas biomédicos

1.3.1 A norma ISO 10993

A norma ISO 10993 foi desenvolvida pela Organização Internacional para a Padronização (ISO – *International Organization Standardization*) e rege a avaliação biológica de dispositivos médicos. Apenas é aplicada a dispositivos que estejam em contacto directo ou indirecto com o corpo ou com fluidos corpóreos. O primeiro passo da avaliação, de acordo com a Parte 1 da norma (ISO 10993-1:2003), é caracterizar o material a testar (Kemp, n. d.).

1.3.2 Caracterização das microsferas

De seguida, apresenta-se uma descrição muito sumária dos métodos de caracterização utilizados, e seus princípios de funcionamento, nos estudos efectuados para a caracterização das microsferas obtidas:

- **análise morfológica:**
 - microscopia óptica (MO)
 - microscopia electrónica de varrimento (SEM)
- **análise granulométrica:**
 - difracção *laser*
- **análise química:**
 - espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com reflexão total atenuada (FTIR-ATR)
- **análise térmica e termomecânica:**
 - análise termogravimétrica (TGA)

- análise dinâmica termomecânica (DMTA)
- **análise das propriedades adesivas:**
 - potencial Zeta
- **análise da libertação do fármaco [*Flurbiprofen* (FLU)] *in vitro*:**
 - em solução PBS (*phosphate buffer saline*)
- **análise da degradação *in vitro*:**
 - em solução PBS (*phosphate buffer saline*)
- **análise da libertação *in vitro* do fármaco [*Flurbiprofeno* (FLU)]:**
 - em solução PBS (*phosphate buffer saline*)
- **análise da citotoxicidade:**
 - teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio)

1.3.2.1 Microscopia óptica e microscopia electrónica

Estes métodos fornecem imagens ampliadas dos objectos, permitindo a observação de estruturas invisíveis à vista desarmada. O microscópio electrónico de varrimento, além da informação morfológica, dá também informação topográfica. As principais diferenças entre os microscópios estão registadas na Tabela 1 (http://pt.wikipedia.org/wiki/Microscopia_electr%C3%B3nica; <http://oficina.cienciaviva.pt/~piv172/PDFs/Acetatos%20n%BA20-21.pdf>).

Tabela 1 - As principais diferenças entre o microscópio óptico e o microscópio electrónico

	MO	SEM
Tipo de radiação	Luz (fotões)	Feixe de electrões
Meio de propagação	Atmosfera	Vácuo (< 10 ⁻⁴ Pa)
Lentes	Vidro ou quartzo	Electromagnéticas
Ampliação	1500×	9000×
Observação	Directa da imagem luminosa	Conversão de electrões em fotões e análise em monitor de televisão
Imagem	Geralmente colorida	Preto e branco
Material a observar	Vivo e não-vivo	Não-vivo

1.3.2.2 Difrakção *laser*

A difracção *laser* é actualmente o processo mais eficaz para determinar a distribuição granulométrica numa ampla gama de dimensões, desde poucos nanómetros a alguns milímetros. As vantagens desta tecnologia são a rapidez dos tempos de medida, a automatização do processo (calibração, medição e limpeza) e a grande precisão e reprodutibilidade dos resultados (http://www.fritsch.de/data/prospekte/porto_uebersicht.pdf).

1.3.2.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com reflexão total atenuada (FTIR-ATR)

A espectroscopia de infravermelhos é um dos métodos mais utilizados na investigação da estrutura de polímeros e na análise de grupos funcionais devido à sua simplicidade e rapidez. A radiação infravermelha (IV) não possui energia suficiente para excitar os electrões (ao invés do que acontece com a radiação visível ou ultravioleta), levando apenas a que haja um aumento na amplitude de vibração das ligações covalentes. Esta vibração das moléculas pode ocorrer de várias formas, normalmente por alongação ou deformação. Quando a energia é absorvida converte-se nestes tipos de movimentos com uma frequência de vibração que depende das:

- massas dos átomos ligados - os átomos mais leves vibram em frequências mais elevadas do que os mais pesados;
- rigidez relativa da ligação - as ligações triplas são mais firmes do que as duplas e as duplas do que as simples.

Os grupos funcionais das moléculas orgânicas possuem arranjos específicos que determinam a energia infravermelha absorvida. Como o espectro do monómero e do polímero diferem significativamente, é possível utilizar infravermelhos para seguir a polimerização e simultaneamente analisar a estrutura do polímero. O acessório ATR (*attenuated total reflection*) permite a análise de compostos à superfície dos materiais (McMurry, 2000; Sandler *et al.*, 1998).

A informação obtida pode ser agrupada nas chamadas tabelas de correlação, como se encontra esquematizado na Figura 6.

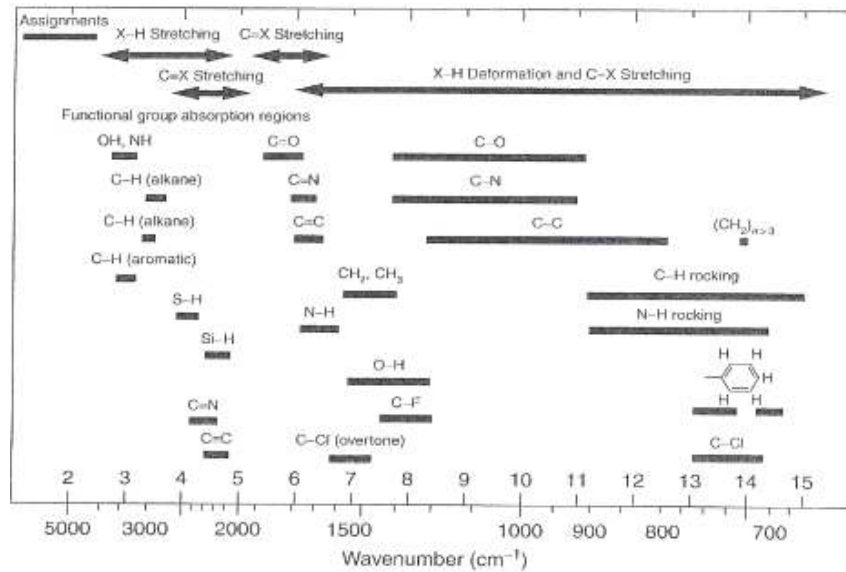


Figura 6 - Bandas de absorção de infravermelho para polímeros (adaptado de Sandler et al., 1998).

1.3.2.4 Análise termogravimétrica e análise dinâmica termomecânica

1.3.2.4.1 Temperatura de transição vítrea (Tg)

A temperatura de transição vítrea, Tg (*temperature transition glass*), é a temperatura à qual o polímero transita do estado vítreo (organizado) para um estado tipo borracha (desorganizado). A esta temperatura muitas propriedades físicas variam significativamente, daí a sua importância. Está relacionada com a natureza das forças intermoleculares, o volume dos grupos laterais, o peso molecular, o grau de reticulação e a natureza das ligações. Assim:

- quanto maiores forem as forças intermoleculares maior será Tg. Deste modo, a presença de ligações por ponte de hidrogénio (interacções dipolo-dipolo) contribui para o aumento desta temperatura;
- quanto maior for o volume dos grupos laterais maior será o espaçamento entre as cadeias, diminuindo Tg. No entanto, se esses grupos forem anéis, a temperatura de transição vítrea aumenta devido à sua estrutura planar;
- quanto maior for o peso molecular de uma cadeia polimérica maior será a sua temperatura de transição vítrea, uma vez que o polímero passa a ter menor mobilidade;
- quanto maior o grau de reticulação maior o valor de Tg devido à diminuição de volume livre e mobilidade;

- a natureza das ligações presentes na molécula do polímero influencia a sua temperatura de transição vítrea, por exemplo, ligações do tipo C-C são muito mais fortes tendo mais dificuldade em rodar do que ligações do tipo Si-O.

Esta transição não ocorre subitamente mas sim numa gama de temperaturas (Fried, 1995:135-137,158-161; Stevens, 1999:378-381; http://keats.admin.virginia.edu/chem222/lecture_notes/chem222_Notes_4.html).

1.3.2.4.2 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) permite determinar essencialmente a estabilidade térmica dos polímeros por medição contínua da perda de massa, através de um aumento controlado da temperatura. Esta perda de massa está associada à estrutura molecular. Qualquer alteração na massa reflecte-se numa mudança de composição, tornando-se, deste modo, específica para um determinado polímero. Os dados são recolhidos e registados num termograma, onde a massa perdida é expressa em função da temperatura.

As causas da perda de massa podem ser devidas à evaporação da mistura residual (a baixas temperaturas) ou à decomposição do polímero (a altas temperaturas).

Apesar de ser uma técnica muito usada, é bastante limitada para determinar a composição e identificar uma amostra cuja natureza se desconhece (Sandler *et al.*, 1998; Stevens, 1999:378-381).

1.3.2.4.3 Análise dinâmica termomecânica (DMTA)

A análise de DMTA fornece informações relativas ao comportamento viscoelástico (comportamento dos materiais plásticos face a solicitações mecânicas) do sistema, desmembrando o módulo da tensão em duas componentes: a elástica e a viscosa. Esta análise é muito utilizada para determinar a temperatura de transição vítrea de polímeros e consiste em submeter o polímero a uma temperatura e uma determinada tensão e verificar o seu comportamento.

A resposta de um sólido elástico perfeito, quando é aplicada uma deformação sinusoidal, ocorre exactamente na fase em que se aplica a deformação. Num material completamente viscoso a resposta tem um atraso de 90°, relativamente à tensão aplicada. Quando se aplica uma deformação sinusoidal a um material viscoelástico, o seu

comportamento nem é o de um material elástico perfeito nem o de um perfeitamente viscoso. A resposta apresenta um atraso relativamente à deformação, quantificado por $\delta < 90$ (Figura 7). A magnitude do atraso é dependente da quantidade de movimentos internos que ocorrem para essa mesma frequência (Sandler et al., 1998).

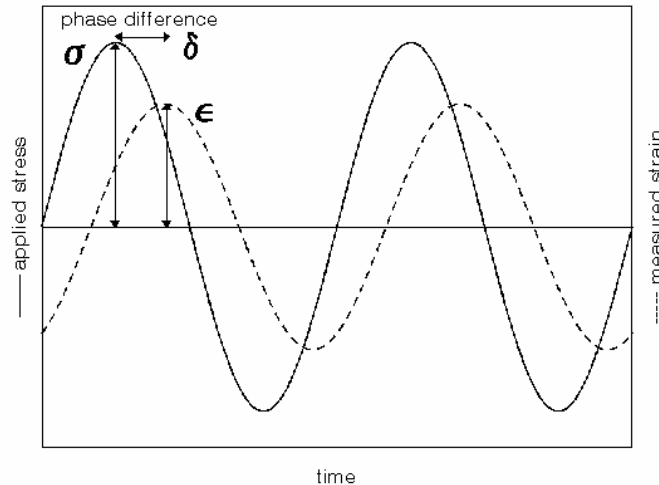


Figura 7 - Resposta de um material viscoelástico a uma tensão (adaptado de <http://www.sealseastern.com/PDF/DynamicMechThermalAnal.pdf>).

Quando se relaciona a deformação aplicada com a resposta a essa deformação surge a expressão (1):

$$\sigma(t) = E_0^*(\omega)\delta(t), \quad (1)$$

onde $E^*(\omega)$ é o módulo dinâmico definido pela expressão (2):

$$E^*(\omega) = E'(\omega) + iE''(\omega), \quad (2)$$

em que $E'(\omega)$ e $E''(\omega)$ representam o módulo de armazenamento e o módulo de perda, respectivamente.

E' caracteriza a tendência para o polímero com comportamento viscoelástico armazenar energia (contribuição elástica) e E'' revela a tendência para o material dissipar energia através dos movimentos internos (contribuição viscosa). Estes módulos podem ser definidos pelas expressões (3) e (4):

$$E' = (\sigma_0 / \gamma_0) \cos \delta \quad (3)$$

e

$$E'' = (\sigma_0 / \gamma_0) \sin \delta, \quad (4)$$

onde δ representa o ângulo de fase, σ a tensão aplicada e γ a resposta do material a essa tensão.

A $\tan \delta$ ou factor de dissipação é um parâmetro adimensional que indica a importância relativa das forças viscosas em relação as forças elásticas e encontra-se representada pela expressão (5):

$$\tan \delta = \frac{\text{Energia perdida}}{\text{Energia armazenada}} = \frac{E''}{E'} \quad (5)$$

A utilização desta técnica permite identificar, de forma fácil e inequívoca, o valor da temperatura de transição vítrea, uma vez que quando um polímero atravessa a zona transição vítrea o módulo de armazenamento diminui, enquanto a $\tan \delta$ atinge um máximo. A diminuição do módulo é visível quando ocorre o movimento da cadeia molecular principal. O máximo de $\tan \delta$ verifica-se no momento em que a frequência vibracional imposta pelo aparelho coincide com a frequência de movimento da cadeia principal (Sandler *et al.*, 1998; Stevens, 1999:378-381; <http://home.utad.pt/~jmcx/pdf/Oliveira2001.pdf>; <http://www.sealseastern.com/PDF/DynamicMechThermalAnal.pdf>).

1.3.2.5 Potencial Zeta

O potencial Zeta é uma importante técnica de caracterização que fornece informação considerável sobre a carga superficial das micropartículas, que por sua vez está relacionada com a estabilidade física destes sistemas (ex. agregação). Avalia o fenómeno electrocinético que resulta do movimento de uma fase sólida, com carga de superfície, relativamente a uma fase líquida, contendo um electrólito. Neste caso, as partículas sólidas (fase móvel) carregadas movem-se através do líquido (fase estacionária) sob a influência de um campo eléctrico, designando-se este fenómeno por electroforese, avaliando-se assim a mobilidade electroforética.

Recentemente tem sido foco de forte pesquisa uma possível correlação entre o potencial Zeta e as propriedades coloidais dos sistemas de libertação de fármaco *in vitro*, o impacto do potencial Zeta na distribuição no órgão e a *clearance in vivo* destes sistemas. A determinação do potencial Zeta tem fornecido explicações fisico-químicas para alguns fenómenos interfaciais envolvendo sistemas biológicos.

Acredita-se que em aplicações biomédicas o potencial Zeta é uma nova área com grandes desafios e com um potencial ilimitado (Swarbrick & Boylan, 1997; Brett & Brett, 1996; Boehm & Fessi, 2000).

1.3.2.6 Estudo da libertação controlada de fármaco

A quantidade de fármaco efectivamente incorporada na matriz polimérica pode ser avaliada através da análise espectrofotométrica UV/Vis, pela extracção do fármaco após imersão das partículas em PBS (*phosphate buffer saline*) com agitação prolongada (Jameela & Jayakrishnan, 1995).

1.3.2.6.1 Cinética de libertação de fármaco

A cinética de libertação de fármaco pode ser avaliada pela equação:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (6)$$

onde, $\frac{M_t}{M_\infty}$ representa a fracção de fármaco libertado no tempo t , k é a constante característica do sistema polímero-fármaco e n é um parâmetro empírico que caracteriza o mecanismo de libertação. Se $n = 0,5$, a difusão e libertação de fármaco da matriz polimérica segue uma difusão Fickiana; se $n = 1$, a difusão é completamente não-Fickiana (ou mecanismo de transporte caso II) e se $0,5 < n < 1$ o transporte do fármaco anómalo (Babu, Ramesh, Saíram, Hosani & Aminabhavi, 2006; Ritger & Peppas, 1987).

1.3.2.6.2 O Flurbiprofeno

O *Flurbiprofeno* é um medicamento usado em afecções oculares. É um anti-inflamatório não esteróide indicado para a profilaxia da miose e da inflamação resultante de cirurgia ocular e também para edema macular cistoide. Não são conhecidas interações para esta forma de administração.

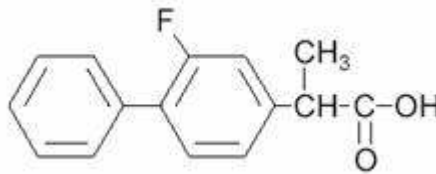


Figura 8 – Estrutura química do *Flurbiprofeno* (adaptado de <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/image.cfm?id=713&type=img&name=Flurbiprofen-Tablets-chemicalstructure.jpg>).

1.3.2.6.1.1 Posologia

No pré-operatório: 4 instilações de 1 gota entre as 2 horas e os 30 minutos que precedem a cirurgia (para prevenção da miose e da inflamação).

No pós-operatório: uma gota instilada 4 vezes/dia, iniciando-se o tratamento 24 horas após a cirurgia, prolongando-se durante 1 a 3 semanas (<http://www.infarmed.pt/prontuario/framepesactivos.php?palavra=Flurbiprofen>; <http://www.drugs.com/mtm/flurbiprofen.html>; <http://www.chemicalland21.com/lifescience/phar/FLURBIPROFEN.htm>; <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=2385>).

1.3.2.7 Estudo da degradação *in vitro*

O estudo da degradação *in vitro* deve simular, o melhor possível, o ambiente a que as microsferas estarão expostas. É avaliada pela perda de massa em relação ao tempo. As poliuretanas contêm ligações hidrolisáveis e, por isso, tendem a ser atacadas por ácidos ou bases, no entanto a sua cristalinidade dá-lhes estabilidade porque as tornar impenetráveis a agentes agressivos (Schnabel, 1992:179-184).

1.3.2.8 Teste do MTT

1.3.2.8.1 Macrófagos

Os macrófagos são células de grandes dimensões do tecido conjuntivo e têm como funções primordiais fagocitar e destruir elementos estranhos ao corpo e apresentar antígenos a linfócitos T (um dos mecanismos de defesa imunitários mais importantes). Desenvolvem-se apenas quando são necessárias (por exemplo, quando ocorre inflamação) a partir dos monócitos (células sanguíneas). Estes deixam a circulação, atravessam o endotélio e entram nos tecidos transformando-se em macrófagos (Silverthorn, 2003; <http://pt.wikipedia.org/wiki/Macr%C3%B3fago>).

1.3.2.8.2 MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio

O MTT é um ensaio colorimétrico que mede a viabilidade, proliferação e activação das células. É um teste sensível, quantitativo e de confiança, além de rápido e de baixo custo e sem recurso a sondas radioactivas. O ensaio é baseado na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais nas células vivas converterem a solução aquosa do substrato amarelo brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), sal monotetrazólico, num produto azul escuro/arroxado, designado por formazan, que é insolúvel em água. A quantidade de formazan produzida é, assim, proporcional ao número de células viáveis (com mitocôndrias activas) (Doyle & Griffiths, 1999:54-64; Mosmann, 1983; Liu, Peterson, Kimura & Schubert, 1997).

2. Protocolo experimental

2.1 Reagentes e equipamento/material

2.1.1 Reagentes e equipamento/material utilizados na preparação dos sistemas poliméricos

As Tabelas 2 e 3 contêm, respectivamente, os reagentes e equipamento/material empregues na preparação dos sistemas poliméricos.

Tabela 2 - Reagentes utilizados na preparação das microsferas.

Reagente	Fornecedor (Origem)	Característica
Poli(álcool vinílico)	Aldrich (EUA)	80% hidrolisado
Poli(caprolactona) diol (PCL)	Aldrich (Alemanha)	$M_w=530$
1,6 – hexametilendiisocianato (HMDI)	Aldrich (Alemanha)	98%
2,4 – tolueno diisocianato (TDI)	Aldrich (Alemanha)	$M_n \sim 2,300$; isocianato $\sim 3,6$ wt(%)
Poli(óxido de propileno) com três grupos isocianatos terminais (TI)	Companhia Petroquímica do Barreiro (Portugal)	$M_w= 3500$
Tween [®] 80	Aldrich (Alemanha)	—
Água destilada	Destilada no próprio laboratório	—

Tabela 3 - Equipamento e material utilizado na preparação de microsferas.

Equipamento	Marca (Origem)	Modelo/Características
Agitador magnético	J.P. SELECTA (Espanha)	Agimatic-N
Balança analítica	SARTORIUS (Alemanha)	BL 1500
Balança analítica	PRECISA BALANCES (Suiça)	<i>Precisa 125 A SCS</i>
Centrífuga	HERAEUS (Alemanha)	Labfuge
Estufa	J.P. SELECTA (Espanha)	—
Homogeneizer	Kinematica AG (Suiça)	Polytron PT 6000
Hotte	VARIOLAB	Furniture W90
Reactor de vidro com quatro tubuladuras	—	1000 ml
Placa de aquecimento e agitação magnética	HEIDOLPH (Alemanha)	MR 2002
Termóstato de imersão	J.P. SELECTA (Espanha)	Tectron Bio

2.1.2 Reagentes e equipamento/material utilizados nos ensaios de caracterização das microsferas

As Tabelas 4 e 5 contêm, respectivamente, os reagentes e equipamento/material empregues nos ensaios de caracterização das microsferas.

Tabela 4 - Reagentes utilizados durante os ensaios de caracterização das microsferas.

Reagente	Fornecedor (Origem)	Característica
Água destilada	Destilada no próprio laboratório	—
Álcool	BWR (Portugal)	95%
Clorofórmio	Merck	Ref. 1.02445.1000
Flurbiprofeno	Sigma (Alemanha)	—
Isopropanol ácido	Feito no próprio laboratório	100 µl de HCl 0,04N em isopropanol
Lixívia	OH ₂	Ref. 5606814123604
Meio RPMI	Sigma-Aldrich (EUA)	Ref. R 0883
MTT	Sigma-Aldrich (EUA)	Ref. M 2128
PBS	Feito no próprio laboratório	pH = 7,4, estéril
Soro bovino fetal	Gibco	Ref. 10500-064
Trypan Blue	Sigma-Aldrich (EUA)	Ref. T 8154

Tabela 5 – Lista de equipamento/material utilizado durante os ensaios de caracterização das microsferas.

Teste	Equipamento	Marca (Origem)	Modelo/Características
MO	Microscópio óptico com contraste de fase	Olympus (Japan)	BH2
SEM	Microscópio electrónico de varrimento	JEOL (Japan)	JSM-5310
Granulometria	Sonicador	CREST (EUA)	TRU-SWEEP™ 275D
	Analizador de partículas por difracção laser	BECKMAN COULTER (EUA)	LS® 130
Potencial Zeta	Medidor de potencial Zeta	Malvern instruments, Ltd (Inglaterra)	Nano Séries, Nano-Z
	Espectrofotómetro	Nicolet (EUA)	Magna-IR™ System 750
FTIR	Acessório ATR	SPECAC (Inglaterra)	Golden Gate Mk II, com ponta de diamante e lentes de ZnSe Agimatic-N

Preparação e caracterização de microsferas para libertação controlada de fármacos em
Oftalmologia

Teste	Equipamento	Marca (Origem)	Modelo/Características
DMTA	Analisador dinâmico termo-mecânico	Triton Technology Ltd. (Inglaterra)	Tritec 2000
TGA	Analisador termogravimétrico	TA Instruments (EUA)	SDT Q600
DSC	Calorímetro diferencial de varrimento	TA INSTRUMENTS (EUA)	Q100
Degradação <i>in vitro</i>	Balança analítica	PRECISA BALANCES (Suíça)	125 A SCS
	Membrana de diálise	Spectrum® (USA)	Spectre/Por® membrane MWCO 8,000
Libertação <i>in vitro</i> de fármaco	Espectrofotómetro UV/ Vis	JASCO (Inglaterra)	V-550
	Banho	J.P. SELECTA (Espanha)	—
	Termóstato de imersão	J.P. SELECTA (Espanha)	Tectron Bio
	Esterilizador U.V	J.P. SELECTA (Espanha)	15 watt, N.º251897
	Autoclave	Varioklav (Alemanha)	400
	Filtro	Schleicher & Shuell FP (Alemanha)	Watman®, 30/0,2
	Banho de água quente	(Alemanha)	GFL 1002
	Seringa	—	10, 5, 2 e 1 ml
	Agulha	Nipro Europe (Bélgica)	25G*5/8 (CE 0123)
	Agulha	Terumo Europe N.V (Bélgica)	19G*1 (CE 0197)
	Tubos Falcon	Corning PQ (México)	Premium quality, Ref.: 430791
Citotoxicidade	Câmara fluxo laminar	Holten LaminAir (Dinamarca)	HB 2448
	Pipeta	Gilson (EUA)	1000µl, 20 µl, 10 µl
	Centrífuga	Heraeus (Alemanha)	—
	Câmara de Neubauer	MARIENFELD (Alemanha)	Profundidade 0,1mm/0,0025mm ²
	Microscópio óptico invertido	Nikon (Japão)	Elipse TS 100
	Máquina fotográfica digital	Nikon (Japão)	Coolpixe 5400
	Placa de cultura	Costar® Corning (EUA)	Estéril, 96 poços
	Estufa com sistema de gases (5% CO ₂)	Shel Lab Incubator (Espanha)	ref. 5215-2
	Leitor micro-ELISA	SLT Spectra (Áustria)	—

2.2 Preparação dos sistemas poliméricos

2.2.1 Preparação de micropartículas

As micropartículas foram preparadas de acordo com o método de polimerização por emulsão. A emulsão foi constituída por uma solução orgânica (fase dispersa) dispersada num solução aquosa (fase contínua).

2.2.1.1 Preparação da fase aquosa (f.a.)

Preparou-se uma solução aquosa de PVA (1% ou 2% m/V), tendo-se adicionado ou não Tween[®]80 de modo a obter-se uma solução a 1% V/V, a 60°C e com agitação constante (~700 rpm). Verteu-se o conteúdo para o reactor de vidro de 4 tubuladuras, colocando-se posteriormente em banho termostatizado a 60°C e com agitação constante.

2.2.1.2 Preparação da fase orgânica (f.o.)

Juntou-se TDI ou TI à PCL em diferentes razões mássicas de isocianato/PCL (80/20, 50/50 ou 20/80), de acordo com a Tabela 7, e seguidamente diluiu-se, em tolueno a 50% de massa da solução, à temperatura ambiente e agitação constante de modo a homogeneizar a mistura.

2.2.1.3 Preparação de micropartículas

Adicionou-se gota-a-gota a fase orgânica à fase aquosa. A natureza (magnética, mecânica ou *homogeneizer*) e velocidade (700, 1400 ou 1600 rpm) de agitação, a razão volumica entre fase orgânica e fase aquosa (1:50 ou 1:100) estão especificadas de acordo com a Tabela 7. Deixou-se prosseguir a reacção durante 2 horas com agitação constante e em banho termostatizado a 60°C.

2.2.1.4 Lavagem, secagem e armazenamento de micropartículas

Após a conclusão da reacção, centrifugou-se o conteúdo a 3000 rpm durante 10 minutos. Seguidamente, efectuaram-se a 3 lavagens com água destilada, de modo a remover os agentes estabilizadores durante 10 minutos a 3000 rpm. Finalmente armazenou-se uma parte em solução aquosa e outra parte secou-se à temperatura ambiente, de modo a realizar os diferentes testes de caracterização.

A Tabela 6 indica os ensaios realizados com o HMDI.

Na Tabela 7 apenas se encontram especificados os ensaios realizados para os isocianatos TI e TDI, contudo também foram realizados ensaios com o HMDI, mas após a visualização microscópica. Como poderá comprovar-se na secção 3.1 *Análise Morfológica* (pág. 32), abandonou-se a utilização deste isocianato.

Tabela 6 - Variáveis dos ensaios realizados com o HMDI.

Razão mássica isocianato/PCL	Razão volúmica	Surfactante	Natureza da agitação	Velocidade de agitação
80/20	1:50	—	Magnética	700 rpm
80/20	1:50	Tween [®] 80	Magnética	700 rpm
50/50	1:50	Tween [®] 80	Magnética	700 rpm
20/80	1:50	Tween [®] 80	Magnética	700 rpm

Tabela 7 - Variáveis na preparação de micropartículas.

Ensaio	Isocianato	Razão mássica isocianato/PCL	Razão volúmica f.o./f.a.	Surfactante	Natureza da agitação	Velocidade de agitação
1	TDI	80/20	1:50	—	Magnética	700 rpm
2	TDI	80/20	1:50	Tween [®] 80	Magnética	700 rpm
3	TDI	50/50	1:50	Tween [®] 80	Magnética	700 rpm
4	TDI	20/80	1:50	Tween [®] 80	Magnética	700 rpm
5	TI	80/20	1:50	—	Magnética	700 rpm
6	TI	80/20	1:50	Tween [®] 80	Magnética	700 rpm
7	TI	50/50	1:50	Tween [®] 80	Magnética	700 rpm
8	TI	20/80	1:50	Tween [®] 80	Magnética	700 rpm
9	TI	80/20	1:50	—	Mecânica	700 rpm
10	TI	80/20	1:100	—	Magnética	700 rpm
11	TI	80/20	1:100	—	Mecânica	700 rpm
12	TDI	80/20	1:100	—	Mecânica	700 rpm
13	TDI	80/20	1:50	—	Mecânica	700 rpm
14	TDI	80/20	1:100	—	Magnética	700 rpm
15	TI	80/20	1:50	—	Mecânica	1400 rpm
16	TI	80/20	1:100	—	Mecânica	1400 rpm
17	TDI	80/20	1:50	—	Mecânica	1400 rpm
18	TDI	80/20	1:100	—	Mecânica	1400 rpm
19	TI	80/20	1:50	—	<i>Homogeneizer</i>	1600 rpm
20	TI	80/20	1:100	—	<i>Homogeneizer</i>	1600 rpm
21	TDI	80/20	1:50	—	<i>Homogeneizer</i>	1600 rpm
22	TDI	80/20	1:100	—	<i>Homogeneizer</i>	1600 rpm

2.3 Ensaios de caracterização das microsferas

2.3.1 Morfologia

2.3.1.1 Microscopia óptica

Colocou-se uma gota de suspensão de microsferas numa lamela e procedeu-se à visualização microscópica de modo a verificar a sua forma e tamanho.

2.3.1.2 Microscopia electrónica de varrimento

Adicionou-se uma pequena quantidade de microsferas, previamente secas num suporte metálico com uma fita adesiva de dupla-face de carbono e revestidas com uma fina camada de cobre - sob vácuo em atmosfera de Árgon, para observação através da microscopia electrónica de varrimento.

2.3.1.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com reflexão total atenuada (FTIR-ATR)

Aplicou-se uma pequena quantidade de microsferas, previamente secas, no recipiente próprio para análise da composição química da matriz das micropartículas do espectrofotometro com o acessório ATR. Para termos de comparação efectuou-se também o mesmo procedimento para os isocianatos utilizados.

2.3.2 Propriedades térmicas e termomecânicas

2.3.2.1 Análise dinâmico termomecânico (DMTA)

Adicionou-se uma pequena quantidade de micropartículas, previamente secas, no equipamento do DMTA. O analisador foi utilizado no modo simples em multifrequência (1 a 10 Hz) e deslocamento de 0,05 mm, com um aquecimento padrão de 2°C/min, para a escala

de temperaturas de -200°C a 200°C (requer nitrogénio líquido). A temperatura de transição vítrea (Tg) foi determinada como o pico da $\tan \delta$.

2.3.2.2 Análise termogravimétrica (TGA)

Juntou-se uma pequena quantidade, previamente seca e medida, ao recipiente de alumina do equipamento de TGA, numa escala de temperatura entre 25 a 800°C, com uma taxa de aquecimento de 10,0°C/min.

2.3.3 Distribuição dos tamanhos das partículas

Colocou-se no sonificador uma certa quantidade de suspensão de microsferas durante 2 minutos de modo a destruir agregados. Posteriormente, adicionou-se uma pequena quantidade de suspensão de microsferas ao analisador de partículas por difracção *laser*. Mantiveram-se as partículas em suspensão durante a medição através de agitação.

2.3.4 Potencial Zeta

Adicionou-se uma pequena quantidade de suspensão de microsferas na célula do equipamento de leitura do potencial Zeta e efectuou-se a leitura, a 25 °C. As micropartículas foram dispersas em água destilada, em solução PBS a pH=7,4 e soluções tampão de pH=6,5 e 2. Analisou-se cada amostra 6 vezes de modo a obter uma média de valores.

2.3.5 Degradação *in vitro*

Efectuou-se este teste apenas para os ensaios correspondentes ao número 16 e 18 da Tabela 5. Mediu-se a massa dos dois tipos de microsferas de acordo com a Tabela 8, etiquetando-se devidamente os frascos com os respectivos dias de medições. Seguidamente adicionaram-se 2 ml de solução PBS a pH = 7,4. Efectuaram-se as medições de massa nos devidos tempos, secando-se previamente as microsferas na estufa a 37°C.

Tabela 8 - Massa medida de microsferas para o teste de degradação.

Dia de medição	Massa de MP (TDI-PCL)	Massa de MP (TI-PCL)
Dia 1	0,0117	0,0062
Dia 2	0,0142	0,0062
Dia 3	0,0114	0,0067
Dia 4	0,0092	0,0052
Dia 7	0,011	0,0092
Dia 14	0,0121	0,0062
Dia 21	0,0106	0,0073
Dia 28	0,0168	0,0056

2.3.6 Estudo sobre a libertação *in vitro* do fármaco

2.3.6.1 Preparação de micropartículas com fármaco incorporado

Tal como para a degradação '*in vitro*' realizou-se este ensaio apenas os ensaios 16 e 18 da Tabela 7 (pág. 20).

Repetiram-se os passos da secção 2.2.1 *Preparação de microsferas* (pág. 18), com a excepção do conteúdo do ponto 2.2.1.2 *Preparação da fase orgânica* (pág. 18), substituído pelo seguinte procedimento:

- juntou-se TDI ou TI e PCL com razão mássica isocianato/PCL de 80/20, seguidamente diluiu-se em tolueno a 50% de massa da solução, à temperatura ambiente e agitação constante. Adicionou-se, numa razão de 10% de massa de *Flurbiprofeno* em relação à soma de massa de PVA, TDI ou TI e tolueno.

2.3.6.1.1 Medição da libertação *in vitro* do fármaco

Colocou-se uma pequena quantidade de microsferas em suspensão PBS dentro de membrana de diálise. Colocou-se esta membrana num recipiente contendo PBS a pH=7,4 a 37°C. Agitou-se o recipiente manualmente, com alguma frequência, ao longo do ensaio.

Removeu-se periodicamente (de uma em uma hora) uma alíquota de solução (200 µl), com substituição de igual volume de PBS novo (fresco).

A quantificação do fármaco em solução foi feita por espectrofotometria UV/Vis, a 246 nm (comprimento de onda de absorção máximo para o *Flurbiprofeno*), adicionando-se 2 ml de soro fisiológico a cada alíquota.

2.3.7 Estudo de citotoxicidade

2.3.7.1 Colheita, isolamento e cultura de macrófagos peritoneais de rato

2.3.7.1.1 Esterilização do material

Esterilizou-se todo o material utilizado na colheita, no isolamento e cultura de macrófagos, em autoclave durante 20 minutos a 120°C bem como o PBS. Os reagentes foram esterilizados por filtração com filtros de porosidade inferior a 0,22 µm.

2.3.7.1.2 Armazenamento dos reagentes

O meio de cultura (RPMI - completo com soro bovino fetal a 10%), o PBS e o isopropanol ácido encontravam-se refrigerados a 4°C. O MTT, protegido da acção da luz com papel de alumínio uma vez que é fotossensível, foi mantido congelado a -15°C até ser utilizado. À medida que foram necessários, estes reagentes foram colocados em suportes apropriados num banho de água quente (com um antifúngico) para atingir a temperatura de 37°C.

2.3.7.1.3 Sacrifício dos animais

Colocou-se uma bola de algodão, dentro de uma bola de chá, embebido em clorofórmio numa caixa de vidro; introduziu-se o animal no seu interior e tapou-se a caixa. O clorofórmio provoca *overdose* anestésica com depressão respiratória indolor. Este procedimento demorou aproximadamente 10 minutos, devido ao peso dos animais utilizados.

2.3.7.1.4 Colheita de macrófagos peritoneais

Encheram-se duas seringas descartáveis de 20 ml com PBS estéril dentro da câmara de fluxo laminar.

Após a *overdose* anestésica, aspergiu-se o animal com álcool a 75° e colocou-se na câmara de fluxo laminar em decúbito dorsal sobre um tabuleiro revestido com um resguardo, igualmente aspergido com álcool a 75°. Posteriormente injectou-se o PBS, na cavidade abdominal, de modo a não atingir nenhum órgão ou vaso sanguíneo, usando uma agulha 25G com o bisel virado para cima.

Realizou-se uma massagem abdominal durante 1 a 2 minutos para facilitar a deslocação dos macrófagos peritoneais para esta região. Após a massagem fez-se a colheita do líquido com seringas descartáveis de 2 ml ou 1 ml com agulhas 19G com o bisel virado para cima (Figura 9).

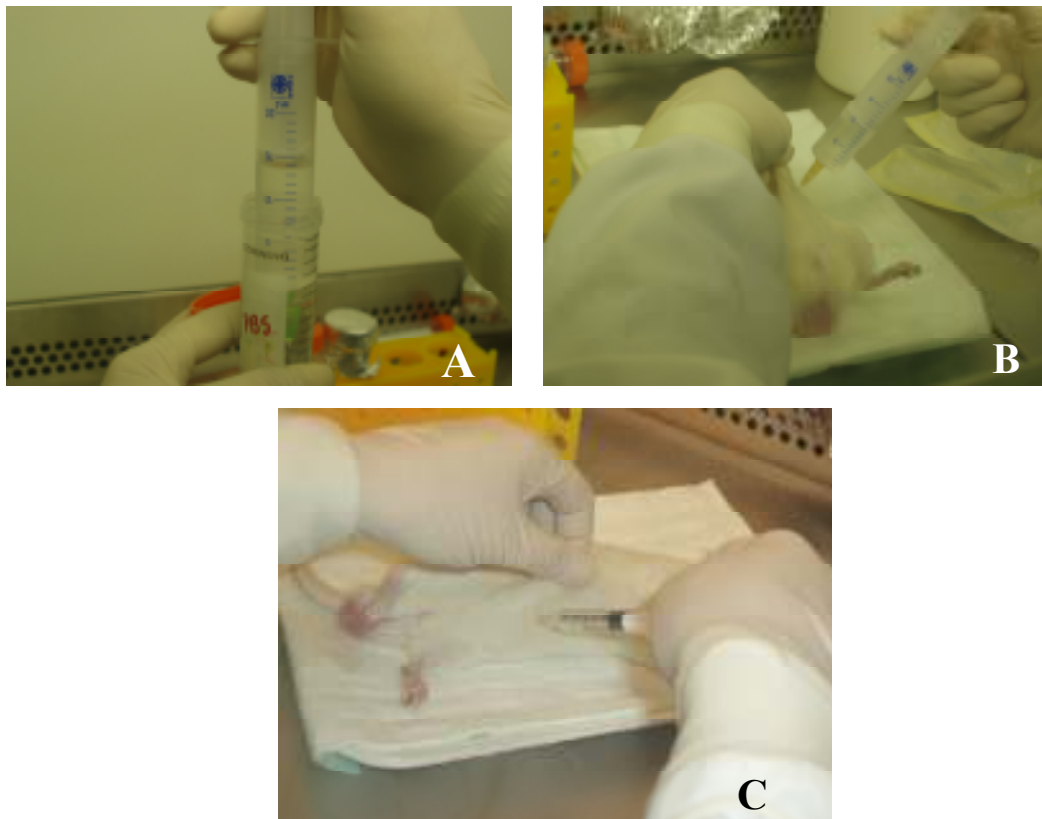


Figura 9 - Representação esquemática da colheita dos macrófagos peritoneais: (A) enchimento da seringa com PBS, (B) injeção do PBS e (C) recolha de macrófagos.

2.3.7.1.5 Isolamento de macrófagos

Centrifugou-se o líquido recolhido da cavidade peritoneal do rato durante 10 minutos a 1100 rpm a 19° C.

Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso com a adição de meio de cultura (RPMI – completo com soro fetal bovino a 10%), de acordo com a Tabela 9.

Tabela 9 - Adição de meio de cultura nos diferentes frascos contendo macrófagos peritoneais de rato.

	Meio de cultura adicionado (ml)
Frasco 1 (rato 1)	3,3
Frasco 2 (rato 2)	3,3
Frasco 3 (rato 3)	3,0
Frasco 4 (rato 4)	2,0
Frasco 5 (rato 5)	2,0

2.3.7.1.6 Teste da viabilidade celular

Após a centrifugação e ressuspensão com meio recolheu-se uma alíquota (10 μ l) para um *ependorff*. Adicionou-se 10 μ l de *Trypan Blue*. Colocou-se na câmara de Neubauer e fez-se a contagem do número de células (Figura 10).

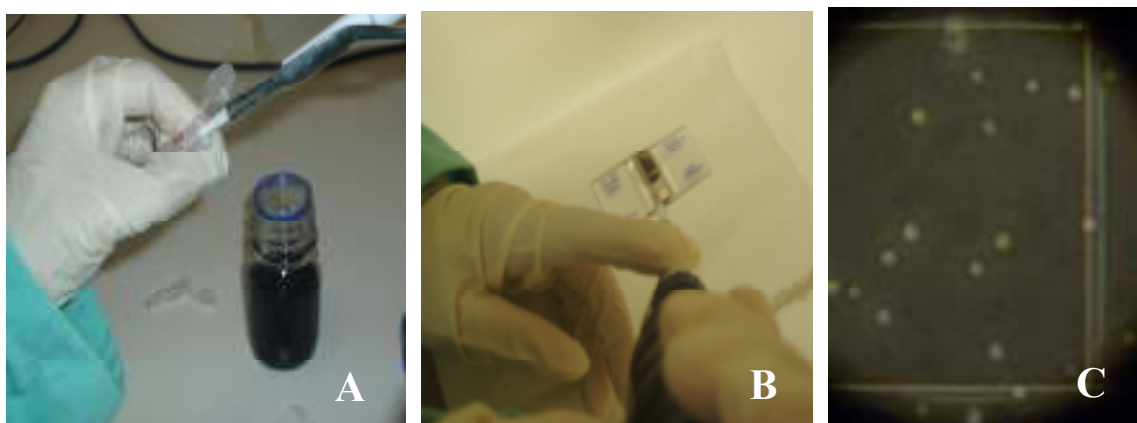


Figura 10 - Representação esquemática do teste de viabilidade celular: (A) adição de *Trypan Blue* à alíquota de macrófagos, (B) colocação na câmara de Neubauer e (C) contagem dos macrófagos ao microscópio óptico de contraste de fase.

2.3.7.1.7 Cultura de macrófagos

Adicionou-se o meio de cultura ao *pellet* e fez-se a homogeneização da solução. De seguida colocaram-se as células em placas de cultura estéreis de 96 poços, que ficaram a incubar 5 horas a 37°C com 5% CO₂, para permitir a adesão das células aderentes - macrófagos, de acordo com a Figura 11.

Após a incubação realizou-se a remoção das células não aderentes e quaisquer substâncias indesejáveis através de uma lavagem com 300 µl de PBS.

De seguida adicionaram-se 300 µl de meio de cultura (RPMI completo com 10% de soro bovino fetal) e incubaram-se as células durante 24 horas a 37°C com 5% CO₂.

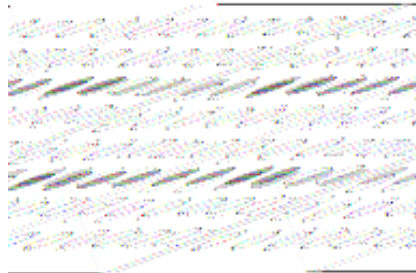


Figura 11 - Esquema da localização dos poços com macrófagos na placa de cultura.

2.3.7.2 Preparação do ensaio de citotoxicidade

Colocaram-se as microsferas no vórtex, de modo a desagregarem, durante cerca de 10 minutos.

Após a incubação da placa, removeu-se o meio de cultura e adicionou-se novo meio de cultura e suspensão de microsferas com concentração 0,05 mg/ml conforme a Tabela 10 abaixo apresentada. As microsferas de TDI-PCL foram adicionadas na 3ª linha e as de TI-PCL foram adicionadas na 6ª linha da placa (Figura 12). A placa foi incubada durante os dias previstos a 37°C com 5% CO₂.

Tabela 10 - Localização da adição de meio de cultura e de microsferas na placa de cultura.

Adição de microsferas	0 μ l (controlo)	30 μ l	5 μ l	0,5 μ l
Localização na placa	3 e 4 ^{as} colunas	5 e 6 ^{as} colunas	7 e 8 ^{as} colunas	9 e 10 ^{as} colunas
Adição de meio de cultura	300 μ l	270 μ l	295 μ l	299,5 μ l

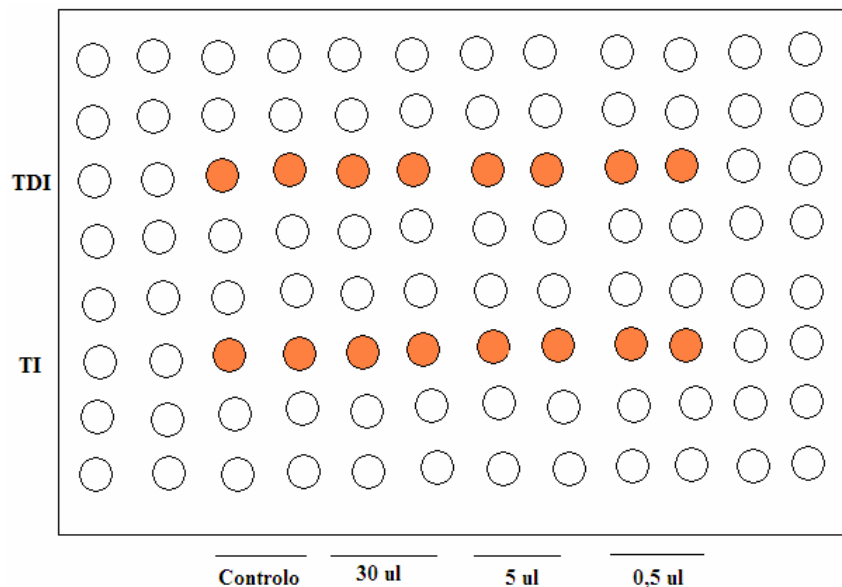


Figura 12 - Esquema representativo da disposição das experiências. Cada linha com poços coloridos corresponde a um tipo de microsfera. Os dois primeiros poços correspondem ao controlo, sendo os restantes ocupados pelas diferentes concentrações de microsferas. Cada dia de ensaio tem uma caixa de cultura.

Nota: Para o ensaio referente ao 7º dia procedeu-se à remoção da solução de meio + microsferas nas respectivas concentrações e adicionou-se de novo meio e microsferas ao 5º dia.

2.3.7.2.1 Teste de citotoxicidade

Após a incubação da placa, removeu-se o meio de cultura e adicionaram-se 270 μ l de meio e 30 μ l de MTT a todos os poços. Incubou-se a placa durante 3 horas a 37°C com 5% CO₂. Ao fim deste tempo substituiu-se a solução de meio e MTT por isopropanol ácido a todos os poços. Homogeneizou-se de modo a dissolver os cristais azuis e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Decorridos os 15 minutos, procedeu-se à leitura da placa no leitor de microELISA SLT (Figura 13) a 540 nm com um filtro de referência a 620 nm.

Registaram-se os valores obtidos.

⇒ Após a conclusão do protocolo os produtos biológicos foram inactivados com lixívia e depois colocados em contentores específicos para incineração.



Figura 13 - Aparelho de microELISA com placa de cultura para leitura das absorvâncias após realização do teste do MTT.

2.3.8 Análise estatística do estudo de citotoxicidade

2.3.8.1 Material e métodos

Efectuou-se uma análise de variância de três factores como medidas repetidas de um factor:

Factor 1 → Formulação,

Factor 2 → Concentração,

Factor 3 → Tempo (medidas repetidas).

Quando adequado efectuaram-se comparações múltiplas (*a posteriori*) utilizando o procedimento de Tukey.

2.3.8.2 Modelo experimental

Utilizou-se um modelo de 3 factores como medidas repetidas num factor e, quando adequado, efectuaram-se comparações múltiplas (*a posteriori*) utilizando o procedimento de Tukey.

3. Resultados

3.1 Análise morfológica

As micropartículas HMDI-PCL apenas foram preparadas com agitação magnética e razão volúmica fase orgânica/fase aquosa de 1:50. Assim, para comparação, apenas se utilizarão as imagens das micropartículas de TI-PCL e TDI-PCL obtidas nestas condições. As imagens dos restantes ensaios de microscopia óptica encontram-se no ANEXO – Microscopia Óptica.

3.1.1 MO

A visualização microscópica das micropartículas forneceu-nos primeiramente informação não só sobre a sua morfologia mas também acerca das suas dimensões e da agregação entre elas.

Os resultados das observações podem ser visualizados nas Figuras 14, 15 e 16.

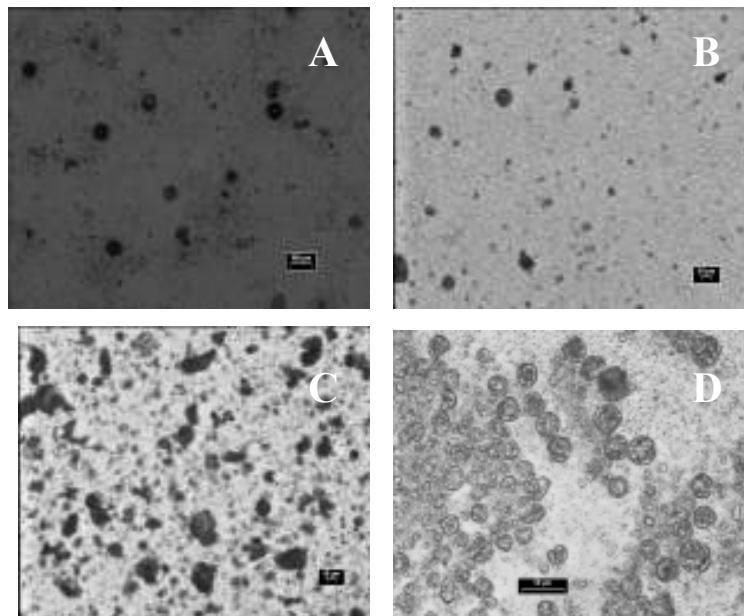


Figura 14 – Visualização por microscopia óptica das micropartículas de HMDI-PCL com diferentes razões mássicas isocianato/PCL, na presença ou ausência de surfactante (Tween[®]80): (A) 80/20 sem Tween[®]80 (ampliação 5×), (B) 80/20 com Tween[®]80 (ampliação 5×), (C) 50/50 com Tween[®]80 (ampliação 5×) e (D) 20/80 com Tween[®]80 (ampliação 20×).

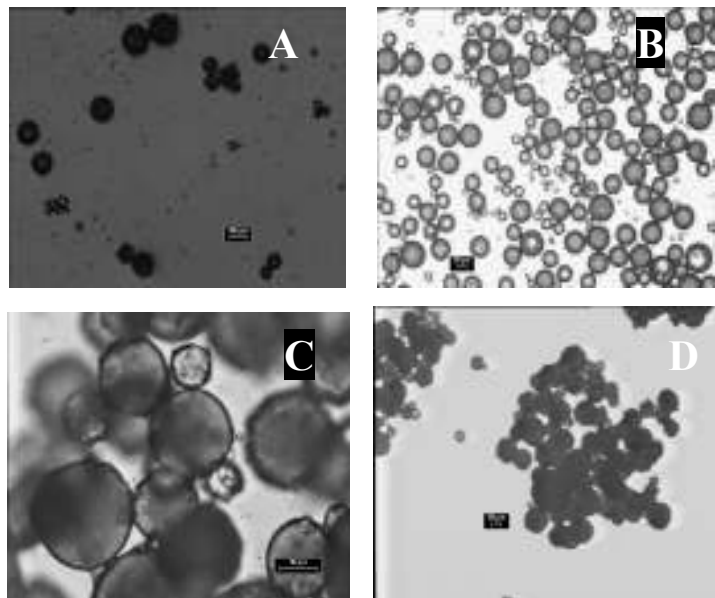


Figura 15 – Visualização por microscopia óptica das micropartículas de TDI-PCL com diferentes razões mássicas isocianato/PCL, na presença ou ausência de surfactante (Tween[®]80): (A) 80/20 sem Tween[®]80 (ampliação 5×), (B) 80/20 com Tween[®]80 (ampliação 5×), (C) 50/50 com Tween[®]80 (ampliação 20×) e (D) 20/80 com Tween[®]80 (ampliação 5×).

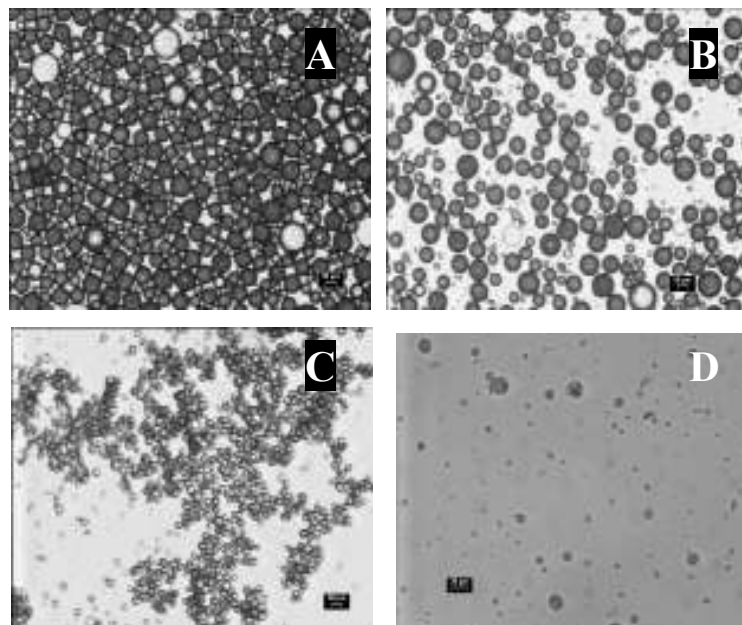


Figura 16 – Visualização por microscopia óptica das micropartículas de TI-PCL com diferentes razões mássicas isocianato/PCL, na presença ou ausência de surfactante (Tween[®]80) (ampliação 5×): (A) 80/20 sem Tween[®]80, (B) TI 80/20 com Tween[®]80, (C) 50/50 com Tween[®]80 e (D) 20/80 com Tween[®]80.

Pela análise da Figura 14 verifica-se que há uma deficiente formação de micropartículas de HMDI-PCL para todas as variáveis estudadas.

Em relação às micropartículas de TDI-PCL e TI-PCL verifica-se a formação de microsferas (Figuras 15 e 16). É também relevante salientar a facilidade de agregação destas na presença de Tween[®]80, comparativamente com os ensaios na ausência de Tween[®]80. Pela análise das figuras, verifica-se que a melhor proporção mássica isocianato/PCL corresponde a 80/20 em ambas as formulações [Figura 15 (A) e (B) e Figura 16 (A) e (B)] e a pior corresponde a 20/80, também para ambas as formulações [Figuras 15 (D) e 16 (D)].

3.1.2 SEM

A microscopia electrónica de varrimento, além da análise morfológica das microsferas, dá-nos também informação acerca da sua topografia.

Os resultados das observações podem ser visualizados nas Figuras 17, 18 e 19.

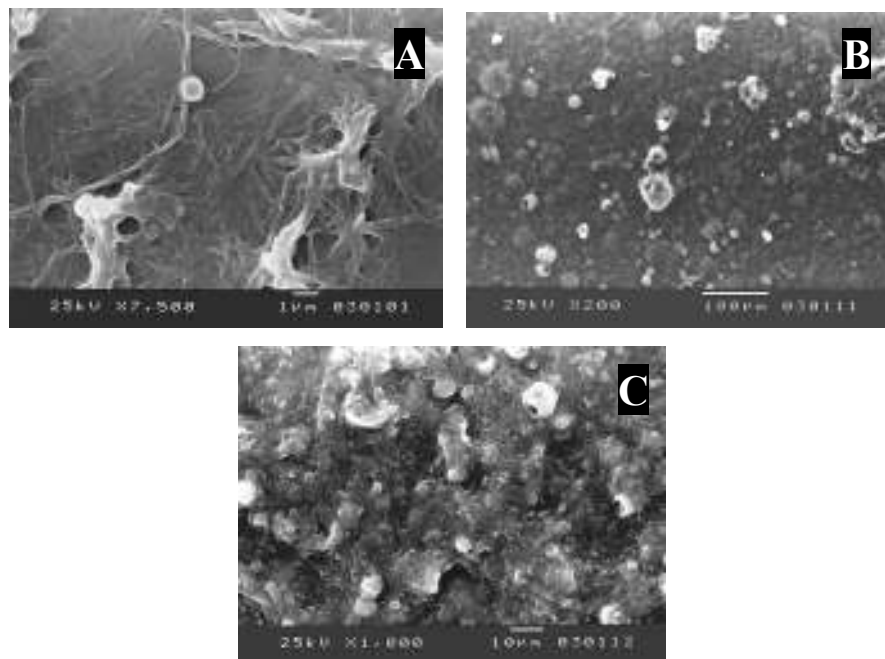


Figura 17 - Visualização por microscopia electrónica de varrimento das micropartículas de HMDI com diferentes razões mássicas isocianato/PCL, na presença ou ausência de surfactante (Tween[®]80): (A) 80/20 sem Tween[®]80 (ampliação 500×), (B) 80/20 com Tween[®]80 (ampliação 200×) e (C) 20/80 com Tween[®]80 (ampliação 1000×).

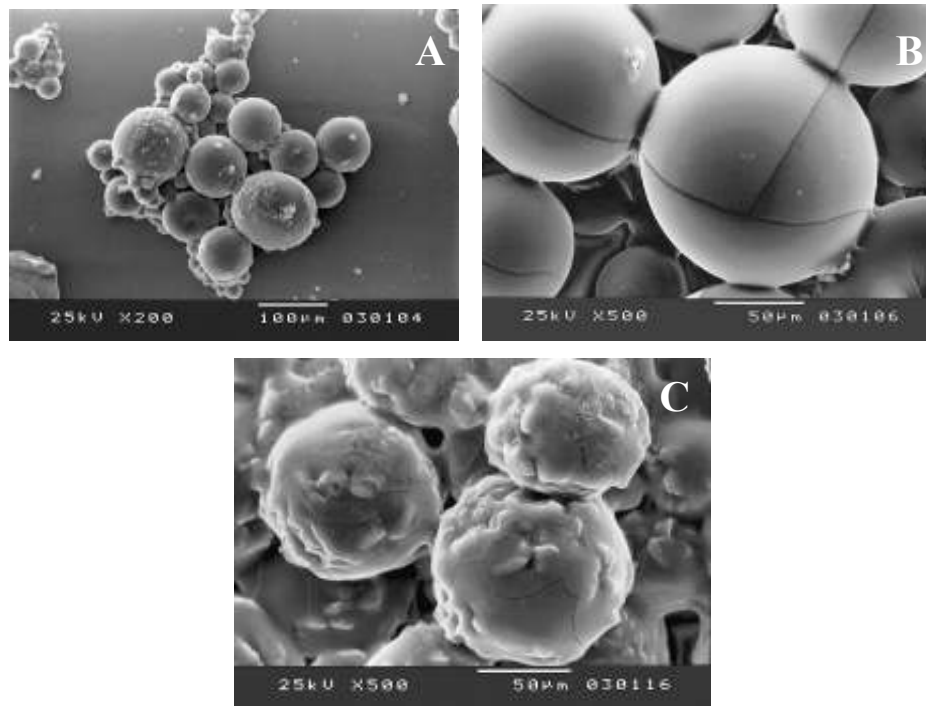


Figura 18 - Visualização por microscopia electrónica de varrimento das micropartículas de TDI-PCL com diferentes razões mássicas isocianato/PCL, na presença ou ausência de surfactante (Tween[®]80): (A) 80/20 sem Tween[®]80 (ampliação 200×), (B) 80/20 com Tween[®]80 (ampliação 500×) e (C) 50/50 com Tween[®]80 (ampliação 500×).

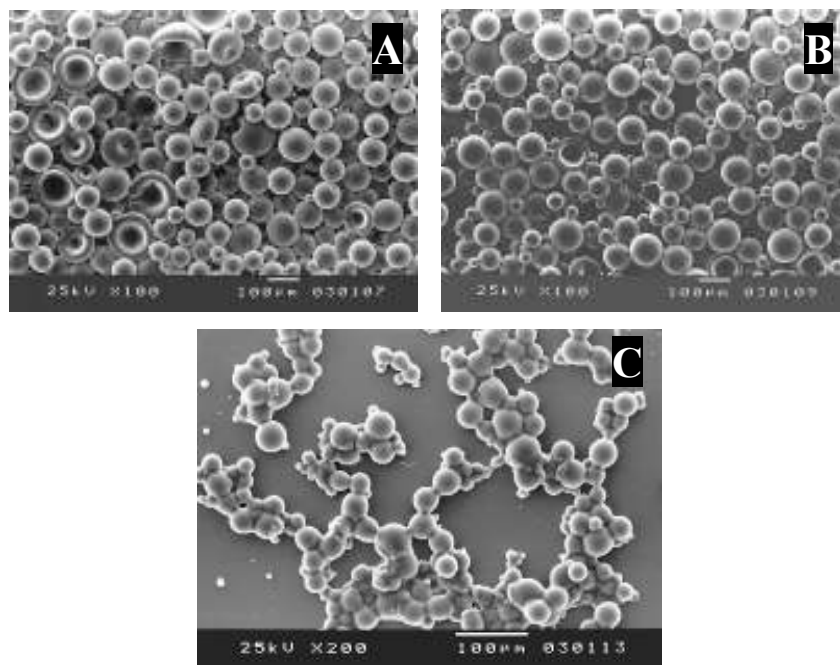


Figura 19 - Visualização por microscopia electrónica de varrimento das micropartículas de TI-PCL com diferentes razões mássicas isocianato/PCL, na presença ou ausência de surfactante (Tween[®]80): (A) 80/20 sem Tween[®]80 (ampliação 100×), (B) 80/20 com Tween[®]80 (ampliação 100×) e (C) 50/50 sem Tween[®]80 (ampliação 200×).

Não se realizaram estudos de SEM para a preparação correspondente à razão mássica isocianato/PCL 20/80 das microsferas de TI-PCL e TDI-PCL e 50/50 das microsferas de HMDI-PCL devido aos resultados da visualização microscópica.

Pela análise da Figura 17 confirma-se, novamente, a não formação de microsferas utilizando como isocianato o HMDI.

Em relação às microsferas de TDI-PCL e TI-PCL (Figuras 18 e 19) confirma-se a obtenção de microsferas.

No que concerne às partículas de TDI-PCL verifica-se que o ensaio com razão mássica isocianato/PCL 50/50 [Figura 18 (C)] apresenta uma superfície mais irregular e rugosa do que o de 80/20 [Figura 18 (B)] ou mesmo das micropartículas de TI-PCL da mesma razão [Figura 19 (C)]. Para TDI-PCL 50/50 o efeito da agregação é mais evidente do que nas outras formulações.

Pela Figura 19 (B) e (C) verifica-se que as micropartículas TI-PCL de razão mássica isocianato/PCL 50/50 são mais aglomeradas e pequenas do que as de 80/20.

Comparando as micropartículas de TDI-PCL e TI-PCL verifica-se que, em ambas, a razão isocianato/PCL 80/20 apresenta uma superfície mais lisa.

3.2 Análise granulométrica por difracção *laser*

Estudo realizado apenas para as micropartículas de TDI-PCL e TI-PCL.

A Tabela 11 sumaria os parâmetros extraídos no estudo da análise granulométrica das micropartículas.

Não se realizou este teste para os ensaios 3, 4 e 8 devido aos resultados obtidos pela microscopia óptica e electrónica.

Tabela 11 - Dados recolhidos no estudo granulométrico.

Ensaio	Média (μm)	Moda (μm)	Desvio padrão (μm)	Coefficiente de variação (%)
1	64,34	96,71	41,08	63,85
2	101,9	116	39,14	38,41
5	78,80	88,29	30,19	38,31
6	78,36	88,29	31,66	40,41
7	52,00	46,68	35,61	68,48
9	44,52	56,00	31,03	69,69
10	84,41	127,1	71,39	84,58
11	70,54	88,29	46,18	65,46
12	46,73	88,29	44,26	94,71
13	47,41	61,34	34,77	73,34
14	45,39	96,71	45,44	100,1
15	17,37	29,61	13,75	79,16
16	19,35	32,43	16,33	84,44
17	22,13	32,43	21,26	96,05
18	24,34	38,91	22,89	94,06
19	7,166	9,929	6,502	90,73
20	4,695	9,065	4,310	91,80
21	5,900	9,065	4,947	83,85
22	5,816	9,929	5,098	87,65

A Figura 20 compara o tamanho das partículas obtidas quando se estudaram vários efeitos (efeito da composição química, efeito da razão volúmica entre as fases contínuas e dispersa no tamanho das partículas e efeito da velocidade e natureza da agitação).

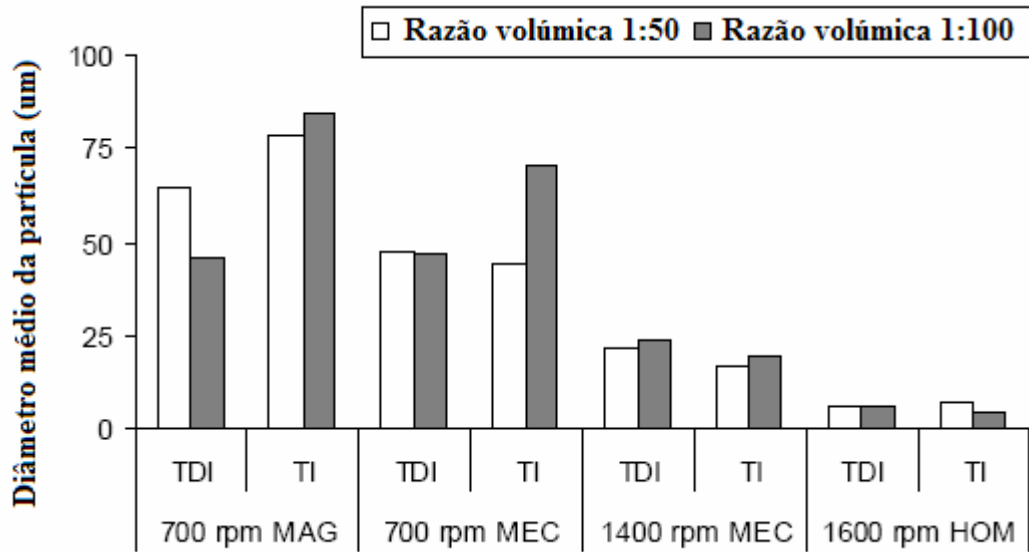


Figura 20 - Diâmetro médio das microsferas obtido nas diferentes formulações.

Pela análise da Tabela 11 verifica-se que o desvio padrão aumenta em todos os ensaios quando se passa da razão volúmica entre a fase orgânica e a fase aquosa de 1:50 a 1:100, excepto para os ensaios 19 e 20. Com a excepção dos ensaios 2 e 5, todos os outros coeficientes de variação estão entre os ~70 a 100%. Na generalidade, o coeficiente de variação diminui nas micropartículas de TI-PCL em relação às micropartículas de TDI-PCL, o que sugere que esta composição química permite a realização de partículas menos polidispersas.

Analisando a Figura 20 verifica-se que o aumento da velocidade diminui o diâmetro das partículas, assim como o emprego de mais força no tipo de agitação (da magnética ao *homogeneizer*).

Neste estudo avaliou-se o efeito de algumas variáveis do processo no que diz respeito ao tamanho e distribuição das micropartículas (Tabela 11 e Figura 20). As variáveis são :

- i) composição química (TDI e TI) - as partículas preparadas com o isocianato TI têm, geralmente, um tamanho ligeiramente menor do que as preparadas com TDI;
- ii) razão volúmica entre a fase orgânica e a fase aquosa (1:50 e 1:100) - o tamanho das micropartículas, de um modo geral, aumenta com a diminuição da razão volúmica entre a fase orgânica e a fase aquosa;

iii) tipo de agitação (magnética, mecânica ou homogeneizer) - as partículas preparadas com o *homogeneizer* são menores do que as preparadas com agitação mecânica e estas, por sua vez, são menores do que as preparadas com agitação magnética;

iv) velocidade de agitação (700, 1400 e 1600 rpm) - o tamanho das micropartículas diminui significativamente com o aumento da velocidade de agitação.

3.3 Análise química por FTIR-ATR

A análise do espectro dá informação acerca das diferenças estruturais. Assim, obtiveram-se os espectros das micropartículas de TDI-PCL e TI-PCL (Figuras 21 e 22, respectivamente)

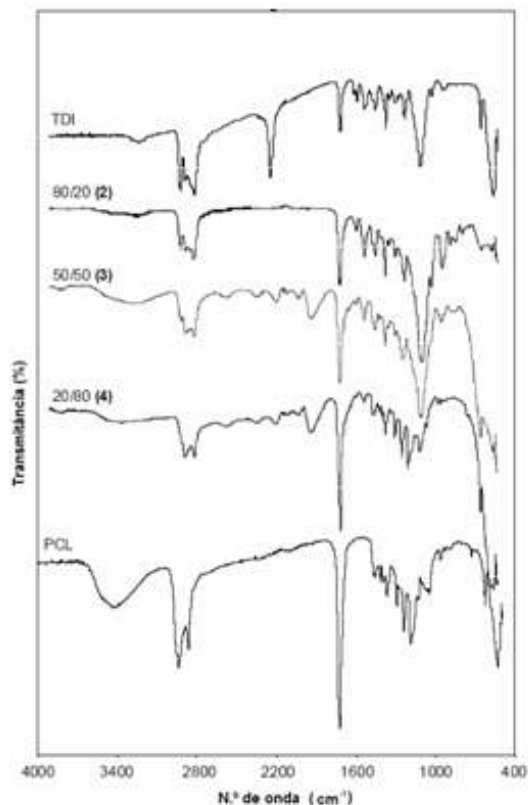


Figura 21 – Espectro FTIR-ATR de TDI, PCL e micropartículas de TDI-PCL preparadas com diferentes razões mássicas icocianato/PCL (os números dos ensaios encontram-se indicados entre parêntesis).

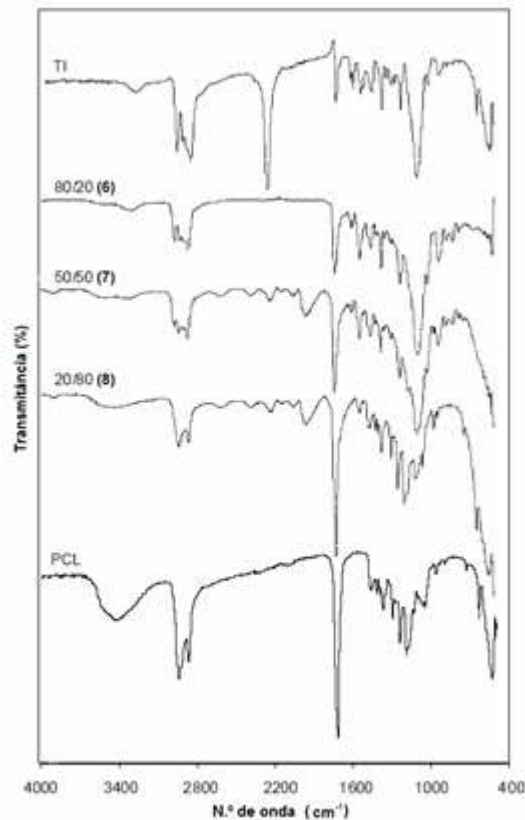


Figura 22 - Espectro FTIR-ATR de TI, PCL e micropartículas de TI-PCL preparadas com diferentes razões mássicas isocianato/PCL (os números dos ensaios encontram-se indicados entre parêntesis).

Ambos os espectros da PCL mostram uma larga banda de absorção absorção a cerca de $\sim 3435\text{ cm}^{-1}$ e uma estreita banda a 1720 cm^{-1} .

Em relação aos espectros dos isocianatos TDI e TI é de salientar a existência de uma banda estreita de absorção entre os $2275 - 2250\text{ cm}^{-1}$.

No espectro de micropartículas, em ambos os casos e de uma maneira geral e em comparação com os outros espectros analisados anteriormente, surgiu um pico de absorção a cerca de $1740-1690\text{ cm}^{-1}$, mas, em contrapartida, assistiu-se ao desaparecimento total dos picos entre $2275-2250\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 3435\text{ cm}^{-1}$ e a uma significativa diminuição da banda de absorção a $\sim 1720\text{ cm}^{-1}$.

Algumas diferenças foram observadas, tais como a consequência da mudança da razão mássica isocianato/PCL. O aumento da quantidade de isocianato na formulação causou uma diminuição do pico de absorção a $\sim 1720\text{ cm}^{-1}$ e um aumento na banda de absorção a cerca de $1740-1690\text{ cm}^{-1}$.

3.4 Análise das propriedades térmicas através do DMTA e TGA

As características térmicas das micropartículas foram investigadas através de DMTA e TGA. As transições térmicas das partículas de TDI-PCL e TI-PCL são dadas pela Figura 23 e as respectivas Tg estão disponíveis na Tabela 12.

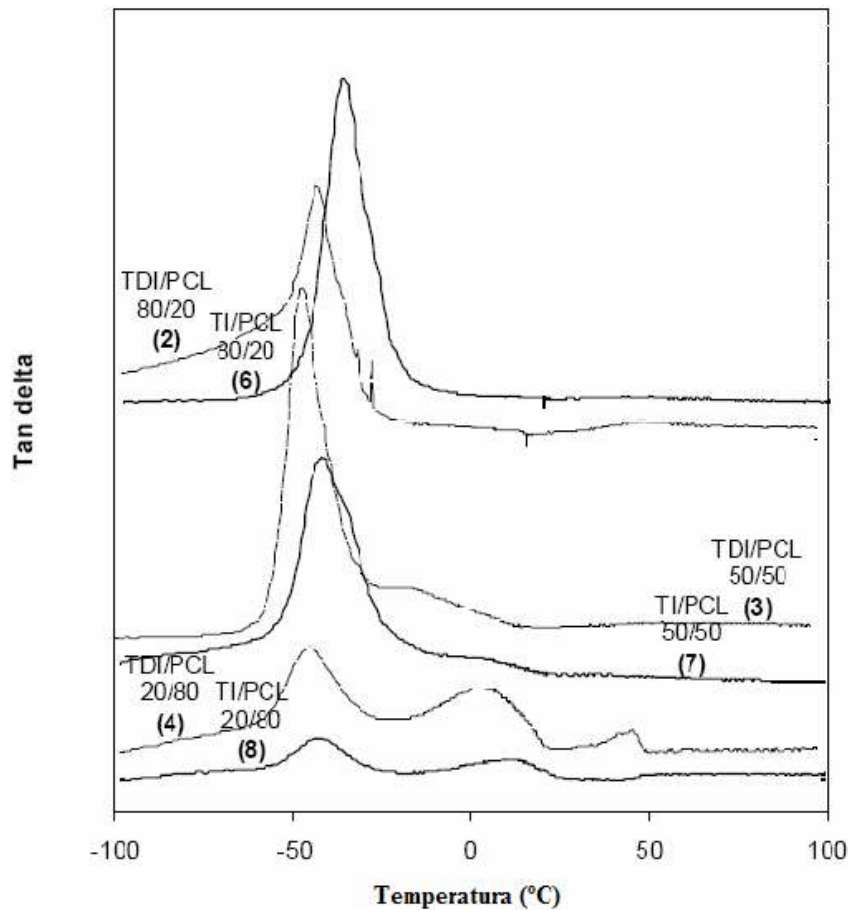


Figura 23 - Termograma das microsferas para diferentes formulações (entre parêntesis está indicado o número do ensaio).

Tabela 12 – Temperatura de transição vítrea das micropartículas.

Razão mássica	80/20	50/50	20/80
TDI/PCL	-43,9 °C	-46,1 °C	-45,2 °C
TI/PCL	-37,4 °C	-42,6 °C	-43,7 °C

Pela análise da Figura 23 observa-se que as micropartículas preparadas com razão mássica isocianato/PCL 20/80 mostram um termograma com dois ou mais picos, mas, por outro lado, os termogramas das razões 50/50 e 80/20 apresentam apenas um pico.

Observando a Tabela 11 verifica-se que a Tg aparece para valores mais altos para as formulações com TI em relação às de TDI.

A Figura 24 apresenta a curva termogravimétrica para micropartículas de TDI-PCL e TI-PCL preparadas com a formulação 80/20 e para a PCL.

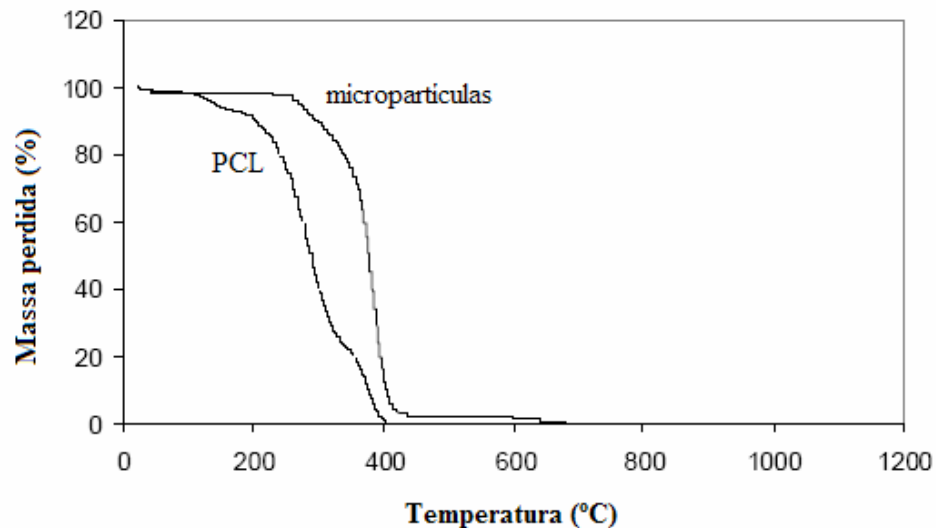


Figura 24 - Curva termogravimétrica obtida para a PCL e micropartículas de TDI-PCL e TI-PCL com razão mássica isocianato/PCL 80/20.

Pela análise da curva termogravimétrica verifica-se que a degradação térmica das micropartículas começa, aproximadamente, no intervalo 346-348°C, significativamente superior a PCL.

3.5 Análise das propriedades adesivas através do Potencial Zeta

O potencial Zeta é também uma importante característica físicoquímica das micropartículas.

Os resultados das medições do potencial Zeta encontram-se na Tabela 13 e Figura 25.

Tabela 13 – Valores do potencial Zeta das micropartículas em diferentes meios de suspensão.

Ensaio	Água	7,4	6,5	2
2	-13,50	-3,12	-2,94	-1,91
6	-7,39	-2,82	-2,49	-1,72
15	-4,30	-6,27	-2,04	-2,53
17	-9,09	-2,20	-1,57	-1,55
20	-11,40	-2,02	-1,80	-2,34
21	-23,90	-1,89	-1,66	-1,79

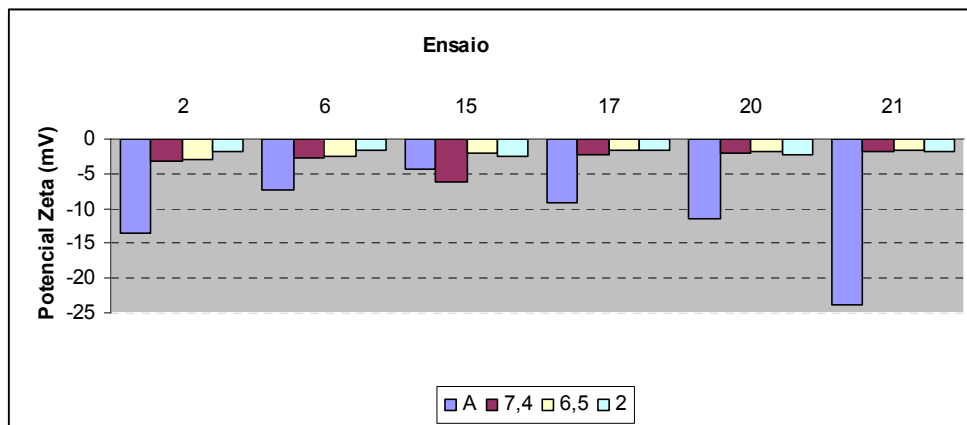


Figura 25 – Valores do potencial Zeta das micropartículas em diferentes suspensões.

De acordo com estes resultados, todas as formulações exibem um valor de potencial Zeta negativo, tanto na água como nas soluções tampão.

O potencial Zeta das microsferas de TDI-PCL é significativamente maior (em valor absoluto) do que o das partículas contendo TI.

As micropartículas do ensaio 21, suspensas em água, são as que apresentam maior valor absoluto do potencial Zeta. As partículas dos ensaios 15 e 17 têm um potencial Zeta menor que as partículas dos ensaios 20 e 21.

Embora as microsferas tenham um baixo valor absoluto do potencial Zeta, quando a medição é realizada em soluções tampão tornaram-se ainda mais baixos, mostrando, de um modo geral, um valor bastante semelhante.

NOTA: A partir daqui em todos os ensaios realizados apenas foram testadas as formulações de microsferas de TDI-PCL e TI-PCL com razão mássica isocianato/PCL 80/20, razão volumétrica fase orgânica/fase aquosa de 1:100, sem surfactante e preparadas com agitação mecânica a 1400 rpm.

3.6 Análise da degradação *in vitro*

A degradação '*in vitro*' foi realizada em solução PBS a pH=7,4 e os resultados estão expostos na Tabela 14 e Figura 26 para as micropartículas de TDI-PCL e na Tabela 15 e Figura 27 para as micropartículas de TI-PCL.

Tabela 14 – Valores da percentagem de massa perdida nas microsferas TDI-PCL durante 28 dias.

Tempo	% massa perdida
dia 1	0,85
dia 2	0,70
dia 3	0,88
dia 4	3,26
dia 7	4,55
dia 14	4,13
dia 21	4,72
dia 28	7,31

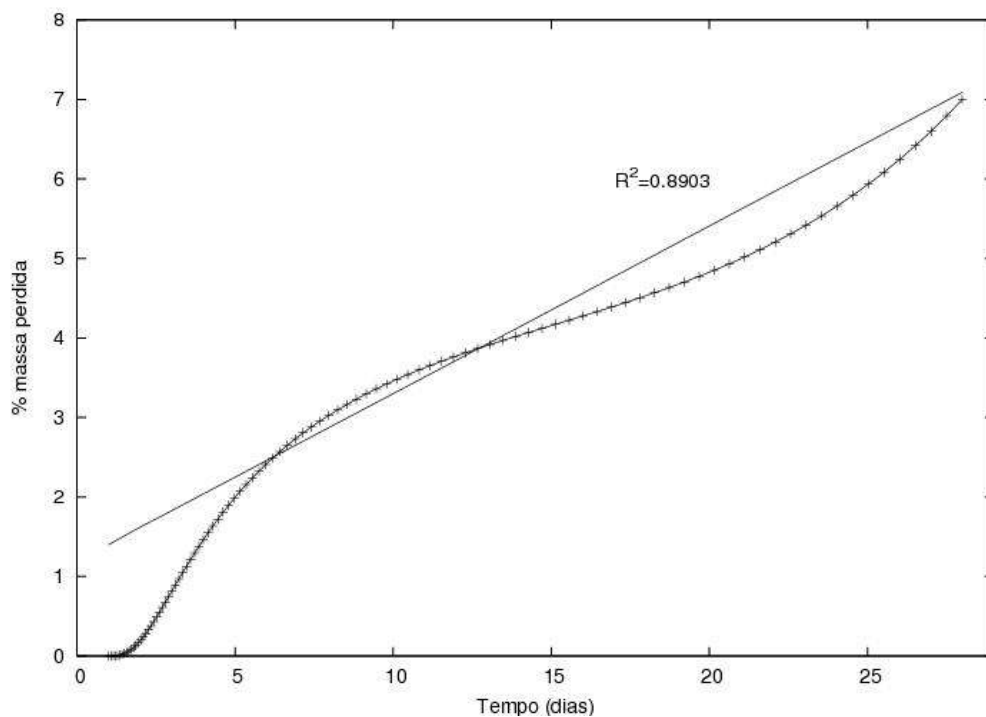


Figura 26 - Estudo da degradação *in vitro* em solução PBS das microsferas de TDI-PCL durante 28 dias.

Tabela 15 – Valores da percentagem de massa perdida nas microsferas TI-PCL durante 28 dias.

Tempo	% massa perdida
Dia 1	1,61
Dia 2	3,23
Dia 3	2,99
Dia 4	3,85
Dia 7	4,35
Dia 14	6,45
Dia 21	5,48
Dia 28	6,89

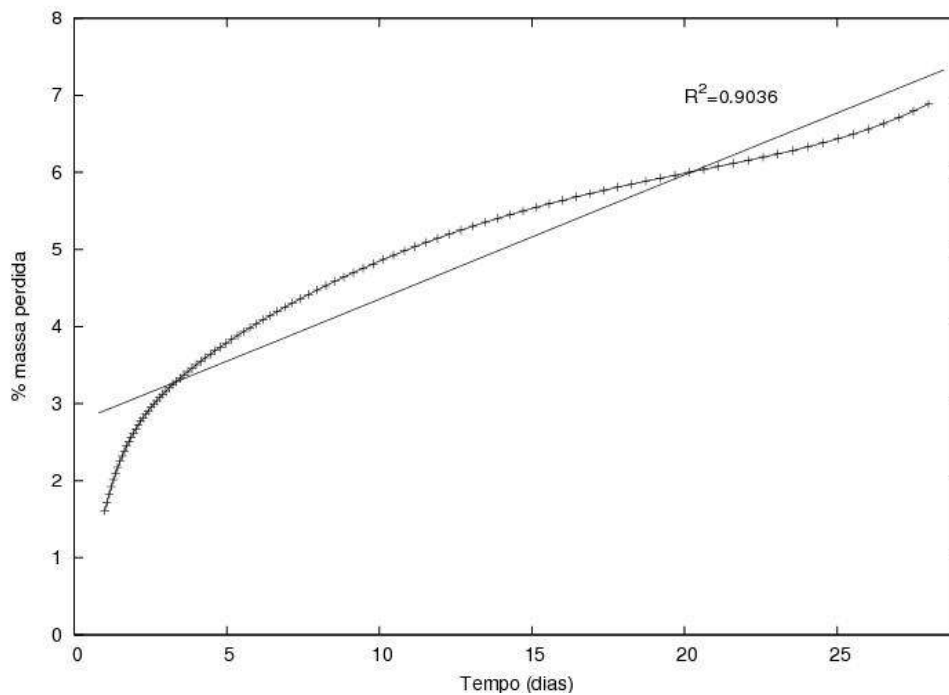


Figura 27 - Estudo da degradação *in vitro* em solução PBS das microsferas de TI-PCL durante 28 dias.

Após a análise das Figuras 26 e 27 verifica-se que ambas as microsferas têm uma degradação muito lenta e semelhante, uma vez que ao final de 28 dias apenas houve cerca de 7% de perda de massa. É também de salientar que as microsferas de TI-PCL têm uma perda máxima de massa ligeiramente inferior às microsferas de TDI-PCL (6,89 e 7,31, respectivamente).

3.7 Análise da libertação do fármaco *in vitro* por espectrofotometria UV/Vis

A libertação do fármaco (*Flurbiprofeno*) foi analisada em solução PBS a pH=7,4 a 37°C de modo a simular o ambiente tópico ocular. Assim, pela medição da libertação por espectrofotometria UV/Vis obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 16 e Figura 28.

Tabela 16 - Taxa de libertação de fármaco durante 8 horas.

Tempo (horas)	% de libertação de fármaco nas micropartículas TDI-PCL	% de libertação de fármaco nas micropartículas TI-PCL
1	48	57
2	84	88
3	90	88
4	94	95
5	95	96
6	91	97
7	99	99
8	100	100

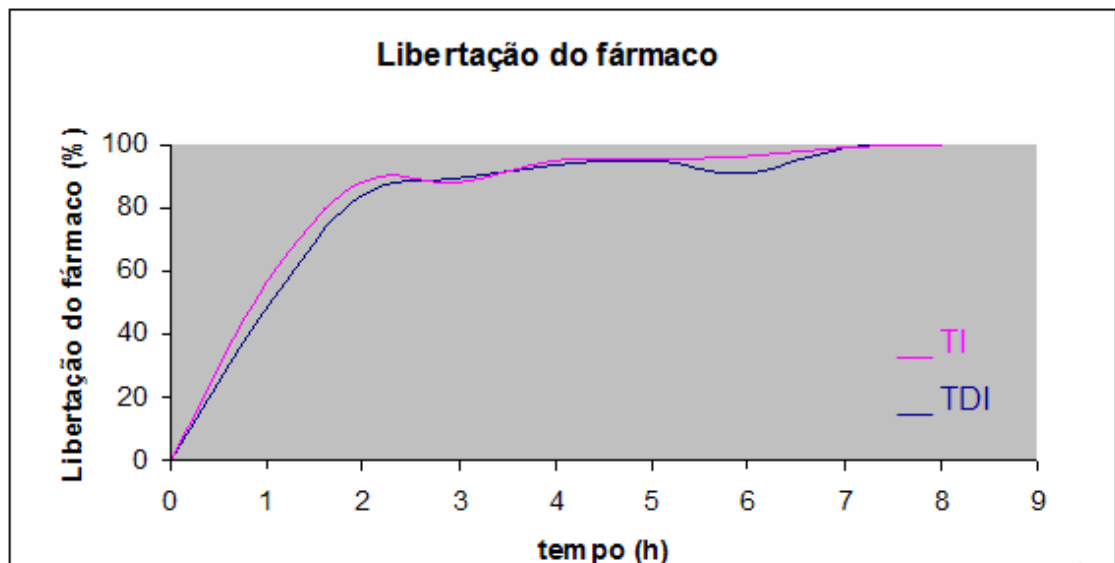


Figura 28 - Curva de libertação do fármaco *in vitro* para as micropartículas de TDI-PCL e TI-PCL (na figura TDI e TI, respectivamente).

Comparando as duas formulações verifica-se que as curvas de libertação de fármaco são bastante semelhantes nos dois casos. As micropartículas de TDI-PCL apresentam uma curva de libertação ligeiramente inferior à das micropartículas de TI-PCL (Figura 28), no entanto, ao final de oito horas, ambas atingem a taxa de máxima de libertação (100%) (Tabela 16).

É possível classificar o tipo de transporte nas primeiras 2 horas através da análise do valor de n da equação (6) (pág. 12). Assim, para as microsferas de TDI temos $n \approx 0,8$ e para as de TI, $n \approx 0,6$.

3.8 Análise de citotoxicidade através do teste do MTT

3.8.1 Dados da contagem de macrófagos

Os dados referentes à colheita e contagem de macrófagos encontram-se identificados na Tabela 17.

Tabela 17 - Contagem de macrófagos para cada rato.

Rato	Volume recolhido (ml)	N.º de células/ml (câmara de Neubauer)	Diluição com meio de cultura (ml)	N.º de células/ml
1	32,5	$448,8 \times 10^4$	3,3	$224,4 \times 10^4$
2	32,5	$303,6 \times 10^4$	2,48	$227,7 \times 10^4$
3	25	255×10^4	—	—
4	27,5	609×10^4	6	$233,5 \times 10^4$
5	28	467×10^4	4	203×10^4

Pretendia obter-se uma concentração celular de cerca de 200×10^4 células/ml de meio de cultura (Kemp, n.d.), assim tiveram de se fazer diluições de modo a obter este objectivo, tal como revela a Tabela 17. No caso dos macrófagos do rato 3 não foi necessário fazer diluição, uma vez que o seu valor já se encontrava dentro da gama pretendida (255×10^4 células/ml).

3.8.2 Resultados do teste do MTT

A percentagem de sobrevivência celular foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\%sobrevivência_celular = \frac{absorvância_da_amostra_a_analisar}{absorvância_do_controle} \times 100, \quad (7)$$

onde a percentagem de sobrevivência do controlo é sempre considerada igual a 100%.

Tabela 18 – Taxa de sobrevivência celular durante os 7 dias de estudo na presença de diferentes quantidades de microsferas com TDI na sua formulação.

Tempo	Controlo	30 µl	5 µl	0,5 µl
dia 1	100	56	94	82
dia 3	100	70	74	102
dia 5	100	32	95	89
dia 7	100	85	70	63

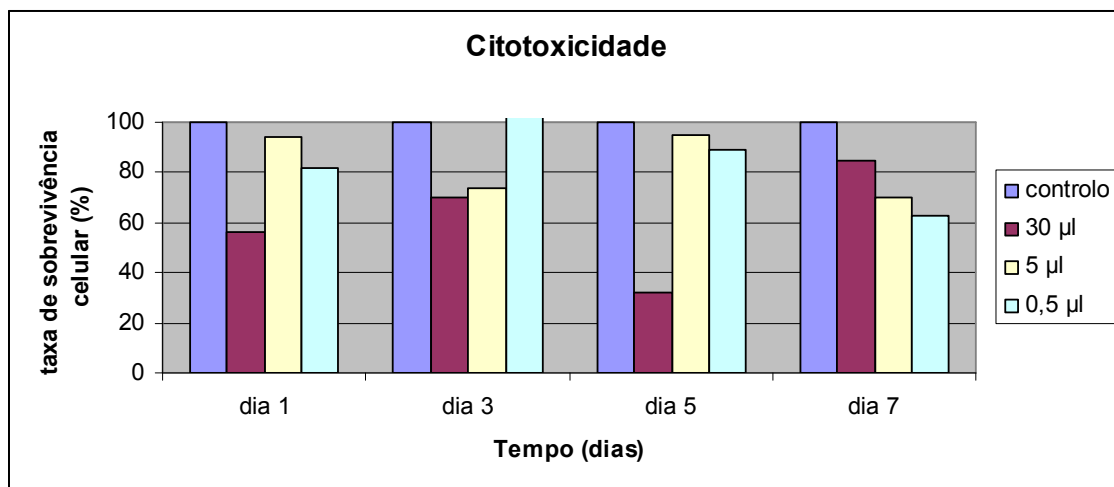


Figura 29 - Taxa de sobrevivência celular dos macrófagos durante os 7 dias de estudo na presença de diferentes quantidades de microsferas de TDI-PCL.

Tabela 19 – Percentagem de sobrevivência celular durante os 7 dias de estudo na presença de diferentes quantidades de suspensão de microsferas com TI na sua formulação.

Tempo	Controlo	30 µl	5 µl	0,5 µl
dia 1	100	76	80	81
dia 3	100	50	65	82
dia 5	100	48	76	71
dia 7	100	93	90	100

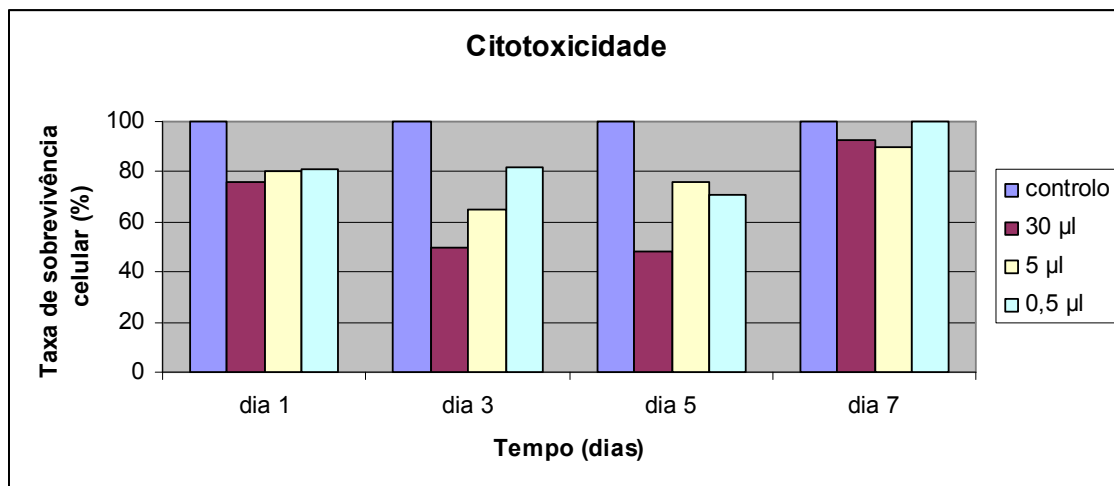


Figura 30 – Percentagens de sobrevivência celular dos macrófagos peritoneais de rato durante os 7 dias de estudo na presença de diferentes quantidades de microsferas de TI-PCL

Comparando as Figuras 29 e 30 podemos afirmar que há uma taxa de sobrevivência ao final dos 7 dias maior nas microsferas que têm TI na sua formulação, uma vez que estas apresentam um sinal muito próximo do sinal do controlo, que corresponde aos 100%. Através deste resultado podemos afirmar que estas microsferas são menos citotóxicas e por isso mais indicadas para uso médico do que as outras.

3.8.3 Resultado da análise estatística do estudo de citotoxicidade

Os resultados da análise da variância para o modelo de três factores como medidas repetidas num factor podem ser observados na Tabela 20.

Conforme se pode observar na Tabela 20 verifica-se a existência de diferenças significativas entre as duas formulações (TDI e TI), as concentrações e uma interacção entre as formulações e concentrações.

Observam-se também diferenças significativas ao longo do tempo, bem como nas interacções tempo*formulação e tempo e concentração. No entanto, a interacção entre os três factores não é estatisticamente significativa.

Preparação e caracterização de microsferas para libertação controlada de fármacos em Oftalmologia

Tabela 20 – Resultado da análise de variância para o modelo de 3 factores como medidas repetidas num factor. A vermelho encontram-se os valores estatisticamente significativos.

Efeitos	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Formulação	0,001502	1	0,001502	14,881	0,004826
Concentração	0,002954	3	0,000985	9,758	0,004752
Formulação*Concentração	0,000391	3	0,000130	1,290	0,342364
Erro	0,000807	8	0,000101	—	—
Dias	0,077283	3	0,025761	271,437	0,000000
Tempo*Formulação	0,018090	3	0,006030	63,537	0,000000
Tempo*Concentração	0,003761	9	0,000418	4,403	0,001741
Tempo*Formulação*Concentração	0,001287	9	0,000143	1,506	0,202094
Erro	0,002278	24	0,000095	—	—

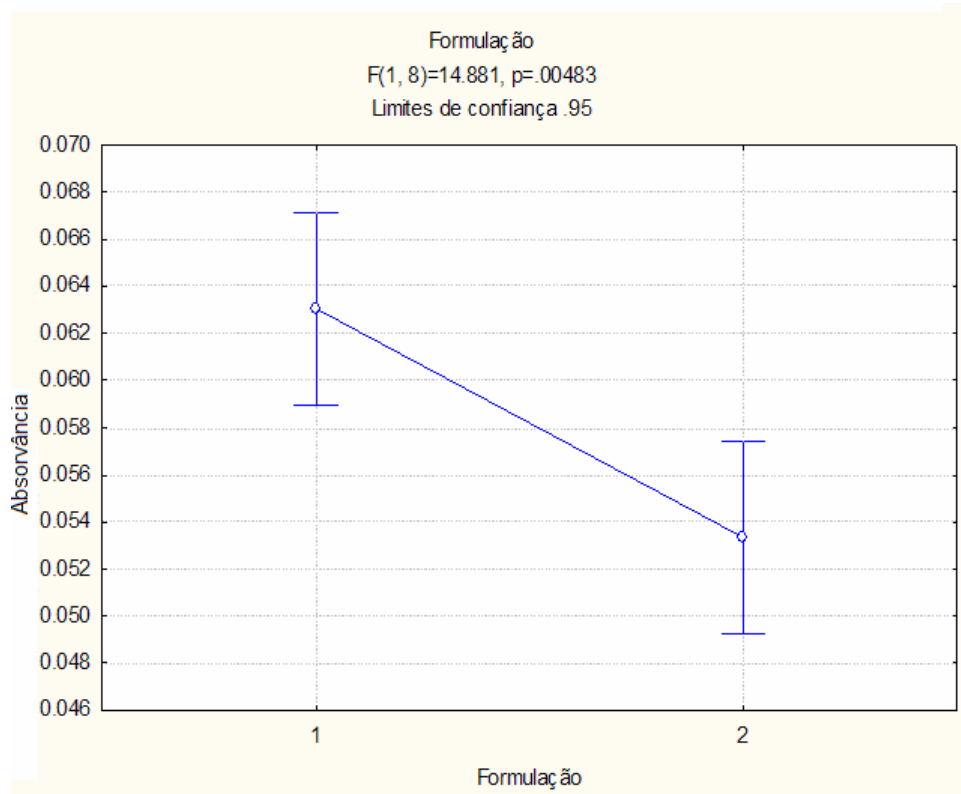


Figura 31 – Valores médios da absorvância e respectivos limites de confiança para as formulações com TDI (1) e TI (2).

Na Figura 31 podem ser observados os valores médios e respectivos limites de confiança para as formulações testadas, respectivamente TDI e TI.

O tratamento *a posteriori* relativamente às concentrações mostra, conforme se pode observar na Tabela 21, que existem diferenças significativas entre o controlo e 30µl. Não se observam diferenças significativas entre o controlo e 5 µl, o controlo e 0,5 µl, nem entre 5 e 0,5 µl.

Tabela 21 - Valores do tratamento *a posteriori* para a concentração. A vermelho encontram-se os valores estatisticamente significativos.

Concentração	$\bar{X} = 0,06563$	$\bar{X} = 0,04744$	$\bar{X} = 0,05781$	$\bar{X} = 0,06187$
Controlo	—	0,004129	0,202935	0,723778
30µl	0,004129	—	0,074422	0,015386
5µl	0,202935	0,074422	—	0,675143
0,5µl	0,723778	0,015386	0,675143	—

Os valores anteriormente verificados estão ilustrados na Figura 32.

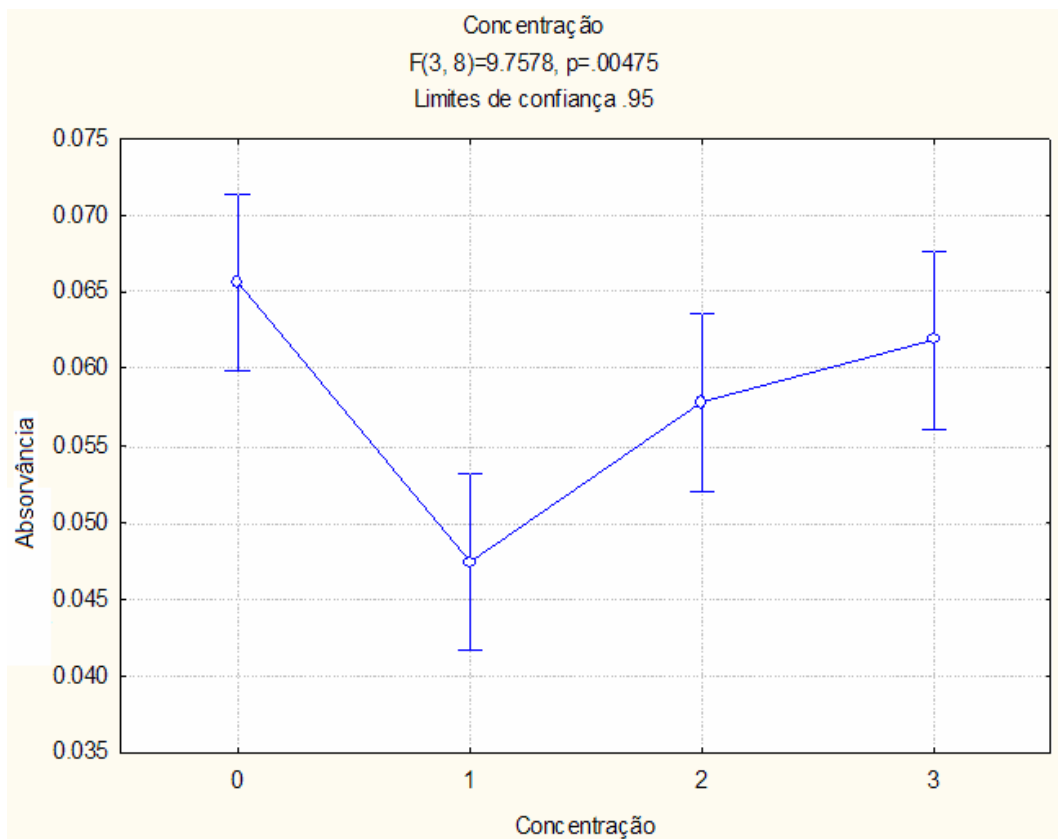


Figura 32 – Valores médios da absorvância e respectivos limites de confiança para as concentrações estudadas: controlo (0), 30 µl (1), 5 µl (2) e 0,5 µl (3).

Na Tabela 22 encontram-se os dados do tratamento *a posteriori* relativamente ao tempo. Pela sua análise é possível verificar que entre todos os tempos estudados (1 dia com 3 dias, 1 dia com 5 dias, 1 dia com 7 dias, 3 dias com 5 dias, 3 dias com 7 dias e 7 dias com 5 dias) existem diferenças significativas, como se pode confirmar na Figura 33.

Tabela 22 – Valores do tratamento *a posteriori* para o tempo. A vermelho encontram-se os valores estatisticamente significativos.

Tempo	$\bar{X} = 0,10638$	$\bar{X} = 0,07400$	$\bar{X} = 0,01594$	$\bar{X} = 0,06563$
Dia 1	—	0,000161	0,000161	0,000161
Dia 3	0,000161	—	0,000161	0,000161
Dia 5	0,000161	0,000161	—	0,000184
Dia 7	0,000161	0,000161	0,000184	—

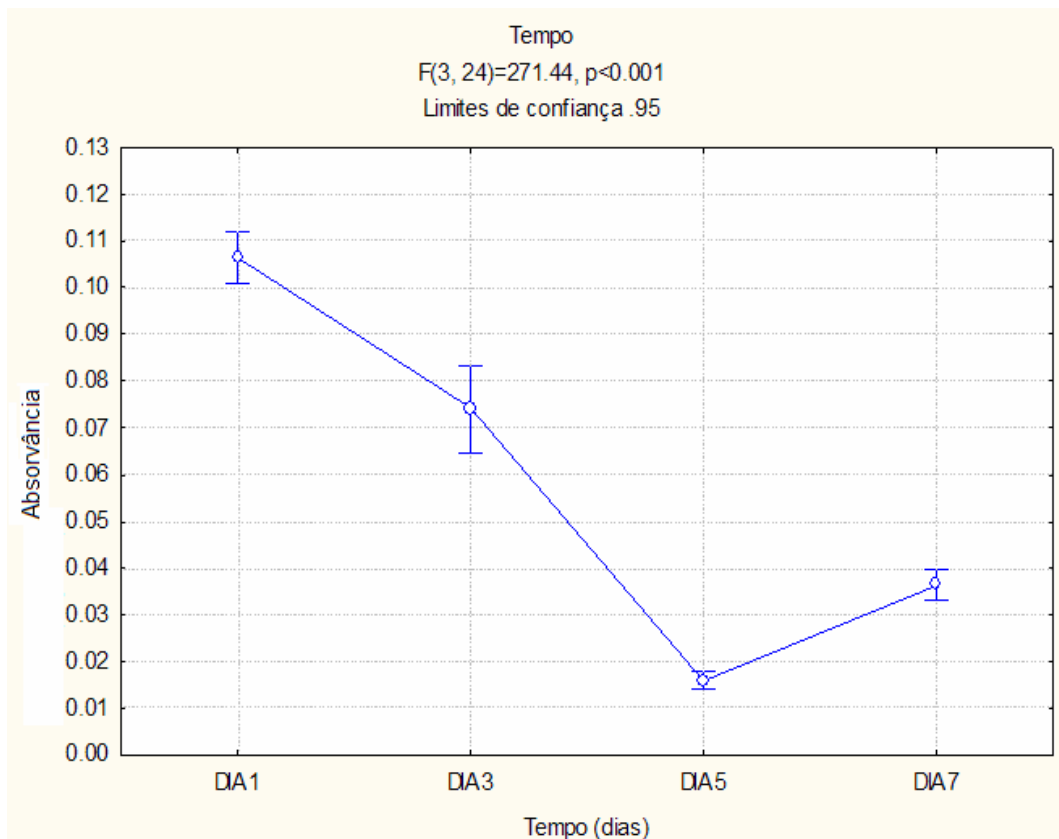


Figura 33 - Valores médios da absorvância e respectivos limites de confiança para os tempos estudados (dia 1, dia 3, dia 5 e dia 7).

Na Figura 34 podem-se observar valores médios de absorvância nas duas formulações, TDI e TI, ao longo do tempo. A comparação *a posteriori* efectuada no dia 3 mostra que o valor de TDI é significativamente mais elevado que o TI ($p < 0,001$). Nos outros tempos estudados não há diferenças significativas. Entre as duas formulações é estatisticamente significativo o aumento da absorvância do dia 5 para o dia 7 (TDI: $p < 0,001$ e TI: $p < 0,001$).

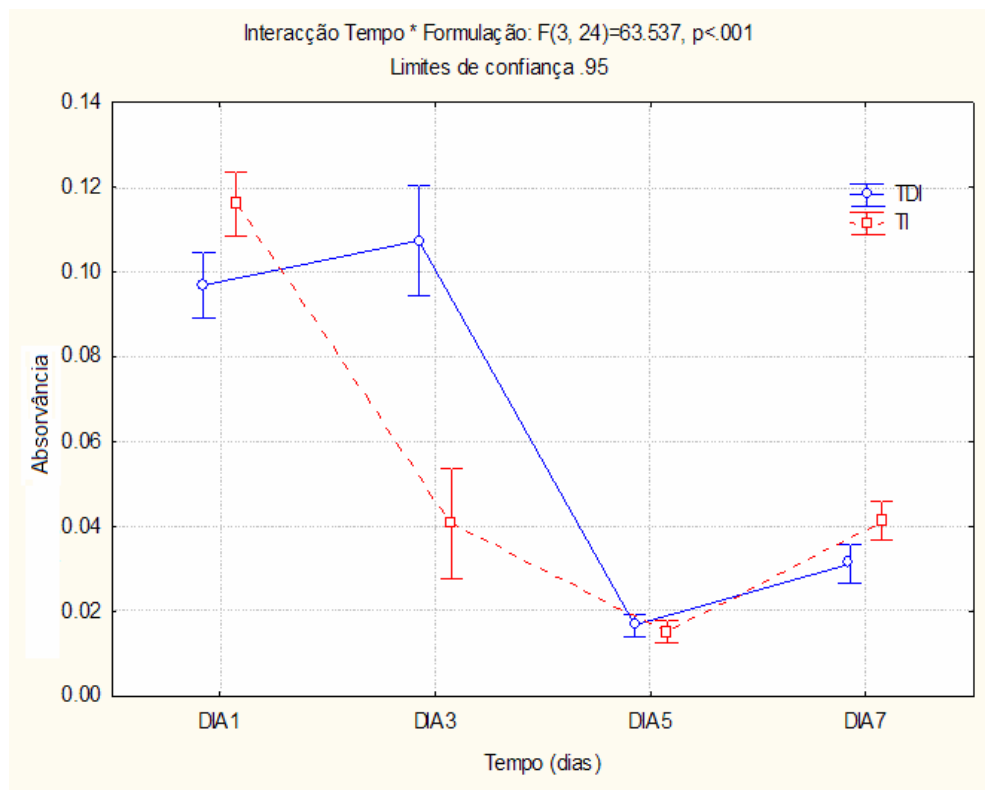


Figura 34 - Valores médios da absorvância e respectivos limites de confiança para a interacção Tempo*Formulação.

4. Discussão e conclusões

Através da análise morfológica verificou-se se a reacção com os três isocianatos utilizados durante o estudo proporciona a formação de microsferas e concluiu-se que apenas para o caso do isocianato HMDI não se observaram microsferas.

Comparando as formulações, com diferentes razões mássicas isocianato/PCL das microsferas de TDI-PCL e TI-PCL, verifica-se que, para ambos os casos, a razão 80/20, apresenta microsferas com formas mais regulares e uma superfície mais lisa do que a 50/50 ou 80/20, o que evidencia a completa evaporação do solvente durante o processo de formação. A superfície das microsferas tem implicações na bioadesão e na libertação de fármaco. Se, por um lado, as micropartículas com superfície mais lisa são menos bioadesivas (Gouvender, 2005), por outro, no que concerne à libertação de fármaco, é o pressuposto ideal para que haja uma uniforme libertação por toda a superfície.

Com base nos resultados da análise granulométrica pode sugerir-se que a melhor razão entre a fase orgânica e a fase aquosa é a de 1:100, o que indica que a redução na razão volume possa estar relacionado com partículas maiores como resultado de agregação destas durante a preparação e aumentar assim a distribuição de tamanhos, ou seja, a baixa razão entre as fases orgânica e aquosa não contribui para a estabilização das partículas poliméricas. Apesar do coeficiente de variação ser elevado (~70 a 100%) é ligeiramente menor nas partículas de TI-PCL, o que sugere que com esta composição química resultem partículas menos polidispersas. A velocidade e, principalmente, a natureza da agitação determinam fortemente o tamanho da partícula. Os resultados mostram que aumentando a velocidade se obtêm partículas menores. Do mesmo modo, o emprego de mais força no tipo de agitação, da magnética ao *homogeneizer*, tem o mesmo efeito. Este resultado pode ser explicado pela elevada eficiência na dispersão da fase polimérica na fase aquosa.

De acordo com os resultados obtidos, as partículas preparadas com TI têm, geralmente, um tamanho ligeiramente menor do que as preparadas com TDI. Como o TI é um isocianato com três grupos NCO (Figura 35), a reacção com a PCL (grupo hidroxilo) deve ser mais extensa, sugerindo que a matriz polimérica (Figura 36) assim obtida deve ser mais compacta, principalmente quando a agitação é mais intensa.

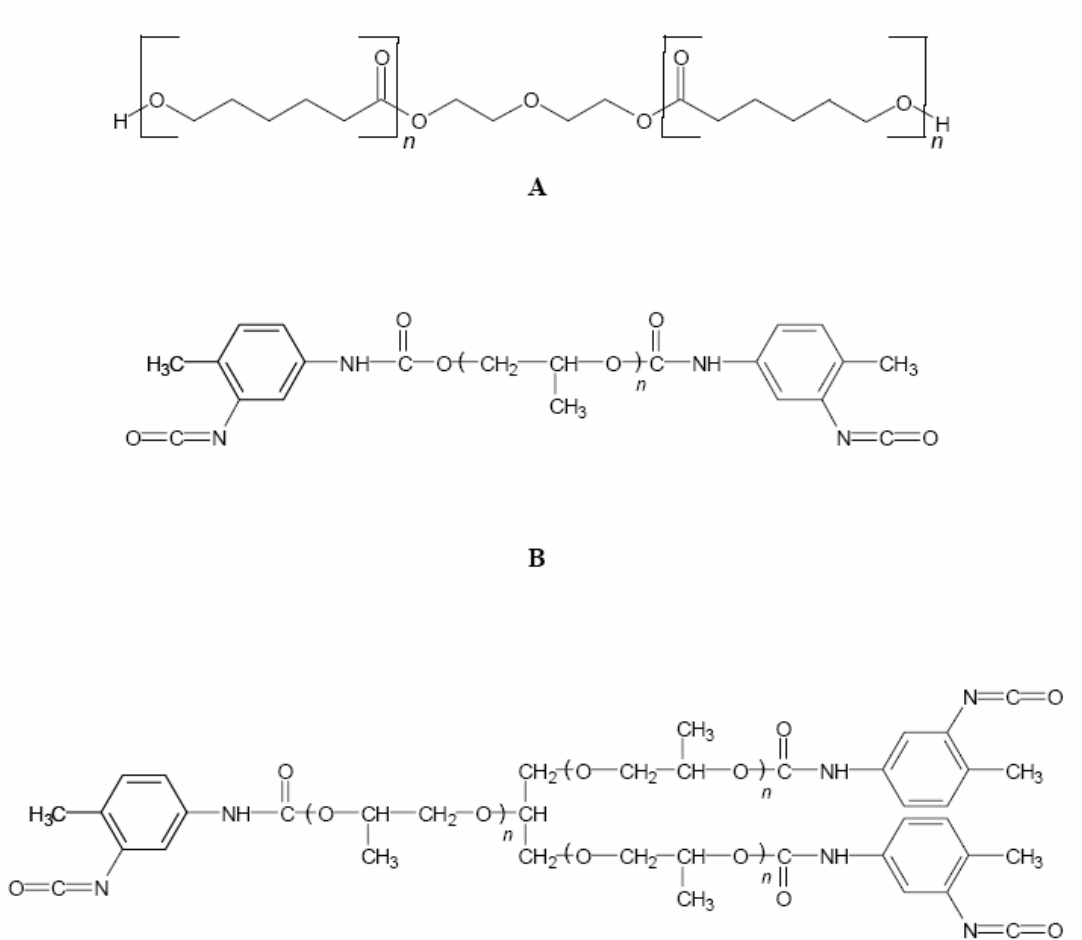


Figura 35 - Estrutura química de PCL (A) (La Gatta *et al.*, 2005), TDI (B) e TI (C) (Queiroz & Norberta de Pinho, 2005).

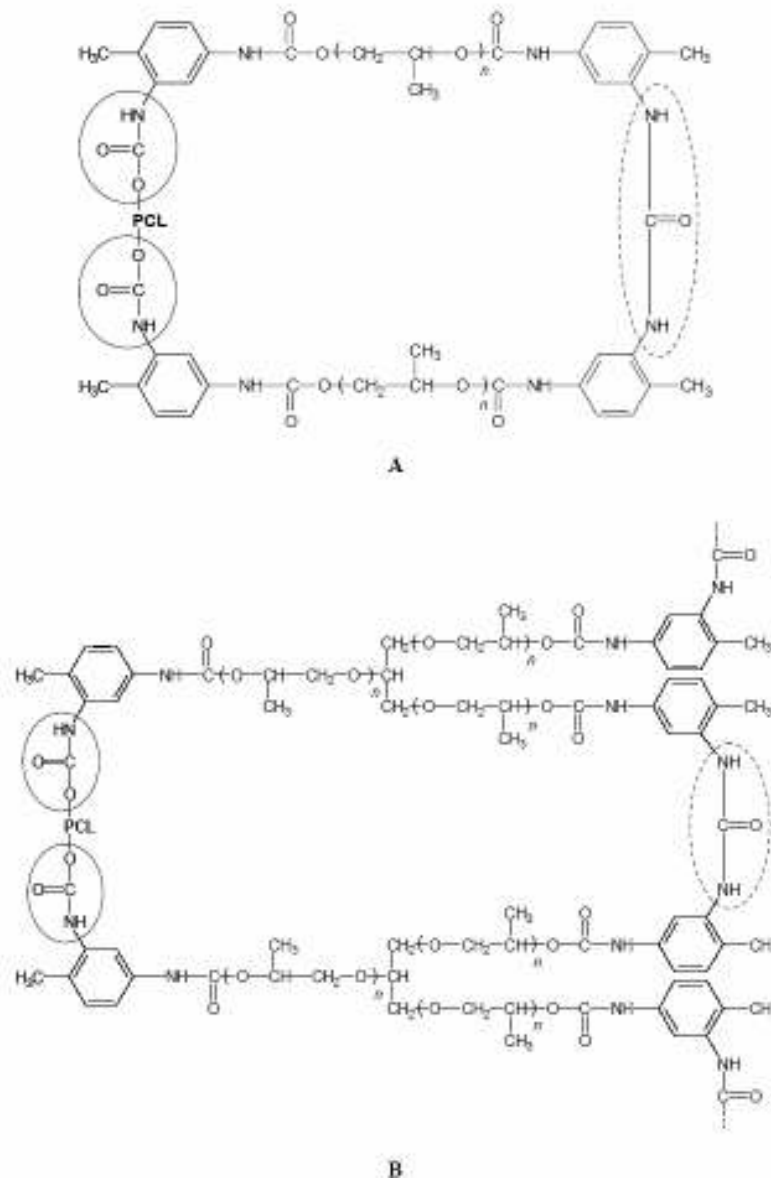


Figura 36 - Estrutura química das micropartículas de TDI-PCL (A) e TI-PCL (B) (adaptado de Queiroz & Norberta de Pinho, 2005), com o grupos uretana marcados a cheio e o grupo ureia marcado a tracejado.

O equipamento usado é muito importante na preparação de partículas com adição gota-a-gota da fase orgânica, uma vez que determina não só o tamanho das micropartículas como também a sua distribuição. Neste estudo, as menores partículas foram obtidas com o *homogeneizer*. Este equipamento aumenta significativamente a turbulência, o que, normalmente, permite uma boa dispersão da fase polimérica na fase contínua. No entanto,

devido ao facto de só existir um no Laboratório e de estar ocupado na altura da produção, optou-se por realizar os restantes ensaios com o agitador mecânico.

A velocidade da agitação é também uma das principais variáveis para controlar o tamanho da micropartículas. Os resultados mostram que o tamanho das micropartículas diminui significativamente com o aumento da velocidade de agitação devido ao facto de haver uma eficiente dispersão das pequenas gotas de solução polimérica.

O facto do tamanho das micropartículas de TDI-PCL aumentar na presença de Tween[®]80 pode ser explicado devido ao baixo peso molecular do TDI, que, possivelmente, aumenta a interacção com o surfactante de elevado peso molecular, levando a que aumente a agregação das micropartículas de TDI-PCL. Por este motivo foi descartado este reagente na preparação das micropartículas.

Assim, as microsferas de TDI-PCL e TI-PCL de razão volúmica 1:100, razão mássica isocianato/PCL de 80/20, preparadas no *homogeneizer* a 1400 rpm sem a adição de Tween[®]80, encontram-se dentro do diâmetro médio indicado para aplicações tópicas oftalmológicas, entre 5 a 10 μm (Zimmer & Kreuter, 1995).

Pela análise química dos espectros de absorção de microsferas de TDI-PCL e TI-PCL, confirma-se que houve reacção devido ao aparecimento do pico de absorção relativo ao grupo uretana $1740\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$ e ao desaparecimento das banda de absorção referente ao grupo hidroxilo ($\sim 3435\text{ cm}^{-1}$) e aos grupos éster internos (Hesse *et al.*, 1997:29-66; Guelcher, Gallagher, Didier, Klinedinst, Doctor, Goldstein, Wilkes, Beckman & Hollinger, 2005).

O melhor espectro de absorção, tanto para as microsferas de TDI-PCL como para as de TI-PCL, corresponde à razão mássica isocianato/PCL 80/20, o que significa que para esta proporção houve a conversão completa dos reagentes. Assim, e tendo em conta os resultados anteriormente discutidos, escolheu-se esta proporção para a continuação do estudo.

Na análise das características térmicas das micropartículas através de um termograma verificou-se que as micropartículas preparadas com razão mássica isocianato/PCL 20/80 apresentavam dois ou mais picos, o que sugere a presença de compostos heterogéneos, o que, por sua vez, é indicador de que a reacção entre o isocianato e a PCL não foi completa. Por outro lado, as razões 50/50 e 80/20 apresentam apenas um pico, o que confirma que se trata de um composto homogéneo, ou seja, existe apenas uma substância presente. Por outro lado, as

microsferas de TI-PCL apresentam valores mais elevados de Tg em relação às de TDI-PCL, o pode ser explicado pelo facto da matriz polimérica ser mais cristalina e/ou rígida devido à sua estrutura química.

A degradação térmica das micropartículas de TDI-PCL e TI-PCL começa, aproximadamente, no intervalo de temperatura entre 346-348°C. A presença do grupo isocianato desloca este intervalo para valores mais elevados relativamente à PCL (243°C). Estes resultados sugerem que estas micropartículas são termicamente mais estáveis do que a PCL.

Com base nos resultados obtidos por análise com o equipamento de potencial Zeta, verifica-se que ambas as microsferas têm potencial Zeta negativo. Isto deve-se ao facto de ambas as matrizes poliméricas apresentarem carga negativa devido à ionização dos grupos carboxilos. As microsferas de TI-PCL têm um valor mais elevado em valor absoluto do potencial Zeta do que as de TDI-PCL, o que é concordante com a sua estrutura química, pois estas cargas negativas representam uma menor percentagem da cadeia total do que as de TDI.

Os valores semelhantes do potencial Zeta em diferentes ensaios referentes a soluções tampão devem-se à alta concentração de sal da solução tampão (Dillen, Mooter & Ludwig, 2006). O valor do potencial Zeta é muito importante nas aplicações biomédicas, por exemplo a fagocitose das micropartículas poliméricas pelos macrófagos é aumentada com o aumento do valor absoluto do potencial Zeta e diminuída para um potencial Zeta à superfície de zero (Li & Tian, 1997:429-458).

A degradação *in vitro* foi realizada em solução PBS a pH=7,4 e a 37°C de modo a melhor simular as condições fisiológicas da superfície ocular. Pela análise dos resultados obtidos verifica-se, tal como já seria de esperar uma vez que se trata de poliuretanas, uma degradação muito lenta em ambas as microsferas (TDI-PCL e TI-PCL), sendo por isso bastante bioestáveis (Heijkants, Calck, Groot, Pennings & Schouten, 2004).

A libertação controlada de fármaco nas primeiras duas horas, tanto para as microsferas de TDI-PCL como para as de TI-PCL, é anómala ($0,5 < n < 1$), o que significa que a libertação do fármaco ocorre não só por difusão mas também devido à degradação do sistema polimérico (Babu, Ramesh, Saïram, Hosani & Aminabhavi, 2006).

Com base nos resultados obtidos nos testes de citotoxicidade verifica-se que a formulação com TI é mais citotóxica que a de TI. Este resultado é facilmente explicado pelo facto de no TI existirem três grupos isocianatos, com conseqüente maior possibilidade de formação de radicais livres do que para TDI, apenas com dois grupos isocianato.

No 3.º dia ocorre a selecção para ambas as formulações, ou seja, é um dia crítico. Neste caso, deve ser o dia máximo indicado para o tratamento oftalmológico, ou seja, o indicado é que sejam administradas de 3 em 3 dias novas gotas com microsferas no olho.

O aumento da absorvância do dia 5 para o dia 7 deve-se, possivelmente, à remoção do meio antigo (com produtos citotóxicos) e adição de novo meio. Com esta mudança as células *stunned* recuperaram e tornaram-se mais activas. No entanto, em ensaios futuras, não é aconselhável a renovação do meio mais cedo, uma vez que estaríamos a adicionar novos erros no procedimento experimental, devido ao facto de ao renovarmos o meio também se terem de adicionar novas microsferas, pois estas estão em suspensão no meio.

A concentração de microsferas teve impacto significativo na absorvância. As células não toleraram bem as altas dosagens de concentração, provocando-lhes a morte, o que é novamente explicado pela elevada formação de radicais livres em relação às menores concentrações. Assim, para uso clínico, aconselha-se o uso da menor concentração (0,5 µl a 0,05 mg/ml, sendo ainda satisfatório o uso de 5 µl).

5. Perspectivas de trabalho futuro

Apesar de se terem atingido os objectivos previamente estabelecidos, os resultados obtidos sugerem a realização de novos ensaios de caracterização.

Assim, no caso da análise da libertação do fármaco, seria interessante realizar novos ensaios com fármacos indicados para o tratamento do glaucoma nos tempos estudados e também durante um período de tempo mais longo.

No que diz respeito aos testes de citotoxicidade seria fundamental a realização de novos ensaios com uma renovação de meio mais frequente, e consequentemente de microsferas, de modo a comparar com os resultados actuais e determinar se o 5º dia é um dia crítico ou não.

Também seria importante a realização de testes de citotoxicidade com microsferas com fármaco incorporado para avaliar realmente o efeito citotóxico deste sistema de libertação de fármaco. Estes testes deveriam ser efectuados, preferencialmente, em triplicado, de modo a garantir a fidelidade dos resultados.

Numa fase posterior, também se poderia proceder a testes *in vivo*, com microsferas com e sem fármaco incorporado, em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus hyplus*) – modelo animal estabelecido internacionalmente para este tipo de estudos em Oftalmologia, para equacionar a progressão ou não para ensaios clínicos.

6. Referências bibliográficas

- Babu, V. Ramesh, Sairam, M., Hosamani, K. & Aminabhavi, T. (Junho 2006). Development of 5-fluorouracil loaded poly(acrylamide-co-methylmethacrylate) novel core-shell microspheres: in vitro release studies. *International Journal of Pharmaceutics*, Elsevier, 325:55-62.
- Batyrbekov, E. O. Rukina, L., Zhubanov, B., Bekmukhamedova, N. & Smailova, Gulnara (Setembro 1997). Drug delivery systems for tuberculosis treatment. *Polymer International*, 43:317-320.
- Boehm, Anne-Laure Le Roy & Fessi, Hatem (2000). Applications pharmaceutiques du potentiel Zeta – intérêt pour la caractérisation des vecteurs colloïdaux. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 55(2):40-48.
- Brett, Christopher M. A. & Brett, Ana M. O. (1996). *Electroquímica - métodos e aplicações*. Coimbra: Livraria Almedina.
- Dillen, K., Vandervoort, J., Mooter, G. & Ludwig, A. (2006). Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit® RS100, *International Journal of Pharmaceutics*, 314(1):72–82.
- Chang, Raymond (1994). *Química*. Amadora: McGraw-Hill Portugal.
- Chemical Land 21 – stronger partner for powerful business (n. d.). Disponível em <http://www.chemicalland21.com/lifescience/phar/FLURBIPROFEN.htm> (consultado em 20 de Junho de 2007).
- Daily Med – Current Medication Information (n. d.) *Flurbiprofen*. Disponível em <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=2385> (consultado em 20 de Junho de 2007).
- Doyle, Alan & Griffiths, J. Bryan (1999). *Cell and Tissue Culture: Laboratories Procedures in Biotechnology*. John Wiley and Sons, Ltd.
- Drugs Information Online (2006). *Flurbiprofen*. Disponível em <http://www.drugs.com/mtm/flurbiprofen.html> (consultado em 20 de Junho de 2007).
- Eye Care – centro oftalmológico (2007). *Glaucoma*. Disponível em <http://www.eyecare.com.br/Glaucoma.aspx> (consultado em 16 de Junho de 2007).
- Fried, Joel R. (1995). *Polymer Science and Technology*. EUA: Prentice Hall PTR.
- Fritsch – equipamento laboratorial (n. d.). Disponível em http://www.fritsch.de/data/prospekte/porto_uebersicht.pdf (consultado em 14 de Junho de 2007).
- Glaucoma Service Foundation to Prevent Blindness (2007). Disponível em <http://www.wills-glaucoma.org> (consultado em 16 de Junho de 2007).
- Guelcher, S., Gallagher, K., Didier, J., Klinedinst, D., Doctor, J., Goldsteind, A., Wilkes, G., Beckman, E. & Hollinger, J. (2005). Synthesis of biocompatible segmented polyurethanes from aliphatic diisocyanates and diurea diol chain extenders. *Acta Biomaterialia*, 1:471-484.
- Guyton, A. C. & Hall, J. E. (2002). *Textbook of Medical Physiology*. EUA: W. B. Saunders.
- Heijkants, R., Calck, R., Groot, J., Pennings, A. & Schouten, A. (2004). *Degradation of 1,4-butanediisocyanate and poly(ε-caprolactone) based polyurethanes. Part I: influence of soft segment length*. Dissertação não publicada. Groningen: Universiteitsbibliotheek Groningen.
- Hesse, M. *et al.* (1997). *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. EUA: Georg Thieme Verlag Stuttgart, 29-66.

Preparação e caracterização de microsferas para libertação controlada de fármacos em Oftalmologia

Infarmed (n. d.). *Prontuário terapêutico*. Disponível em <http://www.infarmed.pt/prontuario/framepesactivos.php?palavra=Flurbiprofen> (consultado em 20 de Junho de 2007).

Jameela, S. R. & Jayakrishnan, A. (1995). Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vivo degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials*, 16:769-775.

Kawaguchi, H. (Outubro 2000). Functional polymer microspheres. *Progress in Polymer Science*, 25(8): 1171-1210.

Kemp, R. B. (n.d.). *LS-L292 Cytotoxicity test*. Disponível em: <http://www.ib.amwaw.edu.pl/invittox/prot/38.htm> (consultado em 29 de Junho de 2007).

Kweon, D., Cha, D.S., Park, H.J. & Lim, S.T. (Agosto 2000). Starch-g-polycaprolactone copolymerization using diisocyanate intermediates and thermal characteristics of the copolymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 78(5):986-993.

Li, L.C & Tian, Y. (1997). *Zeta potential*. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Nova Iorque, Marcel Dekker Inc.

Liu, Y., Peterson, D., Kimura, H. & Schubert, D. (Agosto 1997). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction, *Journal of Neurochemistry*, 69(2):581-593.

Ludwig, A. (Novembro 2005). The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11):1595-1639.

McMurry, Jonh (2000). *Organic Chemistry*. EUA: Thomson LearningTm.

Melnig, V., Apostu, M.O, Tura, V. & Ciobanu, C. (Dezembro 2005). Optimization of polyurethane membranes: morphology and structure studies. *Journal of Membrane Science*, 267(1,2):58-67.

Melo, J. Sérgio Seixas *et al.* (2004). *Química dos polímeros*. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.

Mosmann, T. (Dezembro 1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to Proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1,2):55-63.

Oficina Ciência Viva (n. d.). Disponível em <http://oficina.cienciaviva.pt/~piv172/PDFs/Acetatos%20n%BA20-21.pdf> (consultado em 13 de Junho de 2007).

Oliveira, J. M., Xavier, J.C, Morais, J. L., Nóvoa, P., Lousadas, J. L. & Marques, A. (2001). *Caracterização da transição vítrea da madeira Pinus Pinaster Ait.* Disponível em <http://home.utad.pt/~jmcx/pdf/Oliveira2001.pdf> (consultado em 20 de Maio de 2007).

Patil, G.V. (Abril 2003). Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery. *Drug Development Research*, 58(3):219-247.

Ritger, P. L. e Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices, *Journal of Controlled Release* 5(1):37-42.

Sandler, S. *et al.* (1998). *Polymer Synthesis and Characterization*. Nova Iorque: Academic Press.

Schnabel, W. (1992). *Polymer degradation – principles and practical applications*. Oxford: Hanser, 179-184.

Preparação e caracterização de microsferas para libertação controlada de fármacos em Oftalmologia

Silverthorn, Dee Unglaub (2003). *Human physiology: an intergrated approach*. São Francisco: Benjamin-Cummings Pub. Co..

Stevens, Malcon P. (1999). *Polymer chemistry – an introduction*. Nova Iorque: Academic Press.

Swarbrick, James & Boylan, James C. (1997). *Unit processes in pharmacy: the operations to Zeta potencial*, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Marcel Dekker.

Thomas A. Luckenbach (n. d.). *DMTA: Dynamic Mechanical Thermal Analysis*. Disponível em <http://www.sealseastern.com/PDF/DynamicMechThermalAnal.pdf> (consultado em 20 de Maio de 2007).

Universidade da Virgínia (n. d.). Disponível em http://keats.admin.virginia.edu/chem222/lecture_notes/chem222_Notes_4.html (consultado em 15 de Abril de 2007).

Wikipédia – a encicliopédia livre (2007). *Macrófago*. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Macr%C3%B3fago> (consultado em 12 de Junho de 2007).

Wikipédia – a encicliopédia livre (2007). *Microscópio electrónico*. Disponível em http://pt.wikipedia.org/wiki/Microsc%C3%B3pio_eletr%C3%B4nico (consultado em 13 de Junho de 2007).

Zimmer, A. & Kreuter, J. (1995). Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16:61-73.

7. Anexos

A. MO

Microsferas formuladas com razão volúmica fase orgânica/fase aquosa de 1:50, razão mássica isocianato/PCL de 80/20 e com agitador mecânico a 1400 rpm.

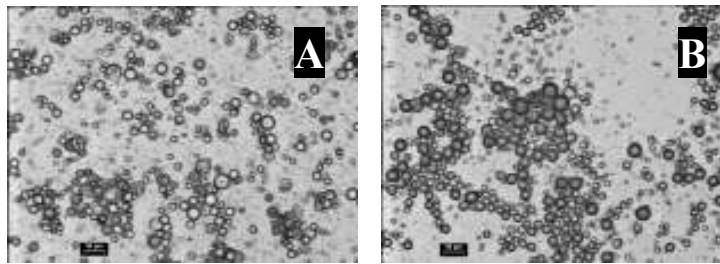


Figura 37 - Visualização microscópica das microsferas de TDI-PCL (A) e TI-PCL (B) (ampliação 10×).

Microsferas formuladas com razão volúmica fase orgânica/ fase aquosa de 1:100, razão mássica isocianato/PCL de 80/20 e com agitador mecânico a 1400 rpm.

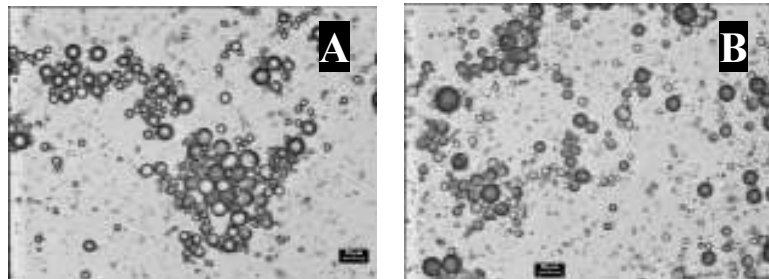


Figura 38 - Visualização microscópica das microsferas de TDI-PCL (A) e TI-PCL (B) (ampliação 10×).

Microsferas formuladas com razão volúmica fase orgânica/ fase aquosa de 1:50, razão mássica isocianato/PCL de 80/20 e com *homogeneizer* a 1600 rpm.

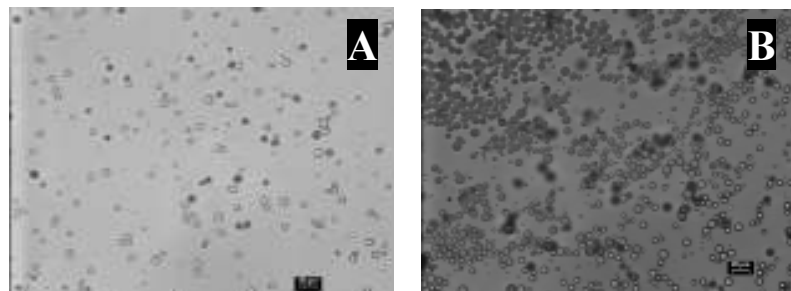


Figura 39 - Visualização microscópica das microsferas de TDI-PCL (A) e TI-PCL (B) (ampliação 10×).

Microsferas formuladas com razão volúmica fase orgânica/ fase aquosa de 1:100, razão mássica isocianato/PCL de 80/20 e com *homogeneizer* a 1600 rpm.

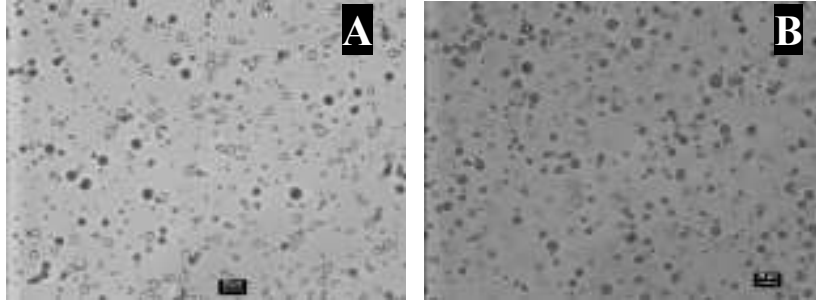


Figura 40 - Visualização microscópica das microsferas de TDI-PCL (A) e TI-PCL (B) (ampliação 10×).

B. Testes de citotoxicidade

Dia 1

TDI

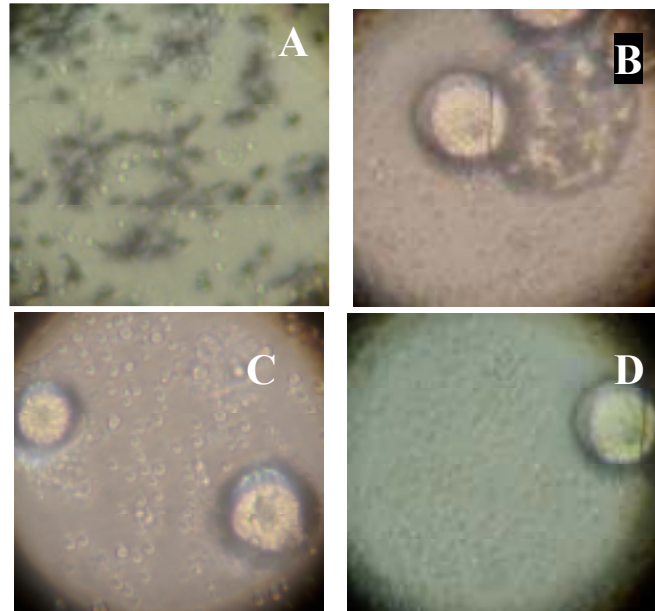


Figura 41 - Visualização microscópica dos macrófagos após 1 dia de contacto com as microsferas de TDI-PCL e depois da adição de MTT. [Controlo (A), 30 µl (B), 5 µl (C) e 0,5 µl (D)].

TI

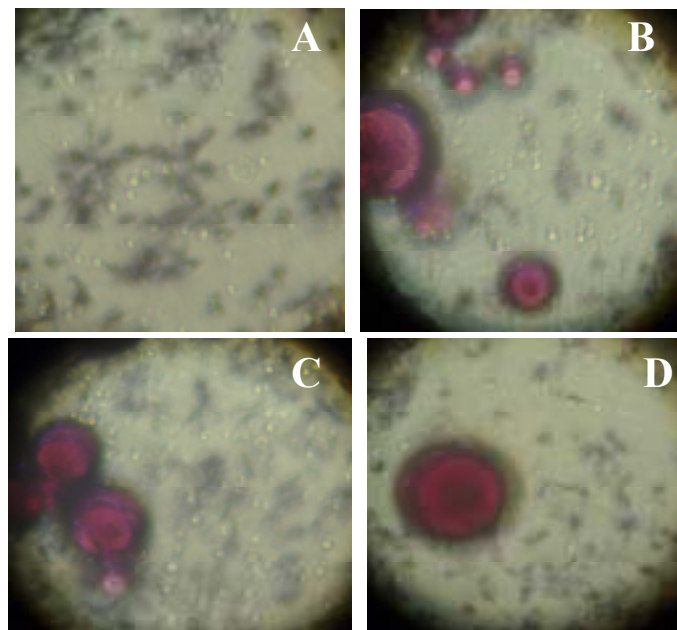


Figura 42 - Visualização microscópica dos macrófagos após 1 dia de contacto com as microsferas de TI-PCL e depois da adição de MTT. [Controlo (A), 30 µl (B), 5 µl (C) e 0,5 µl (D)].

Dia 3

TDI

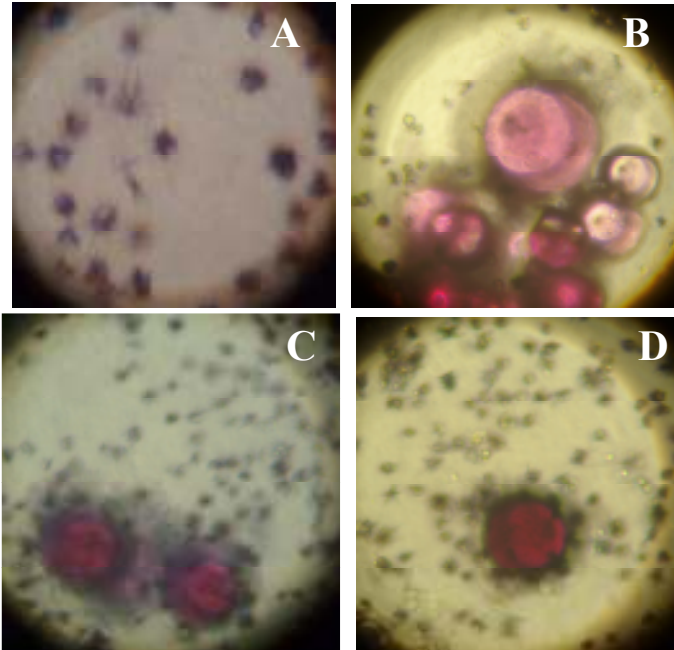


Figura 43 - Visualização microscópica dos macrófagos após 3 dias de contacto com as microsferas de TDI-PCL e depois da adição de MTT. [Controlo (A), 30 µl (B), 5 µl (C) e 0,5 µl (D)].

TI

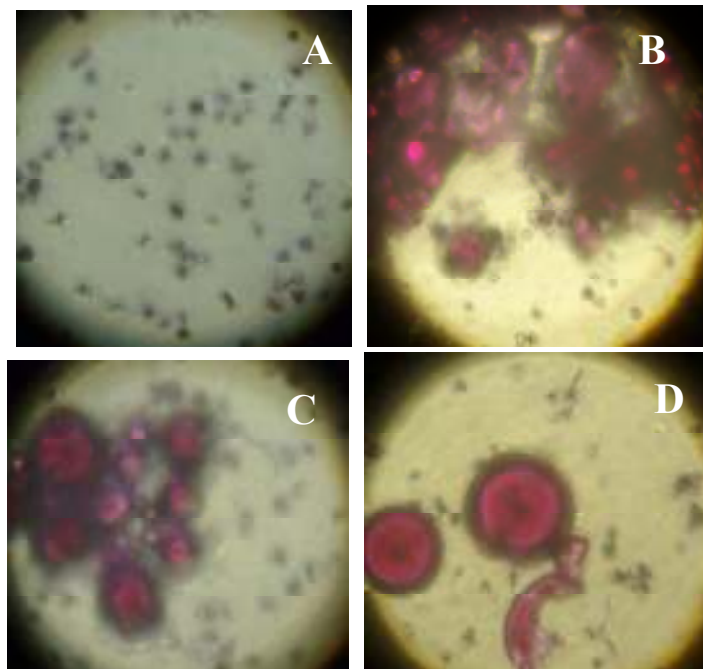


Figura 44 - Visualização microscópica dos macrófagos após 3 dias de contacto com as microsferas de TI-PCL e depois da adição de MTT. [Controlo (A), 30 µl (B), 5 µl (C) e 0,5 µl (D)].

Dia 5

TDI

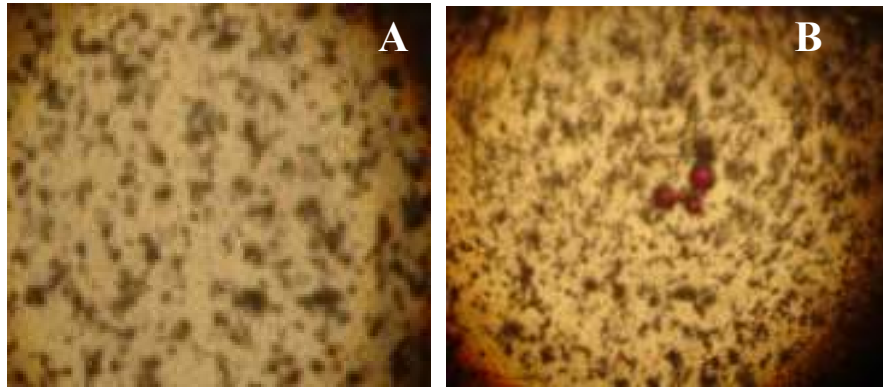


Figura 45 - Visualização microscópica dos macrófagos após 5 dias de contacto com as microsferas de TDI-PCL e depois da adição de MTT. [Controlo (A) e 0,5 µl (B)].

TDI

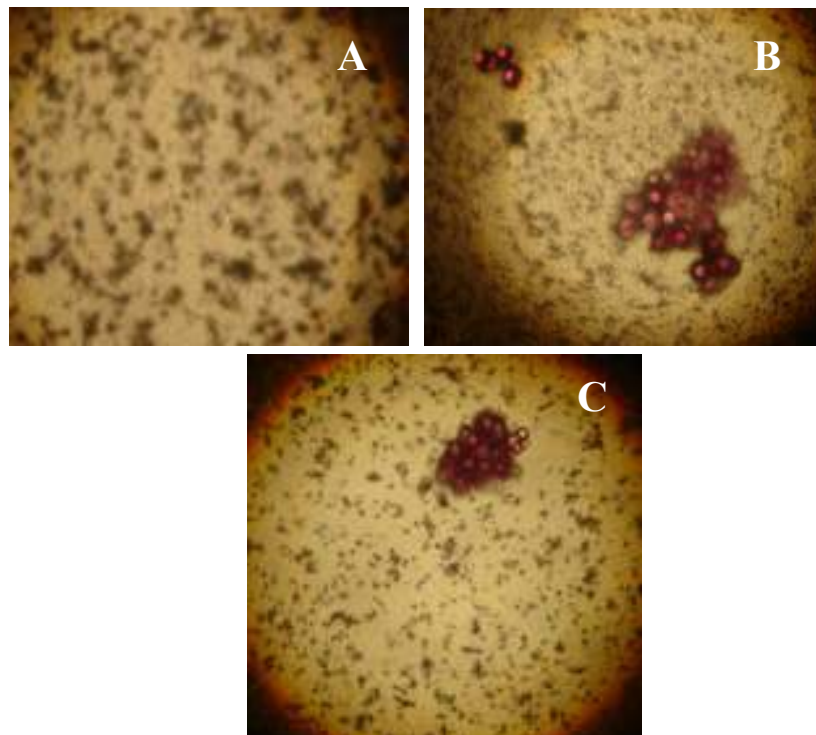


Figura 46 - Visualização microscópica dos macrófagos após 5 dias de contacto com as microsferas de TI-PCL e depois da adição de MTT. [Controlo (A), 5 µl e 0,5 µl (B)].

Dia 7

TDI

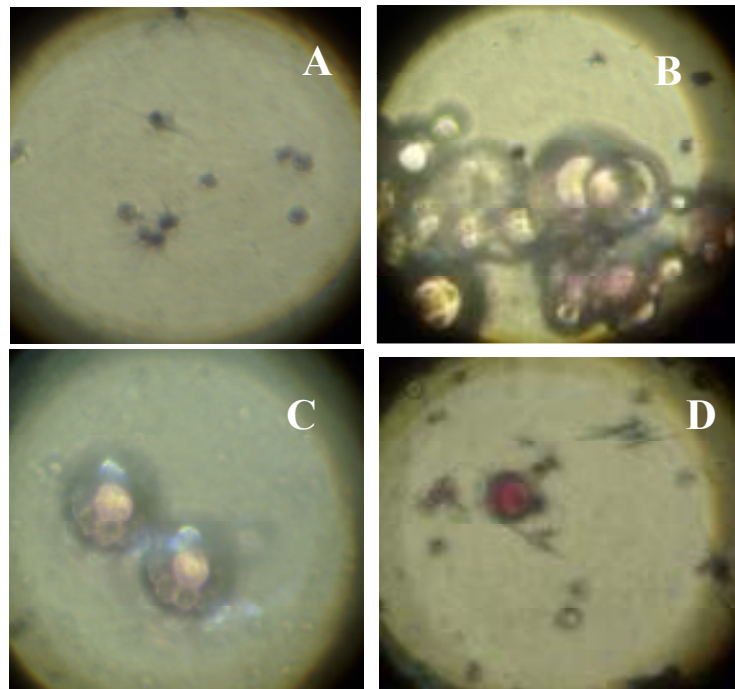


Figura 47 - Visualização microscópica dos macrófagos após 7 dias de contacto com as microsferas de TI-PCL e depois da adição de MTT. [Controlo (A), 30 μ l (B), 5 μ l (C) e 0,5 μ l (D)].

TI

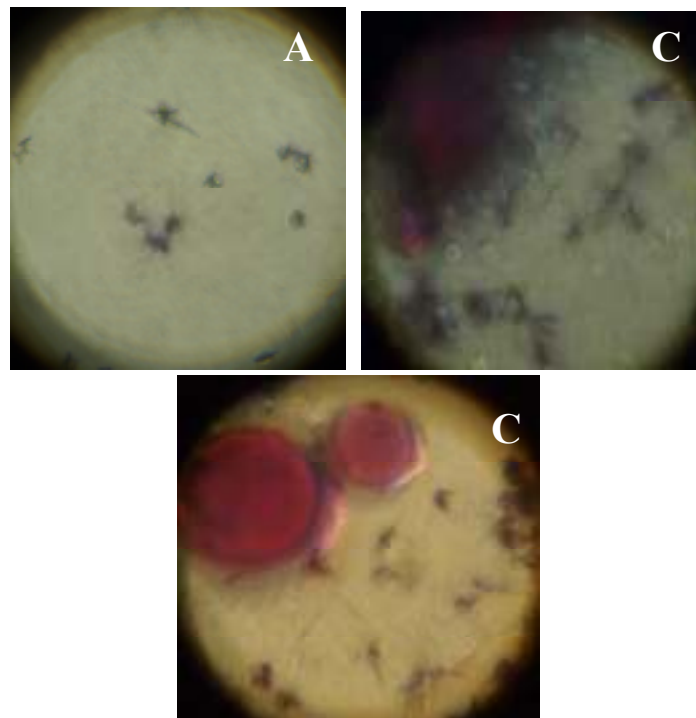


Figura 48 - Visualização microscópica dos macrófagos após 7 dias de contacto com as microsferas de TI-PCL e depois da adição de MTT. [Controlo (A), 30 μ l (B) e 5 μ l (C)].