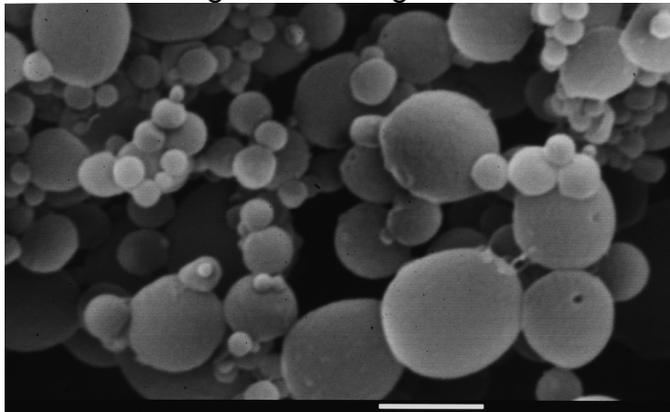


Preparação de nanopartículas para sistemas de libertação controlada de substâncias activas usadas no tratamento de doenças oftalmológicas

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica



Florabela da Silva Rouxinol

Coimbra, Setembro de 2009

Florbela da Silva Rouxinol

**Preparação de nanopartículas para
sistemas de libertação controlada
de substâncias activas
usadas no tratamento de
doenças oftalmológicas**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA NA DISCIPLINA DE PROJECTO DO PLANO DE ESTUDOS DO MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA, PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Departamento de Física da Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade de Coimbra

Coimbra, Setembro de 2009

Às minhas filhas...

Agradecimentos

Foram muitas as pessoas que, directa ou indirectamente e das mais variadas formas, tornaram este trabalho possível.

Em primeiro lugar manifesto o meu sincero agradecimento à Professora Doutora Maria Helena Gil por ter confiado na minha capacidade de trabalho, desde o primeiro ao último dia. Teve sempre uma palavra amiga e uma enorme disponibilidade. A sua simplicidade, a sua competência, a sua generosidade, tornaram-se pontos de referência para mim. Foi, indubitavelmente, um privilégio trabalhar com ela.

Faço também um agradecimento muito especial ao Professor Doutor. Jorge Coelho pelo seu total apoio e incentivo. O optimismo que o caracteriza tornou-se essencial nos momentos mais difíceis. Mostrou-se sempre atento e disponível a qualquer esclarecimento.

Agradeço à Professora Doutora Ana Cristina Santos do Instituto de Biofísica e Biomatemática do Instituto de Investigação Biomédica em Luz e Imagem que aceitou o meu pedido para a realização dos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular, tendo dispensado muito do seu precioso tempo. O meu muito obrigada à Cláudia Matos que colaborou activamente na realização destes ensaios. Às duas manifesto o meu apreço pela enorme disponibilidade, dedicação e paciência que tiveram comigo.

À Mestre Bárbara Oliveiros que me ajudou na elaboração de toda a parte de estatística dos estudos *in vitro*.

Um agradecimento ao Eng^o Vítor Redondo, do LabGran – Instituto Pedro Nunes, pela forma como se disponibilizou para fazer as análises granulométricas ao microscópio óptico.

Uma palavra de apreço à equipa da Bluepharma que permitiu que fossem feitas todas as análises de determinação da distribuição dos tamanhos das partículas.

Um enorme e sincero agradecimento à Paula pela sua ajuda preciosa e palavra amiga. Acompanhou-me e apoiou-me nas diferentes fases do trabalho, dando-me aquele “empurrão” no momento em que eu mais precisei. Dificilmente poderei vir a retribuir tudo aquilo que fez por mim. Fica a minha grande amizade.

Agradeço ainda ao restante grupo de trabalho e colegas de laboratório por me terem acolhido com muita simpatia.

Ao apoio e amizade dos meus irmãos, especialmente à Milena que me ajudou na parte final desta tese, em algumas configurações e aspectos formais. Com ela partilhei muitas tristezas e alegrias. Obrigada mana.

Agradeço imenso à minha avó que cuidava das minhas filhas para eu poder trabalhar.

O meu muito obrigada aos meus pais, por tudo aquilo que sou, pelo seu apoio incondicional, por me terem ouvido nos momentos de maior *stress*. Obrigada mãe, pelo apoio que prestaste à Ritinha, na minha ausência. Obrigada pai, pela atenção e dedicação que deste à Carolina. Ficar-vos-ei eternamente grata por me ajudarem na concretização deste trabalho, que sabiam ser um dos meus objectivos.

Obrigada a TODOS!

Resumo

Este trabalho teve como objectivo fundamental produzir sistemas de libertação controlada de substâncias activas no tratamento de doenças oftalmológicas, incidindo na degeneração macular relacionada com a idade (DMRI), na retinopatia diabética (RD) e em infecções relacionadas com situações pós-operatórias.

Em Oftalmologia distinguem-se doenças da região posterior do olho e da região anterior, sendo a RD e a DMRI da zona posterior pelo que para o seu tratamento é necessária uma administração intravítrea. Estas patologias provocam diminuição da acuidade visual, podendo mesmo levar à perda total de visão. No que diz respeito ao segmento anterior do olho são usadas, de um modo geral, gotas para aplicação tópica.

Os fármacos até agora usados nem sempre actuam na dose terapêutica adequada, nem num intervalo de tempo satisfatório de forma a evitar as sucessivas aplicações. No sentido de resolver problemas de sobre ou subdosagem ou de reduzir o elevado número de aplicações (tópicas ou intravítreas), desenvolveram-se alguns sistemas de libertação controlada de fármacos.

Neste trabalho escolheu-se o poli(ácido-láctico) (PLA) como suporte para imobilização do fármaco. Este polímero é não-tóxico, não causa reacções adversas e é biodegradável após a libertação da substância activa. É fundamental que o polímero seja resistente à degradação no meio extracelular, de modo a preservar o seu conteúdo, no entanto, deve promover a sua libertação gradual e o respectivo *uptake* pelas células alvo. Como substâncias activas foram escolhidas a vancomicina, que é um antibiótico, e o Avastin[®], que é um anticorpo.

As nanopartículas de PLA foram sintetizadas por um método de emulsão simples e dupla. Fez-se a caracterização morfológica e a distribuição por tamanhos, além do estudo de outras propriedades físicas e químicas. Posteriormente, procedeu-se ao encapsulamento do Avastin[®] e da vancomicina, tendo-se avaliado a eficiência de encapsulamento/imobilização. Fizeram-se estudos de libertação controlada *in vitro* dos fármacos encapsulados usando uma solução de PBS.

Constatou-se que as nanopartículas apresentavam forma esférica e a distribuição de tamanhos sugeriu que as partículas com fármaco encapsulado eram maiores do que as vazias. A eficiência de encapsulamento apresentou valores acima dos 95%.

Verificou-se ainda que o Avastin[®] não sofreu qualquer libertação mensurável *in vitro*, num período de tempo satisfatório.

Os testes de citotoxicidade e viabilidade celular, efectuados nas condições experimentais estudadas, revelaram que o Avastin[®] livre poderá tornar-se citotóxico ao longo do tempo, no entanto, quando encapsulado nas nanopartículas, registaram-se valores de absorvância elevados. Estes resultados sugerem que embora possa ter havido alguma degradação do PLA por parte dos macrófagos esta possibilitou a difusão do fármaco em quantidades não citotóxicas para as células.

A vancomicina apresentou uma taxa de libertação bastante satisfatória *in vitro*, pelo que o número de administrações de injeções intravítreas administradas poderá diminuir. Este fármaco não se revelou citotóxico para macrófagos.

Abstract

The purpose of this work was to develop new drug delivery systems of active substances used in the treatment of ophthalmologic diseases, particularly in age related macular degeneration (AMD), diabetic retinopathy (DR) and post-surgery infections.

The eye is divided in two areas: posterior and anterior segment. DR and AMD are pathologies of the posterior segment being necessary intravitreal injections administration for their treatment; these diseases can cause a decrease of visual acuity or even total vision loss. Concerning the anterior segment treatment, usually topical application of drops is used.

The main problem about these kind of treatment is that the used drugs are not always maintained in the adequate therapeutic dose or need to be repeatedly applied in short time intervals. To overcome under or over dosage or to reduce the number of applications (topical or intravitreal), some controlled delivery systems began to be developed.

In order to obtain such a delivery system the poly(lactic acid)(PLA) was chosen as support to immobilize the drug. This polymer is non-toxic, does not cause adverse reactions and is biodegradable after releasing the active substance. It is essential that the polymer is resistant to extracellular degradation, in order to preserve its contents, however, it should promote a steady drug release and its uptake by the target cells. As active substances, vancomycin, an antibiotic, and Avastin[®], an antibody, were chosen.

PLA nanoparticles were prepared by a simple and double emulsion method. They were morphologically characterized, their size distribution and other physical and chemical properties were also studied. Subsequently, Avastin[®] and vancomycin were encapsulated by them, being the effectiveness of encapsulation/immobilization assessed. Controlled release studies of the encapsulated drugs were performed in vitro, using a PBS solution.

The nanoparticles showed a spheroid shape and their size distribution indicated that when they encapsulated drugs they were larger than when they were empty. The encapsulation efficiency showed values above 95%.

It was also observed that Avastin[®] did not suffer any measurable release during a satisfactory period of time.

Tests for cytotoxicity and viability cellular showed that the Avastin[®] free may become cytotoxic over time, however, when encapsulated in nanoparticles, was obtained high absorbance values. These results suggest that may have been PLA degradation by macrophages that enabled the diffusion of drug at non-cytotoxic quantities for the body.

The vancomycin presented a very satisfactory liberation rate at which the number of intravitreal injections administrations may decrease. This drug is not cytotoxic for the body.

Índice

<i>Agradecimentos</i>	<i>ii</i>
<i>Resumo</i>	<i>iv</i>
<i>Índice</i>	<i>viii</i>
<i>Lista de Abreviaturas</i>	<i>x</i>
<i>Índice de figuras</i>	<i>xi</i>
<i>Índice de tabelas</i>	<i>xiii</i>
<i>Índice de quadros</i>	<i>xiv</i>
<i>Índice de gráficos</i>	<i>xv</i>
<i>Objectivos</i>	<i>xvi</i>
<i>Introdução</i>	<i>1</i>
1. Enquadramento e Apresentação da Dissertação	2
2. Organização do Projecto	3
<i>Capítulo I – Estado da Arte</i>	<i>5</i>
1. O Olho - Anatomia e Fisiologia	1
2. Biomateriais	8
3. Sistemas de libertação controlada	10
3.1. Métodos físicos	14
3.2. Métodos químicos	16
4. Material polimérico	17
5. Micro e nanopartículas	18
6. Produção de micro/nanopartículas	20
7. Algumas doenças oftalmológicas	25
7.1. Degenerescência Macular Relacionada com a Idade (DMRI)	25
7.2. Retinopatia Diabética (RD)	27
7.3. Cataratas	29
7.4. Endoftalmite	29
8. Estudos de Citotoxicidade e Viabilidade celular	30
8.1. Macrófagos	31
8.2. Modelo Experimental	32
8.3. Teste do <i>Trypan Blue</i>	32
8.4. Teste do MTT	32
9. Técnicas de caracterização	33
9.1. Microscopia Electrónica de Varrimento	33
9.2. Microscopia óptica	34
9.3. Difracção <i>laser</i> – <i>Laser Diffraction Spectrometry (LDS)</i>	34
9.4. Análise dinâmica termomecânica	34
<i>Capítulo II – Materiais e Métodos</i>	<i>38</i>
1. Materiais e equipamentos	39

1.1. Reagentes utilizados _____	39
1.2. Substâncias Activas _____	40
1.3. Equipamentos _____	43
1.4. Material _____	44
2. Preparação dos sistemas de libertação controlada _____	44
2.1. Preparação das nanopartículas _____	44
2.2. Encapsulamento das substâncias activas nas partículas: procedimento geral _____	47
2.3. Estudos de libertação controlada _____	50
2.4. Modificação da superfície de PLA _____	53
3. Caracterização das partículas _____	56
3.1. Microscopia óptica _____	56
3.2. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) _____	56
3.3. Difracção <i>laser</i> _____	56
3.4. Análise dinâmica termomecânica – DMTA _____	56
4. Estudos de Citotoxicidade e Viabilidade celular _____	57
4.1. Protocolo para colheita, isolamento e “cultura” para macrófagos peritoneais de rato <i>Wistar</i> - 57	
-	
4.2. Testes de viabilidade celular e citotoxicidade para macrófagos peritoneais de rato <i>Wistar</i> ____	59
Capítulo III – Resultados e Discussão _____	66
1. Caracterização das partículas _____	67
1.1. Microscopia óptica _____	67
1.2. Distribuição dos tamanhos de partícula _____	68
1.3. Microscopia Electrónica de Varrimento _____	75
1.4. DMTA _____	77
2. Estudos de libertação controlada _____	78
2.1. Eficiência de encapsulamento e <i>drug loading</i> _____	77
2.2. Estudo da cinética de libertação das substâncias activas _____	80
3. Modificação da superfície de PLA _____	83
3.1. Quantificação dos grupos carboxílicos _____	83
3.2. Ligação covalente de uma proteína às micro/nanoesferas _____	84
4. Estudos de citotoxicidade viabilidade celular _____	85
Conclusões e Trabalho Futuro _____	95
1. Conclusões _____	96
2. Trabalho futuro _____	98
Referências Bibliográficas _____	100
Anexos _____	107
Anexo 1 _____	108
Anexo 2 _____	110
Anexo 3 _____	110
Anexo 4 _____	112
Anexo 5 _____	113
Anexo 6 _____	114
Anexo 7 _____	115

Lista de Abreviaturas

- BSA – Albumina bovina sérica
- CDI – *N*-Ciclohexil-*N'*-(2-morfolinoetil) carbodiimida meto-*p*-toluenesulfonato
- CHCl₃ – Clorofórmio (triclorometano)
- DEQ – Departamento de Engenharia Química
- DMRI – Degeneração macular relacionada com a idade
- DMTA – Análise mecânica termodinâmica
- DSC – Calorimetria diferencial de varrimento
- FCS – Soro fetal bovino
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FMUC – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
- HCl – Ácido clorídrico
- IBB – Instituto de Biofísica e Biomatemática
- IBILI – Instituto Biomédico de Investigação da Luz e Imagem
- IPN – Instituto Pedro Nunes
- LDS – Laser Diffraction Spectrometry
- MOCF – Microscópio óptico de contraste de fase
- MTT – Brometo de 3 – (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio
- NaOH – Hidróxido de sódio
- PBS – *Phosphate Buffered Saline*
- PCL – Poli(caprolactona)
- PLA – Poli(ácido láctico)
- PLA-com – Poli(ácido láctico) comercial
- PLA-lab – Poli(ácido láctico) sintetizado no DEQ
- PLA- γ HB – Poli(ácido láctico hidroxibutirolactona)
- PLGA – Poli(ácido láctico co-glicólico)
- PGA – Poli(ácido glicólico)
- PMMA – Poli (metacrilato de metilo)
- PSD – *Particle Size Distribution*
- RD – Retinopatia diabética
- PVA – Poli (álcool vinílico)
- RPMI – Roswell Park Memorial Institute
- SEM – Microscopia Electrónica de Varrimento
- UV – Ultravioleta
- VEGF –Factor de crescimento de vascularização endotelial

Índice de figuras

- Fig.1 – Anatomia do olho
- Fig. 2 – Comportamento da quantidade de um fármaco no organismo em três situações distintas de administração.
- Fig.3 – Esquematização das principais formas de imobilização de substâncias activas.
- Fig. 4 – Representação do processo de imobilização por oclusão.
- Fig.5 – Representação esquemática de métodos químicos para imobilização de fármacos (ligação iónica e covalente).
- Fig.6 – Representação da estrutura do ácido láctico.
- Fig. 7 – Reacção de polimerização por condensação do poli (ácido láctico).
- Fig. 8 – Esquemas que evidenciam as diferenças morfológicas entre as nanoesferas e as nanocápsulas.
- Fig.9 – Produção de nanopartículas usando a técnica de *spray drying*.
- Fig.10 – Visualização esquemática do equipamento para a produção de micro/nanopartículas utilizando a técnica de fluidos supercríticos.
- Fig. 11 – Produção de micro/nanoesferas por emulsão.
- Fig. 12 – Representação esquemática de uma dupla emulsão W/O/W.
- Fig. 13 – Imagens obtidas com um exame ao “fundo do olho” que permite a observação da retina num olho normal e numa retina com diabetes.
- Fig. 14 – Aspecto do olho com endoftalmite.
- Fig. 15 – Macrófagos de rato observado ao Microscópio Óptico de Contraste de Fase.
- Fig. 16 – Ilustração dinâmica stress/strain.
- Fig. 17 – Relação entre o coeficiente elástico e o coeficiente viscoso.
- Fig. 18 – Estrutura molecular da vancomicina.
- Fig. 19 – Espectro de absorção da vancomicina.
- Fig. 20 – Diagrama esquemático da preparação de partículas utilizando o método da dupla emulsão (W/O/W).
- Fig. 21 – Reacção entre os grupos carboxílicos das partículas de PLA e os grupos amínicos da proteína.

- Fig. 22 – Fotografias do procedimento para: injeção de PBS (A), massagem abdominal (B) e colheita de macrófagos peritoneais (C).
- Fig. 23 – Visualização de macrófagos no MOCF dispostos na câmara de *Neubauer*.
- Fig. 24 – Colocação das soluções de nanopartículas em contacto com os macrófagos.
- Fig. 25 – Esquema da distribuição das amostras nas caixas de cultura de 96 poços, para a vancomicina para o 1dia/3dias/5dias.
- Fig. 26 – Aplicação do MTT aos poços contendo macrófagos.
- Fig. 27 – Visualização das partículas de PLA1 e PLA2, por microscopia óptica.
- Fig. 28 – Imagens obtidas por SEM com a ampliação de 20 000x e a 35 000x para partículas de PLA com e PLA-lab.
- Fig- 29 – Imagens obtidas por SEM com a ampliação de 20000x e a 35 000x pra as partículas de PLA-lab, PLA_A e PLA_V.
- Fig. 30 – Espectro de absorção do PLA-lab.
- Fig. 31 – PLA encapsulando Avastin[®], dissolvido em clorofórmio (A), adição de PBS (B) e Teste de *Bradford* (C).
- Fig. 32 – Visualização microscópica dos macrófagos antes e após o teste do MTT.
- Fig. 33 – MicroElisa SLT.
- Fig.34 – Curva de calibração da vancomicina em lágrimas artificiais.
- Fig. 35 – Curva de calibração para a BSA, quantificada com o reagente de *Bradford*.
- Fig. 36 – Curva de calibração para a vancomicina em PBS.

Índice de tabelas

Tabela 1 - As várias classes de Biomateriais: exemplos, vantagens, desvantagens e aplicações.

Tabela 2 - Resumo das várias preparações de partículas de PLA.

Tabela 3 - Resumo da preparação de partículas de PLA-lab com ultrassonificador.

Tabela 4 - Procedimentos testados para encapsulamento da BSA nas partículas de PLA.

Tabela 5- Procedimentos testados para encapsulamento da vancomicina nas partículas de PLA-lab.

Tabela 6- Procedimentos testados para encapsulamento da Avastin® nas partículas de PLA-lab.

Tabela 7 – Massa de nanoesferas depois de liofilizadas.

Tabela 8 – Taxa de libertação controlada para dois ensaios de vancomicina.

Tabela 9 - Registo das massas de quatro amostras de PLA, do volume da HCl gasto na titulação, a quantidade química de grupos carboxílicos à superfície das partículas e a mesma quantidade por massa de partículas.

Tabela 10 – Massa das amostras após titulação.

Tabela 11: Resumo das várias preparações preparação das partículas de PLGA, onde se fez variar as concentrações da fase orgânica, as concentrações da fase aquosa e a velocidade de rotação.

Tabela 12: Resumo das várias preparações preparação das partículas de PLA- γ HB, onde se fez variar as concentrações da fase orgânica, as concentrações da fase aquosa e a velocidade de rotação.

Índice de quadros

- Quadro 1 – Curvas de libertação controlada da vancomicina, relativas aos dois ensaios.
- Quadro 2 – Quantidades usadas na preparação de lágrimas artificiais.
- Quadro 3 – Distribuição granulométrica das partículas de PLA1 e PLA4.
- Quadro 4 – Distribuição granulométrica das partículas de PLGA1 e PLGA2.
- Quadro 5 – Distribuição granulométrica das partículas de PLA γ HB 1 a 24 000 rpm e PLA γ HB 1 com ultrassons.
- Quadro 6 – Distribuição granulométrica das partículas de PLA1 e PLGA1.
- Quadro 7 – Distribuição granulométrica das partículas de PLA-lab e PLA-com.
- Quadro 8 – Distribuição granulométrica de duas amostras de PLA-lab encapsulando vancomicina.
- Quadro 9 – Distribuição granulométrica de duas amostras de PLA-lab encapsulando Avastin[®].
- Quadro 10 – Resultados de absorvância medidos no sobrenadante das amostras liofilizadas.
- Quadro 11 – Registo das quantidades necessárias para o cálculo da eficiência e do *drug loading*.
- Quadro 12 – Massas de A1, A2 e V2 utilizadas no estudo da cinética de libertação.
- Quadro 13 – Quantidades utilizadas na aplicação do Reagente de *Bradford* em duas amostras de BSA em solução: BSA sem PLA e BSA ligada aos grupos carboxílicos livres de PLA.
- Quadro 14 – Registo das concentrações e volumes das soluções de vancomicina em lágrimas artificiais.
- Quadro 15 – Quantidades utilizadas para a medição de absorvâncias de vancomicina em lágrimas artificiais.
- Quadro 16 – Quantidades utilizadas para a medição de absorvâncias da BSA.
- Quadro 17 – quantidades utilizadas para a medição de absorvâncias de vancomicina em PBS.
- Quadro 18 – massas das nanoesferas depois de liofilizadas.
- Quadro 19 – valores de p das comparações, em cada dia.

Índice de gráficos

- Gráfico 1 – Curva de DMTA para as amostras de PLA-lab, PLA_v e PLA_A.
- Gráfico 2 – Curvas de libertação controlada da vancomicina, relativas aos dois ensaios.
- Gráfico 3 – Comparação das várias formulações em estudo com Avastin[®].
- Gráfico 4 – Comparação das várias formulações em estudo com vancomicina.
- Gráfico 5 – Comparação do PLA_A e do Avastin[®] ao longo do tempo.
- Gráfico 6 – Comparação do PLA_v e do vancomicina ao longo do tempo.
- Gráfico 7 – Comparação das diferentes concentrações de Avastin[®] ao longo do tempo.
- Gráfico 8 – Comparação das diferentes concentrações de vancomicina ao longo do tempo.
- Gráfico 9 – Comparação das amostras de Avastin[®] e vancomicina ao longo do tempo.
- Gráfico 10 – Comparação das amostras de PLA_A e PLA_v ao longo do tempo.

Objectivos

O objectivo principal deste trabalho consistiu na preparação de micro/nanopartículas para sistemas de libertação controlada de substâncias activas para uso oftalmológico, quer no segmento posterior quer no anterior.

A estratégia delineada para este trabalho consistiu nas seguintes etapas:

- preparar e caracterizar micro/nanopartículas poliméricas;
- avaliar o tamanho das partículas preparadas, tendo por meta atingir a escala nanométrica;
- encapsular fármacos, que possam ser usados em tratamentos de doenças oftalmológicas, nessas partículas;
- ligar, covalentemente, as substâncias activas à superfície das nanopartículas;
- avaliar a eficiência de encapsulamento;
- fazer estudos de cinética de libertação dos fármacos encapsulados;
- testar a possível citotoxicidade dessas partículas.

Introdução

“Todo o trabalho tem em si mesmo a sua misteriosa recompensa.”

Lerberghe

Conhecer de novo

É interessante, é revigorante

Ver com novos olhos

...

Deixar-se invadir por dentro

Conhecer a parte oculta

...

E até os problemas desconhecidos

Olhar por outro ângulo

...

Ver o novo no velho

E gostar muito do que se vê agora

...

Germana Facundo

1. Enquadramento e Apresentação da Dissertação

Actualmente existe uma variedade imensa de fármacos associados a tecnologia de ponta, que permite os mais diversos tipos de tratamentos oculares. Não entanto, existem doenças oculares cujos tratamentos são muito invasivos e, frequentemente, deles resultam lesões ou efeitos adversos. Uma das doenças oculares responsáveis pela perda da acuidade visual é a retinopatia diabética (RD) e a degenerescência macular relacionada com a idade (DMRI). Ambas são doenças do segmento posterior onde é mais difícil fazer chegar o fármaco. Os tratamentos para doenças neste segmento baseiam-se essencialmente em dois tipos de injeções: sistémicas ou intravítreas. A fotocoagulação a *laser* é também uma das terapias usadas no tratamento de problemas retinianos, da coróide e em tumores intraoculares, mas dela advêm lesões na retina, que podem ser mais ou menos graves [1].

Quanto aos tratamentos utilizados para o segmento anterior são à base de gotas ou colírios. O que acontece é que esta via de administração é muito pouco eficiente,

principalmente devido ao facto do olho estar em constante autolimpeza, o que torna necessário fazer várias aplicações, já que, em cada uma se perde grande quantidade de fármaco.

O desenvolvimento de um sistema que permita uma boa biodistribuição em que as concentrações de fármaco no organismo sejam apenas as necessárias, mantendo-se aproximadamente constantes durante o tempo terapêutico, tornou-se na grande motivação deste projecto.

Assim, o que se pretendeu com este trabalho foi imobilizar substâncias activas em nanoesferas de um polímero biodegradável. Ao controlar-se a velocidade de libertação dos fármacos, torna-se possível diminuir o número de injecções (intravítreas ou intravenosas) e, por isso, diminuir os eventuais efeitos colaterais.

O *bevacizumab* (Avastin[®]) foi um dos fármacos escolhidos dadas as suas propriedades inibidoras da angiogénese¹. Apesar de já ser usado no tratamento de doenças da retina e coróide, a sua aplicação pode trazer alguns problemas inflamatórios, e, no caso das concentrações serem elevadas, pode mesmo haver um efeito tóxico a no tecido retiniano. [3].

Escolheu-se também a vancomicina que actua como um anti-inflamatório podendo ser usada nas mais diversas doenças oculares. O objectivo de encapsular este fármaco num polímero prende-se igualmente com a necessidade de diminuir o número de aplicações e manter as concentrações de fármaco sempre dentro dos limites terapêuticos.

2. Organização do Projecto

Este trabalho está organizado da seguinte forma: após uma breve introdução, o capítulo I descreve o Estado da Arte. Nele são abordados os principais tópicos que sustentam o trabalho. Faz-se uma descrição sumária da anatomia e fisiologia do

¹ Angiogénese: termo usado para descrever o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos num tecido vivo. Este processo depende da proliferação de células endoteliais, que são as células de revestimento dos vasos sanguíneos 2. <http://portal.alert-online.com/?key=680B3D50093A6A032E510E2D36020C400E2A322A2E4106273B4822515A7966>. [cited 12 de Agosto de 2009].

olho, seguindo-se um resumo sobre o que são os biomateriais, evidenciando-se o papel dos polímeros. Os sistemas de libertação controlada são alvo de uma resenha histórica, já que são uma peça fundamental na concretização dos objectivos do tema em causa. Fazem-se algumas considerações sobre o método utilizado na produção de nanopartículas e as respectivas técnicas de caracterização, destacando-se algumas doenças oculares, bem como alguns dos tratamentos usados nas mesmas.

No capítulo II é feita a descrição técnica e procedimentos experimentais utilizados.

No capítulo III apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos e, finalmente, são apresentadas as conclusões e perspectivas de trabalho futuro.

Capítulo I – Estado da Arte

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

1. O Olho - Anatomia e Fisiologia

O olho é um órgão duplo e simétrico dos animais que permite detectar a luz e transformar essa percepção em impulsos eléctricos que, por sua vez, são enviados para o cérebro [4]. Encontra-se dentro de uma cavidade óssea e tem aproximadamente 24 mm de diâmetro anteroposterior e 12 mm de largura [5].

O olho humano é constituído, essencialmente, por duas partes, um segmento anterior e um posterior. O segmento anterior é constituído pela córnea, íris, corpo ciliar, humor aquoso e pelo cristalino; o segmento posterior é constituído por uma cavidade preenchida pelo humor vítreo; esta cavidade está rodeada pelas esclera ou esclerótica, coróide e retina [6].

A Figura 1 representa a anatomia do olho humano.

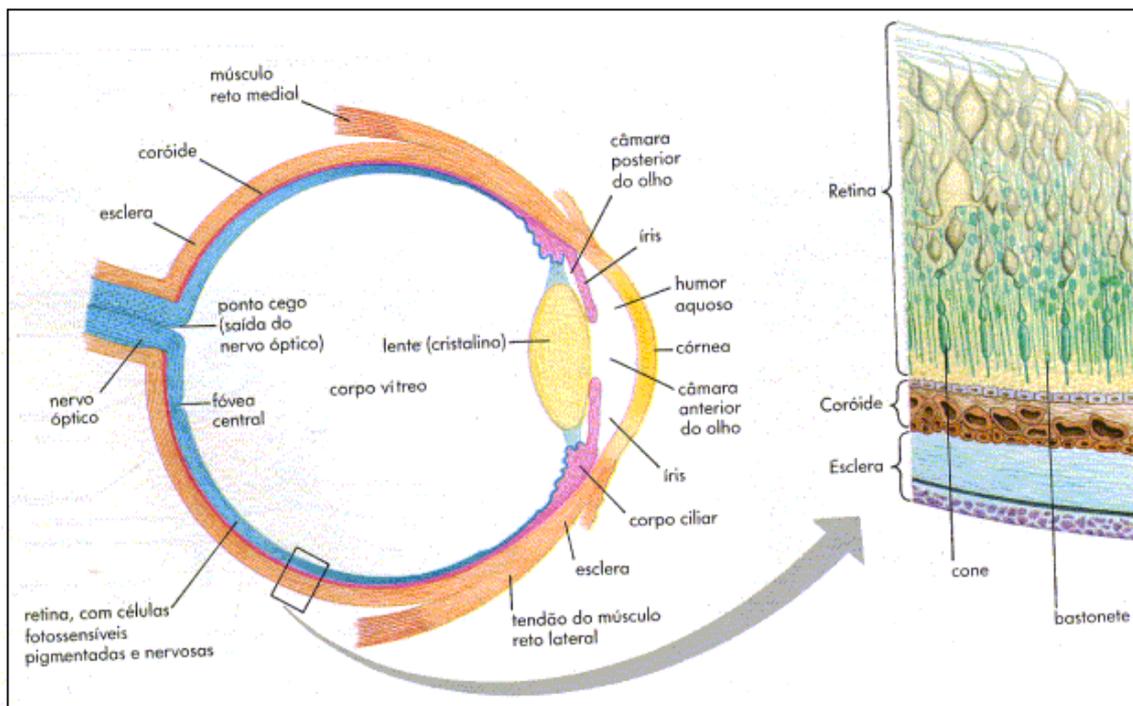


Fig.1 – Anatomia do olho (retirada [7]).

De seguida, faz-se uma breve descrição de alguns constituintes do olho, no sentido de contextualizar um pouco melhor alguns assuntos abordados ao longo deste trabalho.

Córnea: é uma membrana transparente localizada à frente da íris desempenhando o papel de protecção do olho dos vertebrados. Tanto a córnea como o cristalino têm a função de focar a luz através da pupila até à retina. A secreção lacrimal tem aqui um papel fundamental visto que mantém a humidade adequada à córnea, tem a função de nutrição, limpeza e protecção contra infeções bacterianas. Apesar de cobrir apenas 1/6 da superfície do globo ocular, a córnea é a principal via para a entrada de moléculas presentes nos fármacos de uso tópico, já que faz a ligação entre o meio exterior e o interior [8].

Íris: é a parte colorida do olho e, na parte central localiza-se um orifício de diâmetro regulável, responsável pela entrada de luz, denominado de pupila. Os músculos da íris permitem a variação do diâmetro da pupila [9].

Cristalino: é uma lente biconvexa, transparente e flexível, localizada entre a íris e o humor vítreo, sendo alimentado pelo humor aquoso. O cristalino tem como principal função focar a imagem na retina com uma distorção mínima e uma estabilidade máxima [10]. O cristalino tem um poder de acomodação que, aliado à sua transparência, permite focar objectos a uma distância de seis metros e absorver luz ultravioleta [11].

Corpo ciliar: constitui a parte mais vascularizada da globo ocular e é responsável pela produção do humor aquoso.

Humor aquoso: líquido transparente que preenche o espaço entre a córnea e a íris. A sua principal função é a de nutrir a córnea e o cristalino, além de regular a pressão ocular. Apresenta uma elevada concentração de ácido ascórbico tornando-o um bom anti-oxidante e absorve parte da radiação ultravioleta.

Esclera: é o revestimento exterior do olho, normalmente de cor branca. É na esclera que se encontram os músculos extra-oculares, responsáveis pelo movimento do globo ocular [7]. Tem como principal função a protecção do olho, resistindo à pressão intraocular, mantendo a forma do globo ocular.

Retina: é uma camada nervosa que reveste toda a parte interna do olho, onde se encontram as células fotorreceptoras – cones e bastonetes. Os cones são responsáveis pela visão central e pelas cores e os bastonetes são os responsáveis pela visão periférica e noturna. A sua principal função é transformar estímulos luminosos em estímulos nervosos que serão enviados para o cérebro, através do nervo óptico [5].

Coróide: é uma camada muito vascularizada, situada entre a retina e a esclera. A sua principal função é nutrir a retina. A coróide é rica em pigmentos que absorvem a luz que chega à retina, evitando a sua reflexão [7].

2. Biomateriais

São considerados biomateriais todas as substâncias ou combinação de substâncias (excepto fármacos), naturais ou sintéticos, que podem estar em contacto ou ser usados durante qualquer período de tempo, com fluidos e/ou tecidos biológicos, tendo como objectivo o tratamento ou a substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo [12]. Têm sido alvo de grande investigação estando já caracterizada uma vasta variedade desses materiais.

A utilização de biomateriais com acção terapêutica remonta há milhares de anos. A utilização de suturas, por exemplo, tem cerca de 32 mil anos; os chineses, romanos e astecas usavam ouro em tratamentos odontológicos; há indícios do uso comum de dentes em madeira e olhos de vidro.

Os biomateriais são muito utilizados tanto na indústria farmacêutica como na área das ciências biomédicas. Incorporam sistemas de membranas para diálise, válvulas cardíacas, lentes de contacto, *pacemakers*, sacos para sangue, adesivos biológicos, implantes ortopédicos, etc. [13]. A preparação de biomateriais implica um conhecimento exaustivo das suas propriedades químicas, físicas e biológicas, pelo que, as técnicas de caracterização têm tido uma grande evolução [14].

Dentro dos biomateriais podem ter-se polímeros, compósitos, cerâmicos e metais/ligas. Na Tabela 1 podem ver-se vantagens/desvantagens, exemplos e aplicações de cada uma destas classes de biomateriais [15].

Tabela 1 – Várias classes de Biomateriais: exemplos, vantagens, desvantagens e aplicações (adaptada de [13]).

Biomaterial	Exemplos	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Polímeros	Poliésteres Polietileno Poliuretano Poli(metacrilato de metilo)	Elasticidade Fácil preparação Baixa densidade	Baixa resistência mecânica Degradação ao longo do tempo	Ortopédicas Suturas Veias/artérias Oftalmológicas
Compósitos	Fibras de carbono/resina Fibras de carbono/termoplástico Carbono/carbono Colagénio	Boa biocompatibilidade Resistência à corrosão Elevada força de tensão	Material de fabrico incompatível	Implantes para o joelho Válvulas cardíacas
Cerâmicos	Alumina Carbono Zircónio Fosfato de cálcio Porcelana Vidros bioactivos	Boa biocompatibilidade Elevada resistência à corrosão Alta resistência à compressão	Baixa força de tensão Baixa resistência mecânica Baixa elasticidade Elevada densidade	Ossos Dentes Tendões Traqueias artificiais
Metais e ligas	Aço inoxidável Ligas de titânio Ligas de cromo-cobalto	Alta força de tensão Alta resistência ao desgaste Energia de deformação elevada	Baixa biocompatibilidade Corrosão em meio fisiológico Alta densidade	Fixação ortopédica Ortodontia (implantes dentários)

Aos polímeros tem sido dada uma atenção especial, dado o seu grande potencial biomédico. São muito fáceis de preparar dando a possibilidade de obter uma variada gama, tanto na composição como nas diferentes propriedades.

Já durante a II Grande Guerra Mundial, foram encontrados pedaços de poli(metacrilato de metilo), provenientes das cabines dos aviões, nos olhos dos aviadores. Este facto sugeriu que este tipo de materiais não causava uma grande reacção alérgica.

Para que os polímeros possam ser usados na área da biomedicina devem obedecer a um conjunto de propriedades: biocompatibilidade, biodegradabilidade, não produzirem subprodutos tóxicos ou carcinogénicos, quimicamente estáveis e inertes, resistência mecânica adequada, baixa densidade e facilidade de preparação.

Alguns dos biopolímeros estão já a ser utilizados para incorporar fármacos permitindo a sua libertação controlada. Os sistemas poliméricos para libertação de fármacos permitem uma libertação lenta e gradual e, com eles, é também possível direccioná-los para alvos específicos do organismo. Podem classificar-se em:

- polímeros naturais – são biodegradáveis sendo muito utilizados em sistemas de libertação controlada (exemplos: colagénico, celulose, quitosano, dextrano e goma arábica);
- polímeros naturais modificados – obtêm-se por modificação química das cadeias poliméricas com o intuito de alterar as suas propriedades físicas e químicas (exemplo: acetato de celulose);
- polímeros sintéticos – produzidos em laboratório e largamente utilizados. Como exemplos podem referir-se: poli(etileno), poli(ácido acrílico), poli(acrilamida), poliésteres, entre outros.

3. Sistemas de libertação controlada

A forma mais habitual de administrar fármacos é sob a forma de comprimidos, cápsulas ou injeções. No entanto, estas formas não permitem direccionar o fármaco para o local desejado, dentro dos níveis terapêuticos durante um longo período de tempo, não evitando as várias administrações.

O desenvolvimento de sistemas de libertação controlada revolucionou o uso de administração de fármacos, na medida em que tornou possível prolongar a acção do fármaco, diminuindo a frequência das doses.

Em 1950 apareceram os primeiros sistemas de libertação controlada, utilizando um material polimérico como sistema transportador da substância activa. Inicialmente estes sistemas eram usados em pesticidas, mas, uma década mais tarde, começaram a ser aplicados em membranas de diálise e em tubos de silicone. A partir de 1980, a investigação nesta área teve enormes avanços e, actualmente, existe uma panóplia imensa de sistemas poliméricos incorporando substâncias activas, nomeadamente no tratamento de doenças oftalmológicas [16].

Num sistema de libertação controlada, o fármaco pode ser libertado de duas formas distintas: na circulação sistémica, a uma velocidade pré-definida, ou *in loco*. A libertação do fármaco no local traz vantagens, já que se evita o metabolismo hepático. O fármaco apenas actua no tecido/órgão desejável, as doses a utilizar são muito mais pequenas e os efeitos colaterais são reduzidos [17].

A escolha adequada do material a usar nestes sistemas será o ponto de partida para o seu sucesso. Os mais recentes sistemas de libertação são constituídos por materiais à base de polímeros. Contudo há que ter em atenção que o próprio material polimérico deve ser criteriosamente seleccionado.

Assim, o polímero deve ser:

- biocompatível;
- de fácil preparação;
- de baixo custo;
- não induzir reacções alérgicas;
- não-tóxico;
- biodegradável e de fácil excreção;
- quimicamente estável, não interagindo com a substância activa;
- confortável para o paciente.

Nos sistemas convencionais de libertação controlada de fármacos, a concentração do fármaco no sangue apresenta um pico, mas decresce ao fim de algum tempo. Desta forma, são necessárias várias aplicações, por forma a restabelecer os níveis terapêuticos. A concentração de fármaco no plasma não pode exceder os níveis terapêuticos, correndo-se o risco de serem fontes de toxicidade. Por outro lado, não devem estar muito abaixo do mesmo, pois não teriam o efeito terapêutico desejado [15, 18].

A Figura 2 ilustra o comportamento da quantidade de um fármaco no organismo em três situações distintas: uma só aplicação, várias aplicações e administração de um sistema de libertação controlada.

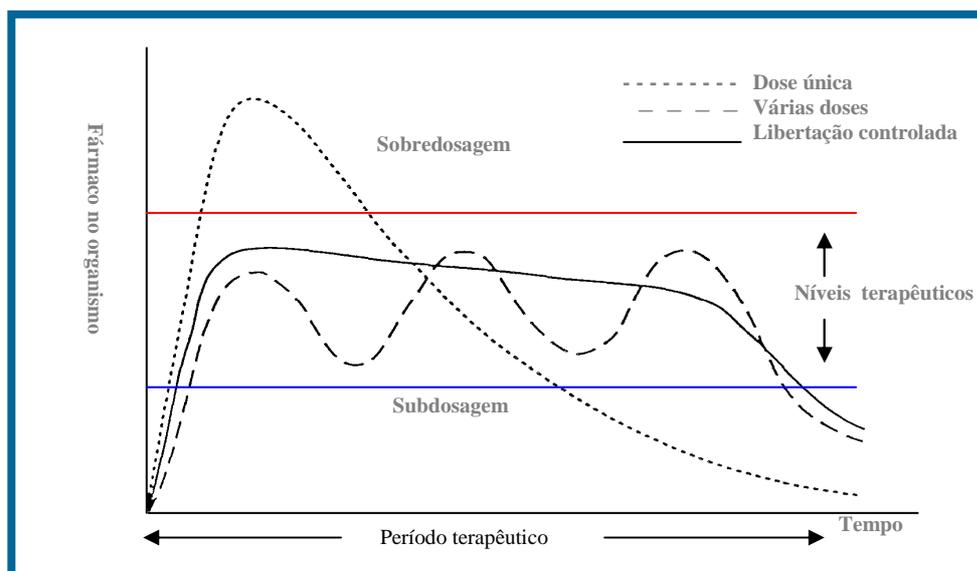


Fig.2 – Comportamento da quantidade de um fármaco no organismo em três situações distintas de administração.

Em oftalmologia, a maioria dos fármacos são aplicados topicamente e sob a forma de gotas; trata-se de uma via de administração muito cómoda, de baixo custo e simples, já que favorece a automedicação. Não obstante estas vantagens, muitas vezes revelam-se tratamentos ineficazes, obrigando a várias administrações, dada a sua baixa disponibilidade. Estima-se que, da quantidade de fármaco aplicado topicamente, apenas 5% atinge os tecidos intraoculares [19-23]. O facto do olho estar constantemente em autolimpeza, a drenagem naso-lacrimal, a barreira hemato-ocular e a baixa permeabilidade da córnea são factores que implicam uma administração repetida ao longo do tempo, resultando em picos de sobredosagem e de subdosagem [24].

Quando a administração é feita via injeções intravenosas, apenas cerca de 1 a 3% da substância activa atinge a córnea, sendo o restante absorvido pela circulação sistémica, o que revela também uma baixíssima biodisponibilidade [25].

É importante salientar que as gotas oftalmológicas são usadas apenas no tratamento de doenças localizadas no segmento anterior do olho, encontrando-se no mercado uma grande variedade de antibióticos, anti-inflamatórios, fármacos para a diminuição da pressão ocular etc.. Já para o segmento posterior do olho, as dificuldades de tratamento prendem-se, essencialmente, com o transporte de fármacos directamente para o local desejado.

Com os avanços da biologia molecular, abrem-se portas para o tratamento de algumas doenças neste segmento do olho, nomeadamente, da degenerescência macular relacionada com a idade (DMRI) e da retinopatia diabética (RD). O seu tratamento

inclui a terapia génica. As injeções intravítreas são uma das possibilidades de tratamento. Elas transportam a concentração de fármaco adequada, no entanto constituem um método invasivo e podem causar alguns efeitos adversos, tais como, hemorragias, descolamento da retina, cataratas, entre outros [22, 24, 26], para além disso os fármacos terão de ser capazes de atravessar a barreira retiniana [21]. Assim, é fundamental minimizar a quantidade de injeções administradas e, por isso, é importante que a formulação do fármaco seja desenhada de forma a manter a dosagem terapêutica adequada em termos de concentração e que esta se mantenha por longos períodos de tempo.

Um dos principais objectivos da utilização de sistemas de libertação de fármacos para aplicações oftalmológicas é, precisamente, manter os níveis de fármaco na gama terapêutica, reduzir efeitos secundários, diminuir a quantidade de fármaco utilizado para valores que correspondam ao estritamente necessário e diminuir o número de administrações. Por outro lado, pretende-se que estes sistemas apenas actuem numa área restrita, não reagindo com os tecidos e/ou órgãos adjacentes, contrariamente à terapia ocular convencional, que se baseia na aplicação de fármacos, sob a forma de gotas, sobre o olho para uma acção superficial ou mais interior.

Dadas todas as dificuldades apresentadas, tem sido feita muita investigação no sentido de desenvolver sistemas de administração de fármacos para aplicações oftalmológicas, de forma a que possibilitem uma libertação controlada, num período de tempo adequado a cada patologia.

Os sistemas poliméricos mais usados são os poliésteres, tais como a poli(caprolactona) (PCL), o poli(ácido láctico) (PLA) e os diferentes tipos de poli(ácido láctico co-glicólico) (PLGA) [27]. Foram realizados alguns estudos *in vivo* que permitem a localização de nanopartículas de PLA dentro dos tecidos intraoculares e, assim, avaliar a sua capacidade de libertar o material encapsulado. *Bourges et al* concluíram que uma única injeção intravítrea, contendo nanopartículas de material polimérico produziu efeitos terapêuticos adequados durante um período de quatro meses, mantendo-se no epitélio do pigmento retiniano (RPE) durante esse período [28].

De facto, o uso de nanopartículas para sistemas de libertação de fármacos, peptídeos, vacinas e oligonucleótidos tem-se revelado muito promissor no tratamento de várias doenças, inclusivamente têm sido usados na terapia genética, em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Existem dois grandes métodos de imobilização de fármacos: os químicos e os físicos [15].

Na Figura 3 esquematizam-se as principais formas de imobilização.

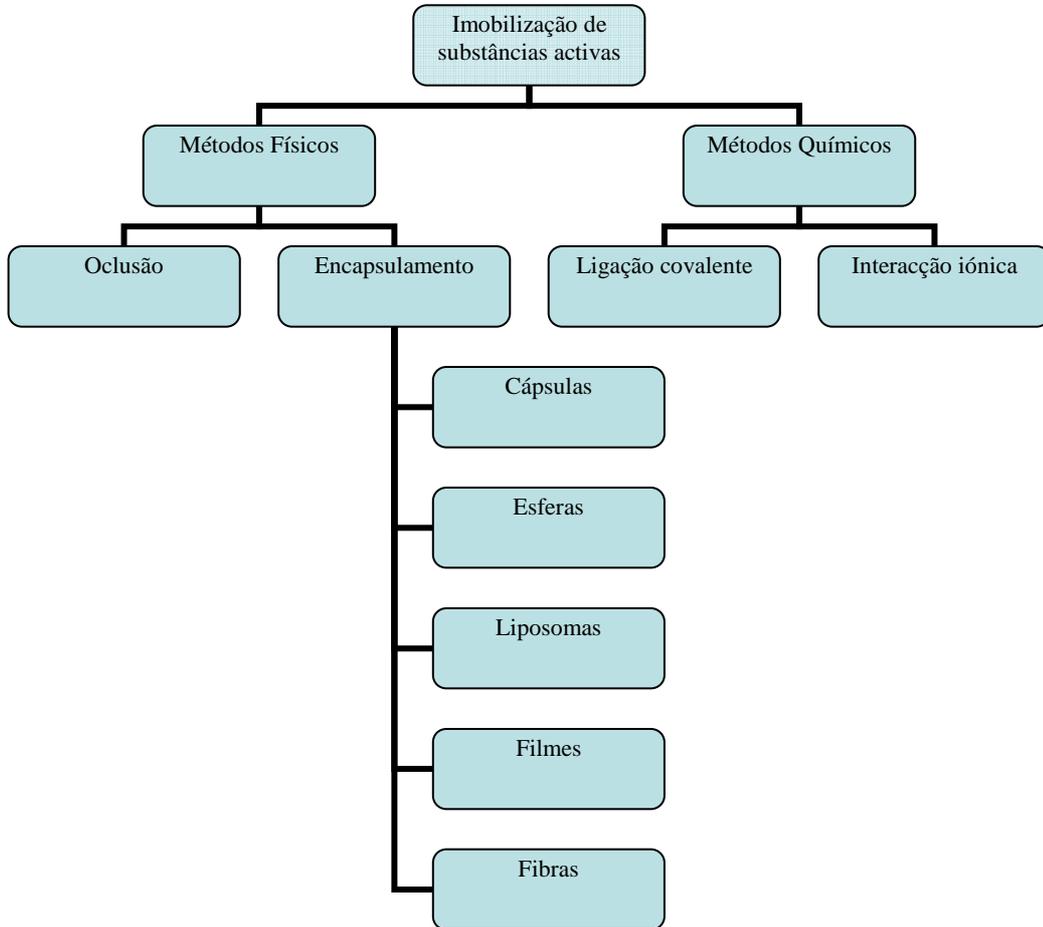


Fig. 3 – Esquematização das principais formas de imobilização de substâncias activas (adaptada de [29]).

3.1. Métodos físicos

Seguidamente faz-se uma breve descrição dos métodos físicos de imobilização.

Oclusão: este método consiste no aprisionamento da substância activa no interior do polímero. As moléculas do fármaco estão livres na solução, mas com limitação de movimentos imposta pela própria estrutura do polímero, seja pelo grau de reticulação, tamanho dos poros ou por propriedades mecânicas (Fig.4) [16].

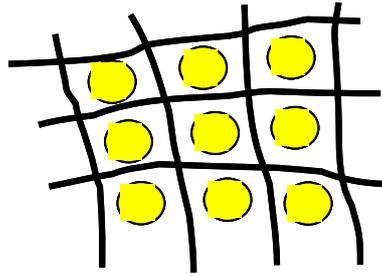


Fig.4 – Representação do processo de imobilização por oclusão.

Podem referir-se algumas vantagens deste método:

- são usadas pequenas quantidades de substâncias activas;
- é um método experimental bastante simples;
- permite a imobilização de uma grande variedade de fármacos.

As desvantagens são: a possível degradação do fármaco pela presença de radicais livres, durante a polimerização e da libertação do fármaco que pode ser muito rápida ou lenta, dependendo dos poros do polímero. O tamanho dos poros está dependente do grau de reticulação [16].

Encapsulamento: há um revestimento de partículas sólidas, líquidas ou gasosas com uma membrana polimérica [30]. Este método também mantém as substâncias activas livres em solução, mas limitadas pela membrana. A libertação do fármaco pode ser feita de dois modos distintos, que devem ser previamente estudados e controlados. Por um lado, há que contar com os poros das próprias partículas, por outro, a degradação da membrana polimérica é outro factor a ter em atenção [15, 16].

Após o encapsulamento torna-se importante estudar a cinética de libertação do conteúdo das partículas. Esta libertação pode ocorrer por variações de pH, alterações da solubilidade do meio, biodegradação, difusão ou por ruptura mecânica.

Existe uma dependência da espessura da membrana encapsulante e com o tamanho das moléculas que constituem as substâncias activas, com a velocidade de libertação [31].

3.2. Métodos químicos

No que diz respeito aos métodos químicos, estes podem dividir-se em dois grupos: através da ligação covalente e por adsorção.

Ligação covalente: este método envolve a ligação química entre os grupos funcionais do polímero e a substância activa que se pretende imobilizar. Apesar de ser um método simples, implica a alteração das propriedades físicas e químicas das substâncias activas, constituindo um processo irreversível (Fig. 5) [16].

Imobilização por interacções iónicas: este método caracteriza-se por interacções iónicas entre o polímero e o fármaco. Apesar de ser um método simples e de baixo custo, não é muito utilizado, uma vez que requer um controlo rigoroso de temperatura, pH, polaridade e força iónica, dificultando uma libertação controlada, uma vez que o fármaco se “desprende” facilmente do polímero [16].

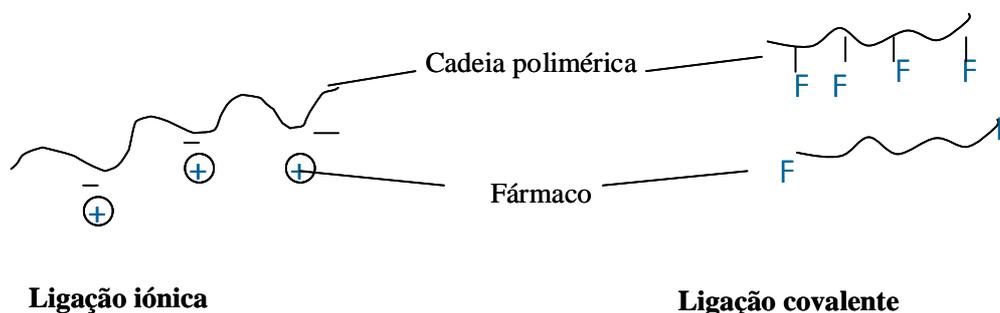


Fig. 5 – Representação esquemática de métodos químicos para imobilização de fármacos (ligação iónica e covalente).

Neste trabalho utilizou-se, por um lado, a técnica de encapsulamento para assegurar que a substância activa seja libertada de forma controlada, actue numa área restrita e mantenha os níveis terapêuticos constantes ao longo do tempo e, por outro lado, a ligação covalente do fármaco ao polímero. O objectivo da utilização destes dois métodos era poder compará-los em termos de eficiência.

4. Material polimérico

Neste trabalho utilizaram-se poliésteres como polímeros de suporte. Sendo assim, focar-nos-emos, em seguida, sobre estes polímeros.

Os poliésteres têm sido frequentemente utilizados na preparação de micro e nanopartículas para aplicação em injeções intravítreas, sendo um deles o PLA que será alvo de uma breve caracterização.

- **Ácido láctico**

O ácido láctico é bifuncional, tendo então dois grupos funcionais: o grupo carboxílico (COOH) e grupo hidroxilo (OH) (Fig. 6).

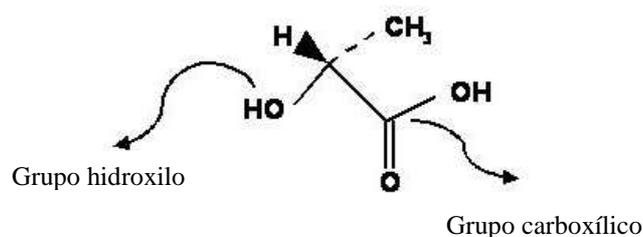


Fig. 6 – Representação da estrutura do ácido láctico (retirada de [32]).

A polimerização do ácido láctico pode dar-se por dois métodos: por policondensação e por abertura do anel. O PLA utilizado neste trabalho foi sintetizado utilizando o primeiro método. Utilizou-se um catalisador (acetato de zinco), originando-se o poli(ácido-láctico) cuja estrutura química se encontra representada na Figura 7 [33].

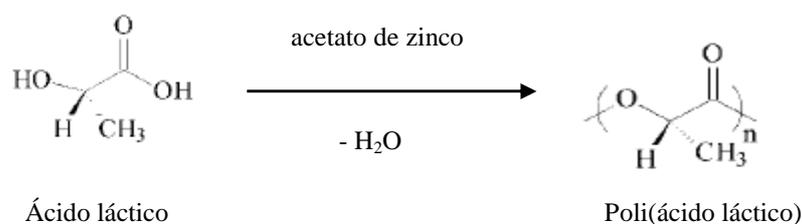


Fig. 7 – Reacção de polimerização por condensação do poli(ácido láctico) (adaptada de [34]).

O PLA é um polímero alifático, biocompatível, não-tóxico e totalmente biodegradável [6, 26, 35, 36]. Isto torna desnecessária uma cirurgia para a remoção de implantes. Tem sido utilizado em sistemas transportadores de fármacos [37], tais como micro/nanoesferas e nanocápsulas, para o tratamento do glaucoma [19].

O processo de degradação das partículas de PLA dá-se, essencialmente, por acção hidrolítica, sendo afectado por vários factores, nomeadamente, a morfologia (cristalina ou amorfa), o mecanismo de hidrólise (não-catalítico, auto-catalítico ou enzimático), a composição química, a porosidade, o tamanho, entre outros [35].

Pensa-se que os metabolitos resultantes da degradação são eliminados via ciclo de *Krebs*. A taxa de formação dos produtos de degradação é muito lenta, pelo que não afecta o normal funcionamento das células [24, 38, 39]. Os produtos resultantes da degradação do PLA já existem naturalmente no corpo humano, pelo que é completamente tolerado.

5. Micro e nanopartículas

Os materiais poliméricos têm sido utilizados na preparação de micro e nanopartículas, com o intuito de poderem vir a incorporar os sistemas de libertação controlada referidos anteriormente. Pretende-se que esta libertação seja muito específica, isto é, que actue apenas nas células alvo, maximizando a acção do fármaco e minimizando os efeitos indesejáveis em células adjacentes. Veja-se que, em tratamentos de quimioterapia ou radioterapia, para além das células tumorais, algumas das células normais são danificadas e os efeitos colaterais são vários, destacando-se a diminuição do número de células hematopoiéticas e queda de cabelo.

Métodos convencionais de administração, tais como as injeções intramusculares e intravenosas ou a via oral, não têm uma acção específica; uma vez absorvidas pela corrente sanguínea as substâncias percorrem vários órgãos/tecidos e apenas uma ínfima quantidade de fármaco atinge as células alvo.

Em 1980 foi criado o primeiro sistema de nanopartículas para libertação oftalmológica para o tratamento do glaucoma; este sistema consistia numa dispersão para aplicação tópica [40, 41]. Depois deste muitos outros se seguiram, mas a grande limitação continuava a ser a baixa eficiência [42].

Nas últimas décadas têm sido publicados vários trabalhos que visam a preparação e caracterização de micro e nanopartículas, que servirão de meios transportadores de fármacos/agentes activos, integrando sistemas de libertação controlada [6].

O tamanho das partículas é um parâmetro muito importante, uma vez que se relaciona com o modo de administração do fármaco e, conseqüentemente, de acordo com a patologia em causa. Por exemplo, quando se pretende que o fármaco actue directamente num tecido, via circulação sistémica, é conveniente que as partículas sejam da ordem de grandeza dos 500 nm [43]. O tamanho das partículas transportadoras constitui um factor importante no *uptake* celular que, regra geral, é mais facilitado no caso das nanopartículas. Estudos realizados mostram que partículas da ordem de grandeza dos 100 nm revelam um *uptake* 2,5 vezes superior quando comparadas com partículas na ordem dos 10 000 nm [38]. Consideram-se micropartículas quando o seu tamanho é superior a 1 μm , serão nanopartículas se o seu tamanho for inferior a 0,1 μm (100 nm) [44].

As micro e as nanopartículas referem-se a dois tipos de estruturas diferentes: esferas ou cápsulas. Nas esferas, o fármaco encontra-se homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica. Obtém-se então um sistema monolítico, não se identificando um núcleo diferenciado. As cápsulas são uma espécie de reservatório, onde já é possível identificar um núcleo que pode ser sólido ou líquido. A substância activa encontra-se no núcleo, envolvido por uma membrana, geralmente polimérica. A Figura 8 ilustra a diferença morfológica entre estes dois sistemas.

As cápsulas são revestidas por uma parede polimérica, contendo o fármaco/substância activa no seu interior e as esferas consistem numa matriz polimérica onde está incorporado o fármaco [45].

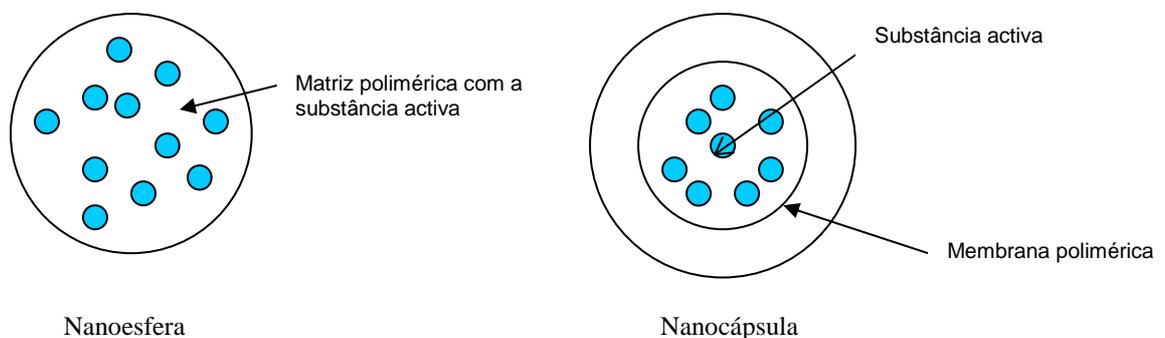


Fig.8 – Esquemas que evidenciam as diferenças morfológicas entre nanoesferas e nanocápsulas.

Para além da libertação controlada de substâncias activas existem outras vantagens que resultam do encapsulamento, nomeadamente o aumento de estabilidade do sistema, a protecção do meio ambiente e o tentar disfarçar aromas e/ou sabores [31, 46].

O uso de nanopartículas como sistemas de libertação controlada de fármacos ou substâncias activas aumenta a eficiência *in vivo* dos referidos fármacos. A preparação de nanopartículas tem em consideração as células-alvo, pelo que praticamente todo o seu conteúdo deverá ser libertado nas zonas específicas, atingindo-as com os níveis de concentração desejáveis [47].

A medicina pode contar hoje com os enormes avanços que têm sido feitos na área da nanotecnologia. Actualmente, os sistemas de libertação controlada de tipo polimérico têm variadíssimas aplicações médicas, revelando-se especialmente importantes no diagnóstico e tratamento do cancro, infecções graves, doenças metabólicas e autoimunes, doenças oftalmológicas, entre outras [15]. O seu uso ajuda a minimizar a degradação do fármaco após aplicação prevenindo efeitos secundários, aumentando a percentagem de fármaco no local desejado, favorecendo a diminuição da quantidade de substância activa necessária, diminuindo o número de doses. Estas partículas devem ser biodegradáveis, biocompatíveis, fáceis de preparar, não-tóxicas, de pequeno tamanho e com especificidade para o órgão/tecido em causa [19, 47, 48].

Dado que os nanomateriais poliméricos são facilmente transportados na corrente sanguínea, penetrando profundamente nos tecidos alvo, oferecem a possibilidade de se desenvolverem novas ferramentas de diagnóstico e terapêutica.

6. Produção de micro/nanopartículas

Existem vários métodos para o encapsulamento de fármacos em micro/nanopartículas, partindo do polímero. As diferenças entre cada um desses métodos residem na forma como a substância activa é mantida dentro do material polimérico [49]. De seguida faz-se uma breve abordagem a algumas das técnicas de produção de micro/nanopartículas.

Técnicas de atomização: estas técnicas incluem o *spray freezing* e o *spray-drying*. Em cada uma destas técnicas prepara-se uma suspensão da substância activa com o material encapsulante dissolvido num solvente orgânico. No *spray freezing* a suspensão é atomizada (pulverizada) usando um líquido criogénico, provocando o congelamento instantâneo das gotículas sólidas. Estas são recolhidas por evaporação do líquido criogénico ou por filtração e são liofilizadas, removendo o solvente orgânico.

No *spray drying* a suspensão é atomizada para uma corrente de ar quente, o solvente evapora e formam-se as partículas. O facto de se usar uma temperatura elevada, pode levar à inactivação das substâncias activas. A Figura 9 ilustra esta técnica.

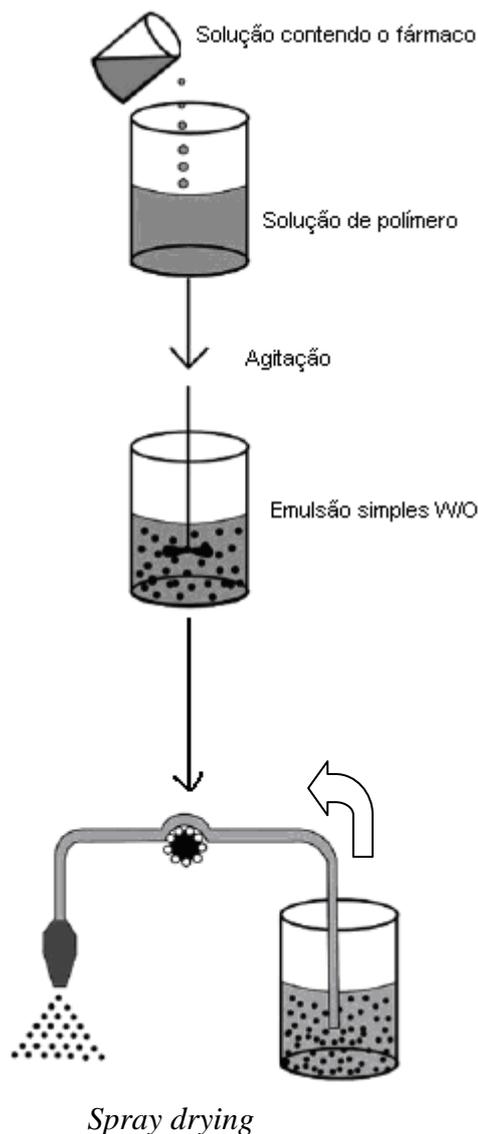


Fig. 9 – Produção de nanopartículas usando a técnica de *spray drying* (adaptada de [50]).

A técnica **de fluidos supercríticos** baseia-se na aplicação de fluidos supercríticos, nomeadamente o dióxido de carbono supercrítico. Esta técnica não utiliza temperaturas elevadas nem solventes orgânicos, constituindo a sua principal vantagem. Os fluidos supercríticos caracterizam-se por apresentarem difusividades semelhantes às dos gases (factor importante na cinética das reacções) e densidades semelhantes às dos líquidos (facilitando a solvatação de muitos compostos). Como desvantagens refere-se o elevado custo de investimento [51].

A Figura 10 mostra um esquema do equipamento utilizado na produção de micro/nanopartículas utilizando o dióxido de carbono supercrítico.

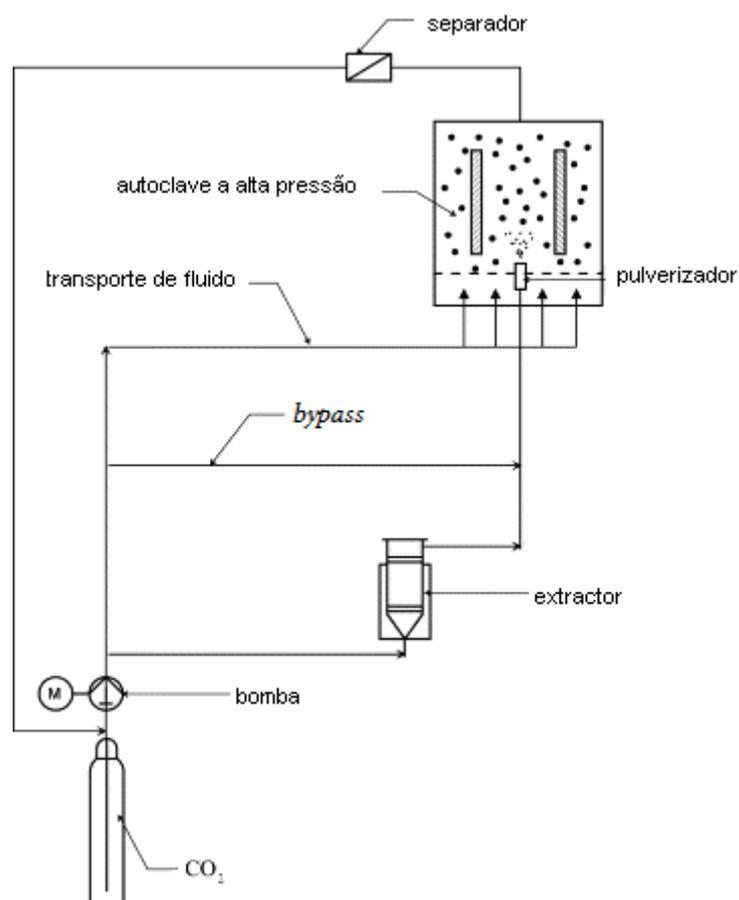


Fig. 10 – Visualização esquemática do equipamento para a produção de micro/nanopartículas utilizando a técnica de fluidos supercríticos (adaptada de [52]).

A técnica da **emulsão simples** (O/W) baseia-se na homogeneização de duas fases líquidas recorrendo a agitação vigorosa (elevada tensão de corte) e a estabilizantes. Se o material activo for hidrofílico, ele é disperso na fase orgânica

constituída por um solvente volátil; neste solvente está dissolvido o polímero encapsulante. Esta fase é adicionada, gota a gota e sob agitação, à fase aquosa que contém um estabilizante, formando-se a emulsão. As partículas são então recuperadas por evaporação do solvente. (Fig.11) [43, 53].

Esta técnica é muito utilizada uma vez que é bastante simples, podendo realizar-se à temperatura ambiente, é rápida e as velocidades de reacção são elevadas. Para além disso, os tamanhos da partículas são uniformes e o meio polimérico é bastante estável. As desvantagens apontadas são o uso de solventes orgânicos que, para além de serem tóxicos, são difíceis de remover e a utilização de grandes quantidades de surfactantes [54].

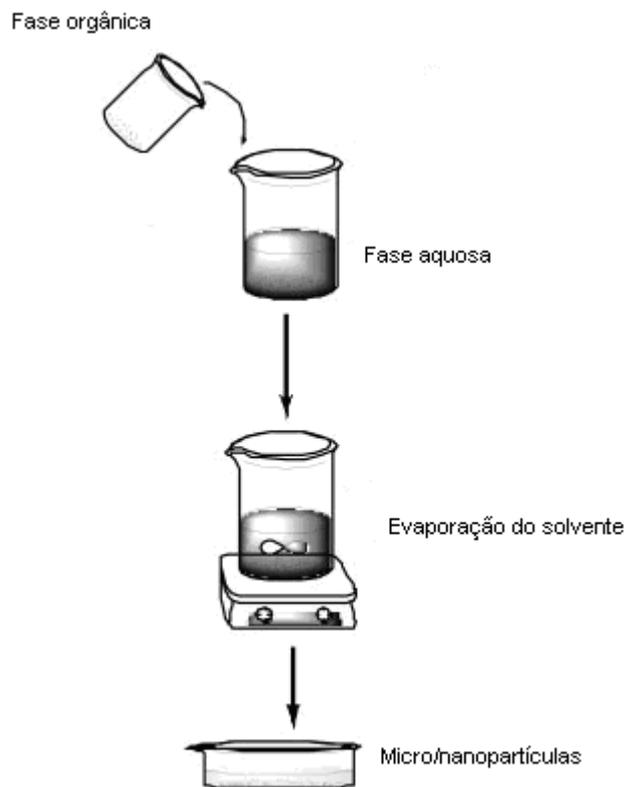


Fig.11 – Produção de micro/nanoesferas pelo método de emulsão (adaptada de [43]).

Existem várias formas de produzir partículas encapsulando fármacos (hidrofílicos). O método da dupla emulsão não é mais do que um processo semelhante à emulsão simples, mas onde são utilizadas três fases: duas aquosas e uma orgânica. A solução aquosa contendo a substância activa (W_1) é adicionada, gota a gota e sob agitação, à solução orgânica de polímero (O), obtendo-se a emulsão (W_1/O). Esta é

então adicionada a uma outra solução aquosa (W_2), também gota a gota e sob agitação, obtendo-se a dupla emulsão ($W_1/O/W_2$) [55].

A Figura 12 esquematiza uma dupla emulsão.

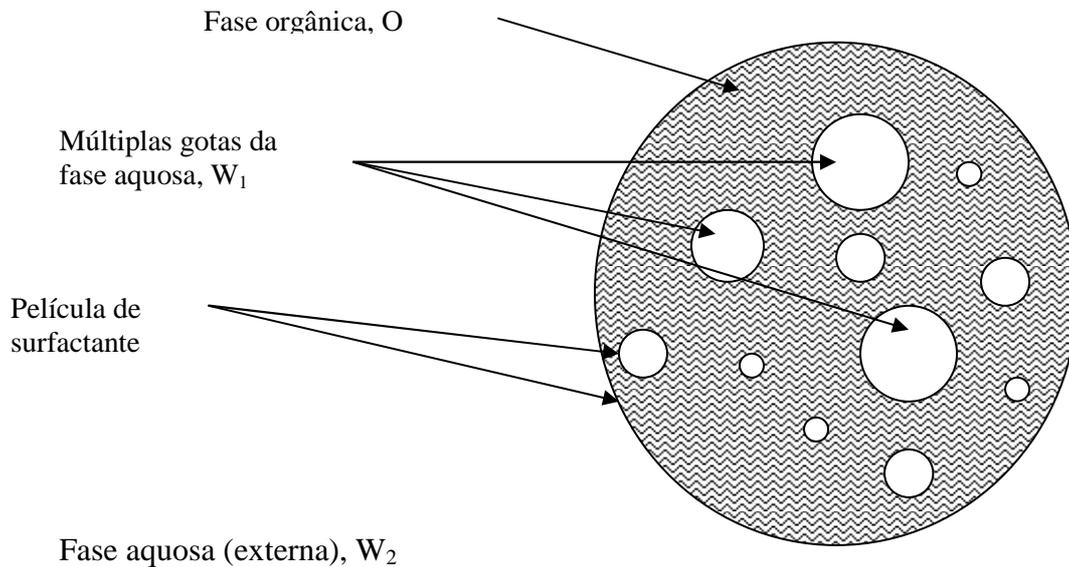


Fig.12 – Representação esquemática de uma dupla emulsão W/O/W (adaptada de [56]).

É extremamente importante conhecer o tamanho das partículas já que dele dependem as suas aplicações. Um dos principais factores que condicionam o tamanho e a distribuição das partículas é a velocidade e a uniformidade de agitação: em geral, quanto maior for a velocidade de agitação, menor será o tamanho das partículas e maior será a uniformidade na distribuição de tamanhos. Também as concentrações de polímero e da substância activa estão envolvidas no tamanho das partículas: este é directamente proporcional às concentrações do polímero e da substância activa. A concentração de agente estabilizante deve ser levado em consideração, já que, frequentemente, quanto maior for a sua concentração, menor será o tamanho das partículas [31, 44, 57].

7. Algumas doenças oftalmológicas

Muitas são as doenças oftalmológicas. Resumem-se aqui algumas delas, na sua maioria doenças do segmento posterior do olho, já que são aquelas cujos tratamentos são escassos e com vários efeitos secundários. De facto, a maioria das doenças neste segmento ocular são tratadas cirurgicamente ou por fotocoagulação a *laser*, nomeadamente a DMRI e a RD. Estes tratamentos são invasivos, ocorrendo com alguma frequência, descolamento de retina [6]. Neste sentido, seria interessante encapsular um fármaco, num determinado sistema polimérico que permitisse a libertação da substância activa nas quantidades adequadas à terapia.

A descrição genérica das cataratas e da endoftalmite surge na sequência da utilização de um outro fármaco com características anti-inflamatórias que pudesse ser encapsulado em nanoesferas por forma a reduzir o número de aplicações, mantendo as concentrações terapêuticas adequadas ao tratamento destas doenças.

7.1. Degenerescência Macular Relacionada com a Idade (DMRI)

A degenerescência macular relacionada com a idade é uma doença que, regra geral, afecta indivíduos com mais de 50 anos. É comum em etnia caucasiana, sendo o consumo de tabaco e a hipertensão arterial alguns factores de risco [58].

Trata-se de uma doença macular, a zona mais sensível da retina do olho, e responsável pela visão central (forma, cores, pormenor), ainda com muito poucas opções de tratamento e sem terapia comprovada [59, 60].

Existem dois tipos de DMRI: a forma exsudativa e a não-exsudativa. A primeira, apesar de menos frequente, é a mais temida e agressiva podendo levar à cegueira em poucas semanas. Ocorre uma neovascularização retiniana, com vasos sanguíneos muito finos e frágeis, que rebentam com facilidade, originando uma hemorragia que danifica o tecido macular de forma irreversível.

A DMRI não-exsudativa é muito mais comum, desenvolvendo-se mais lentamente; caracteriza-se por uma atrofia da retina que provoca a perda de visão central, ao nível do tecido macular.

Até aos anos 90, a fotocoagulação a *laser*, terapia fotodinâmica, cirurgia submacular e suplementos vitamínicos eram os tratamentos usados para a DMRI. Hoje, com a ajuda da biologia molecular, sabe-se que o que está por detrás destas lesões ao nível da retina é uma neovascularização, muitas vezes promovida pela expressão da proteína VEGF (factor de crescimento vascular endotelial). Esta proteína é um potente estimulador da angiogénese que se caracteriza como sendo o processo de formação de novos vasos sanguíneos. Em condições normais este é um processo altamente regulado. No entanto, em muitas doenças está completamente desregulado. Na diabetes, novos vasos são formados, invadindo a retina e todo o humor vítreo. A neovascularização ocular é também a responsável por uma série de doenças relacionadas com o crescimento desenfreado de vasos sanguíneos [61, 62].

Muitos doentes, com lesões retinianas graves devido à neovascularização, apresentam níveis elevados deste factor de crescimento. Acredita-se que agentes anti-angiogénicos que inibam a sua expressão, possam ser utilizados para o tratamento destas patologias.

As primeiras observações de que a vascularização tumoral aumenta o crescimento celular datam do início de século XX. A neovascularização permite o crescimento tumoral na medida em que fornece nutrientes e remove toxinas, promovendo a formação de novos vasos sanguíneos [63].

Em 1993 foram publicados os primeiros estudos que mostraram a inibição da neovascularização por anticorpos que se ligavam ao VEGF [64]. O *bevacizumab* (Avastin[®]) liga-se ao VEGF impedindo que este active as vias de sinalização celular através dos seus receptores [65].

A neovascularização ocular patológica está intimamente relacionada com o VEGF. Diversos estudos mostram que o bloqueio do VEGF inibe a neovascularização da íris [66], coróide [67] córnea e retina [68]. Estudos realizados, revelam evidências clínicas do efeito positivo do *bevacizumab* em doenças como a DMRI [69], RD, entre outras, apesar da dificuldade que este anticorpo tem em atravessar a barreira vítreo-retiniana. Dois casos clínicos estudados evidenciaram melhorias significativas na anatomia da mácula, após a administração de injeções intravítreas de Avastin[®] [70-73].

Estudos *in vitro* incorporando um potente corticoesteróide² (*budesonide*) em micro e nanoesferas revelaram a inibição da expressão do VEGF nas células do pigmento epitelial da retina [74].

Saishin et al, administraram, via injeção periocular, microesferas contendo um anti-VEGF, revelando-se um supressor da neovascularização e, conseqüentemente, da angiogénese [75].

Com o objectivo de desenvolver um sistema de libertação controlada, no sentido de inibir a longo termo a expressão do VEGF, *Carrasquillo et al* utilizaram o aptâmero EYE001 anti-VEGF; este foi isolado e encapsulado em microesferas de PLGA. Verificaram que a libertação do aptâmero ocorreu durante um período superior a vinte dias, não tendo havido alteração da sua bioactividade após a libertação [76]. Este estudo foi realizado em células da esclerótica de ratos que contém 71% de água. Esta serve, não só para hidratar, mas também para degradar as microesferas de PLGA. Com este estudo, pretendeu evitar-se o uso repetido de injeções ou de elevadas concentrações de fármaco a fim de se obter uma resposta terapêutica desejável.

7.2. Retinopatia Diabética (RD)

A diabetes *mellitus* é uma alteração metabólica que se caracteriza por níveis excessivos de glicose no sangue. Os níveis de glicose na corrente sanguínea são regulados pela insulina que é produzida nas células β do pâncreas. Uma anomalia na sua produção ou uma resistência anormal das células à acção da insulina origina a diabetes.

A diabetes é classificada em Tipo I e Tipo II. A primeira está relacionada com a destruição das células β do pâncreas e a segunda pela deficiência da produção de insulina ou a pela resistência das células à sua acção.

A RD é a complicação ocular mais grave e a mais comum da diabetes, podendo levar à total perda de visão. Caracteriza-se por alterações vasculares ao nível da retina que podem causar hemorragias e perda de acuidade visual. Esta patologia pode ser detectada numa fase precoce, com um exame simples ao “fundo do olho” possibilitando o tratamento ainda numa fase inicial (Fig. 13).

² Corticoesteróide: nome dado a um grupo de hormonas esteróides, produzidas pelas glândulas supra-renais.

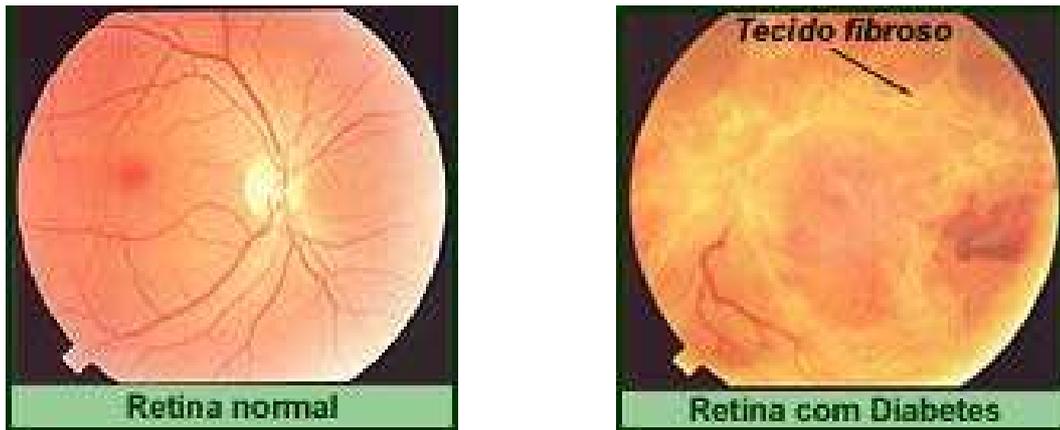


Fig. 13 – Imagens obtidas com um exame ao “fundo do olho” que permite a observação da retina num olho normal e numa retina com diabetes (adaptada de [77]).

Os diferentes estados evolutivos da doença permitem distinguir dois tipos de retinopatia diabética:

- **retinopatia não-proliferativa** que se caracteriza pelo aparecimento de microaneurismas, criados pelo depósito de substâncias nos capilares da retina causando-lhes estreitamento ou enfraquecimento. A área que rodeia cada ruptura nos capilares fica edemaciada, formando pequenos sacos que servem de depósitos de proteínas e gorduras. Os vasos também podem ocluir, impedindo o transporte de sangue para algumas células retinianas, provocando isquemia; a visão fica desfocada por falta de nutrientes. Quando o edema atinge a mácula, começam as complicações mais graves de visão, no entanto não ocorre a sua perda total; a visão periférica é conservada;

- **retinopatia proliferativa** verifica-se quando os danos causados na retina são muito grandes. Neste caso ocorre a formação de novos vasos (neovascularização), numa tentativa de fornecer os nutrientes necessários ao edema. Estes novos vasos aparecem sobre a retina e são suportados pelo humor vítreo, para além disso, são mais permeáveis. O que acontece é que estes vasos criam hemorragias que podem levar a lesões retinianas graves, nomeadamente o deslocamento da própria retina e a consequente perda de visão central e periférica [77, 78].

7.3. Cataratas

A catarata define-se como uma redução da transparência do cristalino. O desenvolvimento desta doença é um processo silencioso. A visão turva e distorcida são alguns dos sintomas desta patologia. Doenças como a diabetes, a ingestão excessiva de álcool, o tabaco e a exposição prolongada a radiação ultravioleta são alguns dos factores de risco para o aparecimento das cataratas.

Existem dois tipos de catarata:

- catarata adquirida, sendo a mais frequente, a catarata senil: com a idade, as proteínas do cristalino tornam-se insolúveis, constituindo agregados de elevado peso molecular, o que leva a um aumento do índice de refacção do cristalino;
- catarata congénita: relacionada com factores hereditários, com doenças metabólicas pediátricas (galactosemia), com doenças infecciosas da mãe (rubéola, hepatite, papeira, ...), ou com doenças cromosómicas (trisomia 21) [65].

Tratando-se de uma doença cujo tratamento passa pela remoção cirúrgica dos cristalinos, que se encontram total ou parcialmente opacificados, facilmente se conclui que os custos associados a este tratamento são elevados. A cirurgia passa pela remoção do cristalino e pelo implante de uma lente intraocular, pelo que ao pós-operatório se associam problemas inflamatórios e/ou infecciosos.

7.4. Endoftalmite

A endoftalmite é uma infecção intraocular, acompanhada de processo inflamatório envolvendo a cavidade vítrea, podendo afectar a retina e a coróide. Neste processo há uma perda da acuidade visual, edema da córnea, dor, entre outros. As endoftalmites podem ser endógenas, em que o organismo ganha acesso ao olho através da via hematogénica, ou exógenas. Estas são mais frequentes, principalmente após o acto cirúrgico em caso de catarata [79].



Fig. 14 – Aspecto do olho com endoftalmite (retirada de [80]).

Os princípios básicos do tratamento da endoftalmite consistem na aplicação intensiva de antibióticos com o intuito de combater o agente infeccioso e no uso de anti-inflamatórios para limitar o dano causado pela inflamação.

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o uso tópico, subconjuntival e sistêmico de antibióticos não atingem concentrações intravítreas suficientes para tratar a maioria das infecções intraoculares [81, 82]. Muitas vezes o agente infeccioso aloja-se na câmara posterior (cavidade vítrea), pelo que os tratamentos referidos não serão os mais adequados, já que a barreira hemato-retiniana impede a penetração significativa dos antibióticos na cavidade vítrea [83, 84].

Quando o antibiótico é administrado via sistêmica também não se conseguem obter níveis terapêuticos desejáveis; há uma baixa penetração ocular e pouca eficiência [85].

As injeções intravítreas têm sido uma solução de terapia conjunta com os métodos mais convencionais, para as endoftalmites mais agudas [86].

8. Estudos de Citotoxicidade e Viabilidade celular

Como referido anteriormente, um biomaterial necessita de ser biocompatível, biodegradável, não produzir reacções alérgicas e não ser tóxico. Desta forma, foram realizados estudos de viabilidade celular e citotoxicidade para as nanopartículas sem fármacos e encapsulando cada um dos fármacos (Avastin[®] e vancomicina) para macrófagos peritoneais de rato.

8.1. Macrófagos

O sangue contém cinco tipos de células da linhagem branca maduras: linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Os monócitos desenvolvem-se na medula óssea, sendo posteriormente lançados na corrente sanguínea. Quando abandonam a circulação atravessam o endotélio e entram nos tecidos, diferenciando-se em células de grandes dimensões do tecido conjuntivo, designadas macrófagos. Este processo designa-se por diapedese [87, 88]. Esta diferenciação ocorre no caso de ser necessário combater agentes infecciosos; os monócitos deixam a circulação, transformando-se em macrófagos [89].

Os macrófagos medem entre 10 e 30 μm de diâmetro e possuem duas grandes funções: a fagocitose de agentes patogénicos e de células mortas e a apresentação de antigénios a linfócitos T. São células do sistema imunitário, com grande importância na defesa do organismo, apresentando uma elevada capacidade fagocitária e um longo período de circulação, tornando-se células indicadas para a realização de estudos de viabilidade celular e citotoxicidade para testar novos produtos/veículos/fármacos [90].

A Figura 15 mostra a fotografia de macrófagos de rato observada ao microscópio óptico de contraste de fase (MOCF).

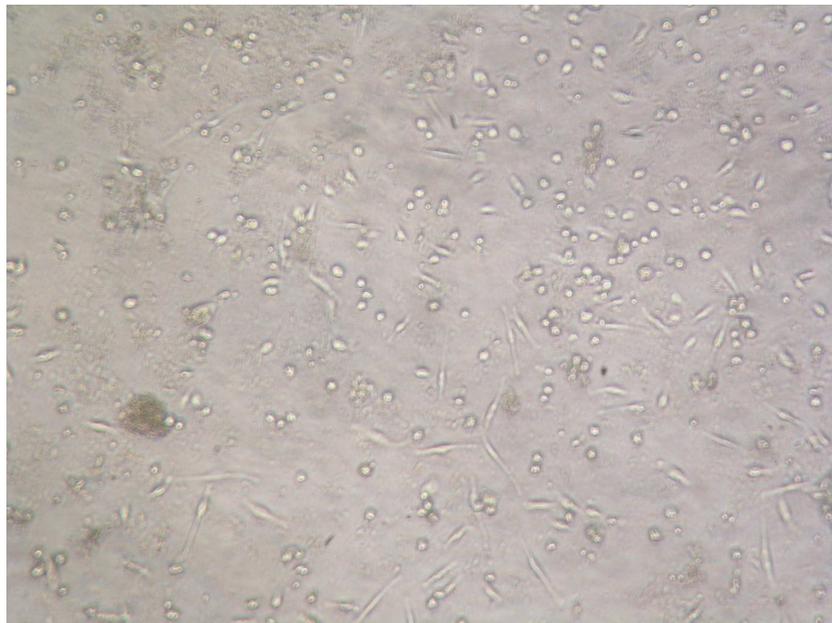


Fig. 15 – Macrófagos de rato observado ao MOCF (100 \times) (fotografia pertencente ao espólio do IBB-IBILI).

8.2. Modelo Experimental

Os vertebrados que normalmente se usam em experimentação animal são as cobaias, os *hamsters*, os ratos e os ratinhos. As duas últimas espécies são as mais escolhidas dado o seu pequeno tamanho, baixo custo, fácil manuseamento e manutenção e elevada taxa de reprodução. Para além destas características, os ratos e ratinhos possuem uma enorme semelhança fisiológica com o ser humano, apresentando 99% dos seus genes iguais aos humanos [91, 92].

Neste contexto, foram utilizados macrófagos peritoneais de rato. Para estudos de viabilidade celular e citotoxicidade destas células, recorreu-se a dois testes: o teste do *Trypan Blue* e o teste do azul de tetrazólio, MTT, [brometo de 3 – (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio].

8.3. Teste do *Trypan Blue*

O teste do *Trypan Blue* é utilizado para distinguir células viáveis de células não viáveis. A membrana citoplasmática das células funciona como uma barreira eficaz para substâncias estranhas e com peso molecular relativamente baixo. A membrana das células não-viáveis encontra-se disrompida, pelo que deixam de funcionar normalmente e absorvem o corante *Trypan Blue*, corando de azul [93]. No entanto, os macrófagos são células fagocitárias e, por isso, vão fagocitar o material estranho que, neste caso, será o corante. Assim, as células viáveis serão as que se apresentam com coloração azul, aquando da observação ao MOCF, ao contrário do que acontece com as outras células numa situação normal, em que as que coram são as não-viáveis.

8.4. Teste do MTT

Utilizou-se o teste colorimétrico do azul de tetrazólio, MTT, que apresenta várias vantagens: é rápido, preciso, fiável, reprodutível e não necessita da utilização de marcadores radioactivos [91, 94]. O MTT é um sal de tetrazólio de cor amarela solúvel em água. A sua molécula possui um anel que é quebrado pela acção das enzimas

desidrogenases das mitocôndrias metabolicamente activas das células viáveis, transformando-o num produto de cor arroxeadada insolúvel em água – cristais de *formazan*. A quantidade de cristais de *formazan* formada é proporcional ao número de células viáveis.

Para a posterior leitura dos resultados, por espectrofotometria, é adicionado isopropanol ácido para a lise celular e conseqüente dissolução dos cristais de *formazan*. [91, 94].

9. Técnicas de caracterização

Após a preparação das partículas deve ser feito um estudo no sentido de as caracterizar. Destacam-se algumas técnicas de caracterização, tais como, microscopia óptica e electrónica de varrimento para análise morfológica e topográfica, sendo que a microscopia electrónica permite uma maior resolução e ampliação das amostras relativamente à microscopia óptica; análise granulométrica para avaliar o tamanho e distribuição das partículas e o DMTA para avaliação das propriedades térmicas das mesmas.

9.1. Microscopia Electrónica de Varrimento

Esta técnica de caracterização permite uma avaliação qualitativa da morfologia e topografia da amostra.

Tecnicamente, um aparelho de *SEM* (*Scanning Electronic Microscope*) possui uma coluna electro-óptica que gera e colima o feixe de electrões, um sistema de vácuo com uma câmara e a amostra e, por fim, um detector de sinais e um sistema onde se gera a imagem. O feixe de electrões gerados incide na amostra, provocando a excitação dos electrões secundários, que resultam da interacção do feixe de electrões com os átomos que constituem a amostra. Estes electrões são colectados por um detector e quantificados, permitindo uma avaliação morfológica e topográfica da amostra com elevada ampliação.

Com uma análise de *SEM* é possível saber se determinada superfície foi ou não modificada. É muito utilizada na caracterização de polímeros incluindo adesivos com deficiências, superfícies fracturadas, rugosas, etc. [29].

9.2. Microscopia óptica

A microscopia óptica permite obter imagens ampliadas das amostras em causa, impossíveis de observar à vista desarmada. Nesta técnica utilizam-se fotões que se propagam na atmosfera, incidem numa lente de vidro ou quartzo fornecendo imagens da amostra com diferentes ampliações.

9.3. Difracção *laser* – *Laser Diffraction Spectrometry (LDS)*

Para análise da distribuição granulométrica a técnica mais usada actualmente é a difracção *laser*. Trata-se de uma técnica rápida no que diz respeito à aquisição dos resultados, eficaz e com grande precisão. A difracção *laser* é uma técnica que se baseia na medição da intensidade da luz dispersada pelas partículas, durante um determinado intervalo de tempo [95, 96].

9.4. Análise dinâmica termomecânica

A DMTA é uma técnica que permite o estudo dessas propriedades mecânicas e térmicas dos materiais, nomeadamente dos materiais poliméricos.

Segundo a *International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry*, esta é uma técnica que mede as respostas elástica e viscosa de uma amostra, sujeita a uma tensão oscilatória ao longo do tempo, temperatura ou frequência de oscilação.

O princípio básico que está por detrás da DMTA é a aplicação de uma força oscilatória à amostra em causa e analisar a resposta elástica e viscosa do material, quando é sujeita a um programa de temperaturas controlado.

Esta técnica permite determinar diversas transições térmicas entre elas e a temperatura de transição vítrea, T_g . Esta temperatura não é mais do que a temperatura à

qual um polímero passa do estado tipo vítreo ao estado tipo borracha. Um polímero não poderia ser aplicado no corpo humano se o seu valor de T_g fosse próximo dos 37°C (temperatura fisiológica), na medida em que deixariam de apresentar rigidez necessária à sua utilização como sistemas de libertação controlada [24, 95, 97, 98].

A DMTA mede então a *stiffness* (rigidez) e o amortecimento (energia perdida sob a forma de calor) dos materiais, normalmente sob um intervalo de temperaturas ou de frequências de oscilação definidas pelo operador [95].

Considere-se a razão $\text{tg}\delta = \frac{\text{energia perdida}}{\text{energia armazenada}}$, que não é mais do que um

factor de dissipação, relacionando as forças viscosas com as elásticas. Um material elástico apresenta uma $\text{tg}\delta$ muito pequena, já um material muito viscoso apresenta um valor de $\text{tg}\delta$ muito elevado.

No equipamento de uma DMTA há a considerar dois *inputs*: a força sinusoidal que ele provoca na amostra, (*stress*) e a força que ele sente (*strain*).

A amostra em estudo é sujeita a uma tensão sinusoidal, σ , obedecendo à equação (1):

$$\sigma = \sigma_0 \sin \omega t \quad (1)$$

Em que σ é a tensão no instante t , σ_0 é a tensão máxima e ω a frequência de oscilação.

No limite de um material elástico, ele sofre uma deformação também sinusoidal:

$$\epsilon(t) = \epsilon_0 \sin(\omega t) \quad (2)$$

Em que $\epsilon(t)$ é a deformação ao longo do tempo e ϵ_0 corresponde à amplitude da deformação.

No entanto, para os materiais que não sejam 100 % elásticos, a resposta à tensão é sentida com uma diferença de fase, δ , relativamente à tensão, tal como representado na Figura 16. Assim:

$$\epsilon(t) = \epsilon_0 \sin(\omega t + \delta) \quad (3)$$

A equação (3) pode ser reescrita da seguinte forma:

$$\epsilon(t) = \epsilon_0 [\sin(\omega t) \cos \delta + \cos(\omega t) \sin \delta] \quad (4)$$

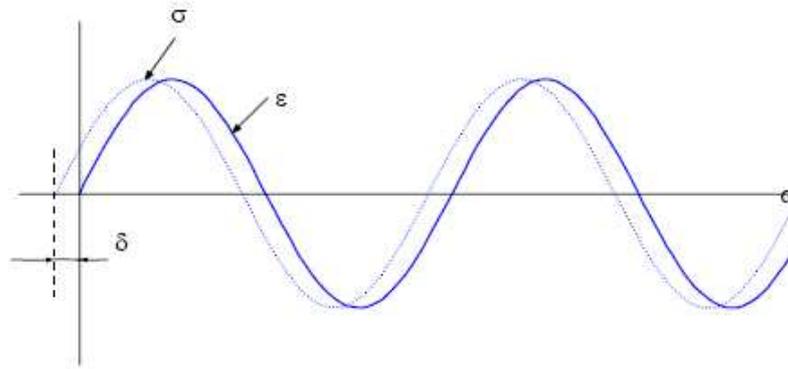


Fig. 16 – Ilustração dinâmica stress/strain.

Materiais completamente viscosos apresentam uma fase de 90° . Caso apresentem comportamento viscoelástico, então a fase situa-se entre 0° e 90° .

Definem-se assim os coeficientes elástico e viscoso, dados pelas equações (5) e (6), respectivamente.

$$\text{Coeficiente elástico } E'(t) = \varepsilon_0 \sin(\delta) \quad (5)$$

$$\text{Coeficiente viscoso } E''(t) = \varepsilon_0 \cos(\delta) \quad (6)$$

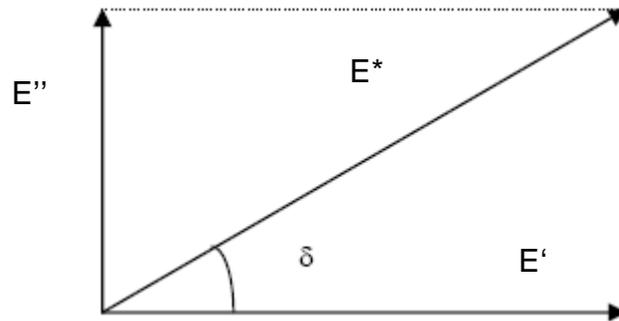
O coeficiente elástico está relacionado com a energia armazenada pela amostra e o coeficiente viscoso relaciona-se com a perda de energia.

Quando $\delta = 0^\circ$ tem-se uma resposta elástica; quando $\delta = 90^\circ$ tem-se uma resposta puramente viscosa.

O vector soma destas duas componentes dá um número complexo:

$$E^* = E' + iE'' \quad (7)$$

A relação (7) pode ser melhor entendida pela figura 17. O significado matemático é óbvio, mas o que significa em termos de comportamento de um polímero?

Fig. 17 – Relação entre E^* , E' e E'' .

Pode concluir-se que quanto maior for ϵ' , mais elástico é o polímero e quanto maior for ϵ'' , então maior será o comportamento viscoso do material.

Uma propriedade importante medida por DMTA é o amortecimento dado por:

$$\operatorname{tg}\delta = \frac{E''}{E'} \quad (8)$$

Capítulo II – Materiais e Métodos

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

1. Materiais e equipamentos

1.1. Reagentes utilizados

- Acetato de sódio (Sigma)
- Ácido acético (Sigma Aldrich)
- Ácido clorídrico (José M. Vaz Pereira, S.A.)
- Ácido clorídrico fumante (Merck)
- Albumina bovina sérica (BSA) (Sigma Aldrich)
- Álcool absoluto para o álcool a 75° (Merck)
- Carbodiimidazol (CDI) -C₇H₆N₄O (Sigma Aldrich)
- Cloreto de cálcio (Riedel - de Haën)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Riedel - de Haën)
- Clorofórmio (José M. Vaz Pereira, S.A.)
- Hidrogenocarbonato de sódio (BDH Chemicals Lda)
- Hidróxido de Sódio (José M. Vaz Pereira, S.A.)
- Isopropanol (Panreac Química)
- L-glutamina (Sigma – 7513)
- Lixívia
- MTT (Sigma Aldrich)
- PBS (Sigma Aldrich – P0883)
- Solução de PBS³ estéril preparada com:
 - cloreto de sódio (Sigma)
 - hidrogenofosfato de sódio (Merck);
 - hidrogenofosfato de potássio (Merck)
- Penicilina/estreptomicina (Sigma – P0781)
- PLA comercial (Nature Works LLC)
- Poli (álcool vinílico 80% hidrolisado (Sigma Aldrich)

³ Solução de PBS preparada com 7,2 g de cloreto de sódio (NaCl), 1,48 g de hidrogenofosfato de sódio (Na₂HPO₄) e 0,43 g de hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) para 1 l de solução.

- Reagente de Bradford (Sigma Aldrich)
- RPMI 1640 (Sigma Aldrich)
- Soro bovino fetal (Gibco – 10270)
- *Trypan blue* (Sigma – T8154)

1.2. Substâncias Activas

As substâncias activas escolhidas para encapsular nas nanopartículas de PLA foram o Avastin[®] e a vancomicina. Estas substâncias são dois fármacos com diferentes objectivos.

- **Avastin[®] – (*bevacizumab*)**

O Avastin[®] é um anticorpo monoclonal recombinante humanizado produzido por tecnologia de ADN (ácido desoxirribonucleico) em células de ovário de *hamster* chinês. É um inibidor do crescimento vascular endotelial, bloqueando o crescimento de tumores precisamente pela inibição da formação de novos vasos sanguíneos.

Apresenta um peso molecular de 149 kD, o que dificulta a sua passagem pelas barreiras retinianas.

Este fármaco foi aprovado pela *Food and Drugs Administration* (FDA) dos EUA em 2004 e pela Agência Europeia em 2007, tendo sido utilizado em algumas doenças de foro oncológico, nomeadamente no cancro colo-rectal, da mama e dos pulmões. Mais recentemente, começou a ser usado no tratamento da DMRI e da RD, embora sem a aprovação formal da FDA. O Avastin[®] é administrado através de injeções intravenosas ou intravítreas, no caso das doenças oftalmológicas. Dependendo do caso clínico, o tratamento com este fármaco é muitas vezes complementado com quimioterapia. Desta forma consegue-se inibir a angiogénese e, assim, diminuir o crescimento do tumor.

Neste trabalho procurou-se encapsular este fármaco em nanopartículas que pudessem ser administradas por injeções intravítreas, mas diminuindo o seu número. Para este efeito, a libertação deveria ser lenta, mas eficaz.

○ Posologia

Para o tratamento da DMRI, são vulgarmente administradas três injeções com 0,05ml de uma solução a 25mg/ml com um intervalo de quatro a seis semanas. No entanto, a terapia instituída com este fármaco varia de acordo com a patologia [99].

• Vancomicina

A vancomicina é um antibiótico glicopetídico tricíclico, obtido a partir de culturas de *Nocardia orientalis* (*Streptomyces orientalis*). Tem a fórmula molecular $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$ e um peso molecular de 1 449 kD (Fig 18). Na forma de cloridrato é altamente solúvel em água e insolúvel em éter e clorofórmio.

É usada no tratamento de infecções causadas por microrganismos *Gram-positivos* [77].

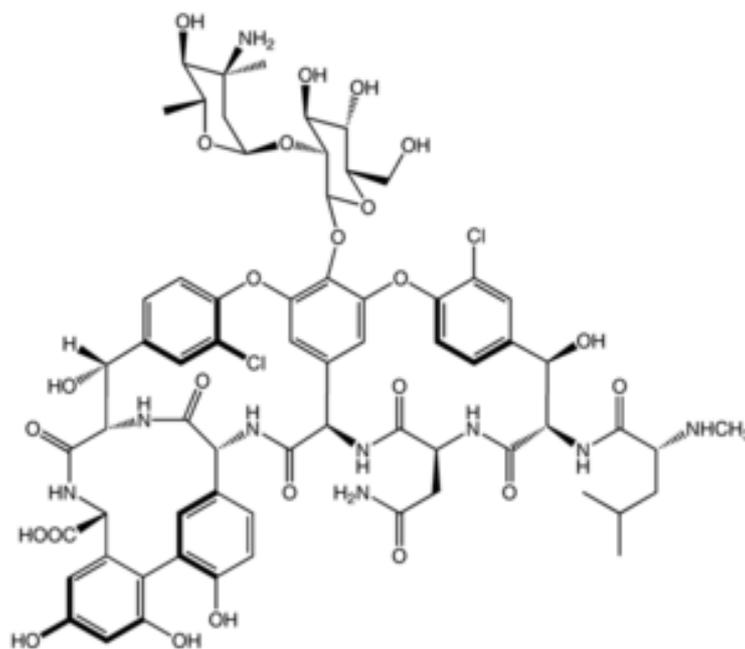


Fig. 18 – Estrutura molecular da vancomicina (retirada de [100]).

A vancomicina apresenta características de um fármaco ideal no tratamento da endoftalmite bacteriana, já que apresenta boas propriedades bactericidas, um amplo espectro de acção e uma excelente relação actividade terapêutica/toxicidade após injeção intravítrea [100].

O encapsulamento deste fármaco, em nanoesferas teve como principal objectivo reduzir o número de injeções intravítreas, mantendo as concentrações terapêuticas adequadas ao tratamento da doença em causa.

Para posterior quantificação deste fármaco nos estudos de libertação controlada, começou por fazer-se um varrimento de c.d.o. UV/vis, confirmando-se um pico nos 280 nm.

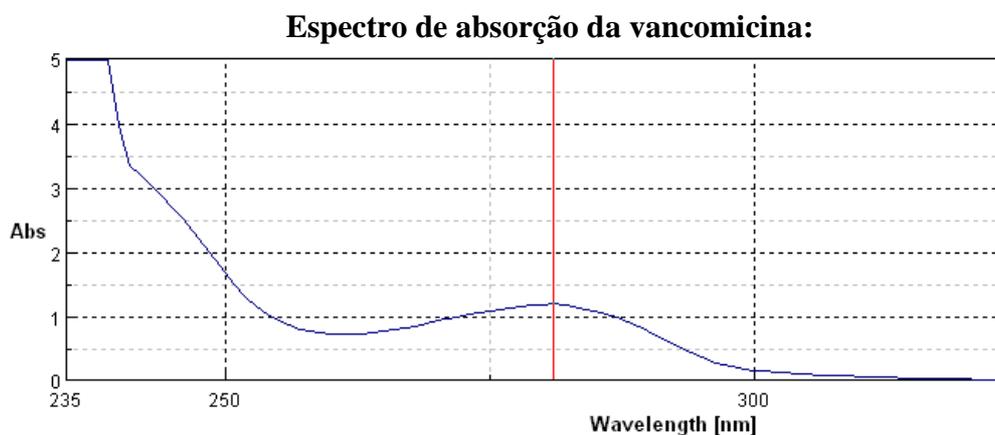


Fig. 19 – Espectro de absorção da vancomicina.

○ Posologia

A posologia geral da vancomicina (500 mg) varia com a via de administração, no entanto a quantidade de antibiótico a usar irá depender da gravidade da inflamação/infecção [25].

- **Via oral ou intravenosa:** dose diária de 2 000 mg, divididos em 500 mg a cada seis horas, ou em 1 000 mg de doze em doze horas. O tratamento não deve exceder os sete dias.

- **Subconjuntival:** prepara-se uma solução dissolvendo 500 mg de fármaco em 10 ml de água destilada; são injectados 25 mg (0,5 ml)

- **Intravítrea:** prepara-se uma solução dissolvendo 500 mg de fármaco em 10 ml de água destilada; são injectados 2,5 mg.

1.3. Equipamentos

- Água milliQ – Millipore milliQ 50
- Aparelho de ultrassons – Sonics & Materials Inc. Vibra Cells
- Autoclave – Varioklav 400
- Balanças de precisão:
 - Precisa 125 A SCS
 - Sartorius LE 225 D
 - Kern 770
- Câmara de fluxo laminar - Holten LaminAir HB 2448
- Câmara de *Neubauer* – Improved Neubauer Bright Line, deep 1/10 mm, Boeco
- Centrífuga – Z366 Hermle Laborotechnik
- Centrífuga dos macrófagos – Heraeus-Multifuge 1 L-R
- DMTA – Triton Tritec 2000
- Destilador de água destilada – Millipore, Tank MPK01
- Espectrofotómetro UV/Vis V – 530 Jasco;
- Espectrofotómetro – *MicroElisa SLT* - Labinstruments Ges m b H, Salzburg
- Espectrofotómetro – *Biotek Synergy HT* com o *hardware Gen5*
- Estufa de CO₂ – Thermo electron corporation, Hera Cell 150
- Estufa de vácuo - WTB binder – Tuttlingen, Germany
- Estufa de secagem do material – Heraeus T 6060
- Homogeneizer – Ultra-Turrax T25 S5 Janke & Kunkel Ika-Labortechnik
- Liofilizador – Snijders Scientific, Tilburg Holland
- Máquina de gelo – Ziegra Eis Maschinen ZBE 70-35
- Medidores de pH :
 - Denver Instrument, model 15
 - Jenway 3510 pH meter
- Microscópio óptico – *Olympus BH-2*
- Microscópio óptico – *Nikon* eclipse TS 100 com câmara fotográfica *Nikon*, *Coolpix 5400* incorporada
- *Scanning Microscope 5310* da Jeol (SEM)
- *Submicron Coulter Analyser N4 Plus* da *Beckman Coulter*

- *Termoshaker – Gerhardt (Laboshake)*

1.4. Material

- Filtros de porosidade inferior a 0,22 μm (Watman® Schleicher & Shuell FP 30/0,2 CA-S, Dassel, Germany)
- Tubos *falcon* (Falcon plastics, Los Angeles, CA, USA)

2. Preparação dos sistemas de libertação controlada

2.1. Preparação das nanopartículas

Neste trabalho utilizou-se a técnica da **emulsão simples** para a preparação das micro/nanoesferas sem substância activa e a técnica da **dupla emulsão** para a preparação das micro/nanopartículas encapsuladas com o fármaco. Foi possível utilizar esta técnica dado que ambos os fármacos são hidrofílicos.

Na preparação de partículas de PLA e de alguns co-monomeros foi utilizado o método de emulsão óleo-em-água (O/W), seguida de evaporação do solvente [43, 62, 101]. Este método consiste em emulsionar a fase orgânica (polímero+solvente orgânico) na fase aquosa, a uma velocidade de agitação elevada, durante um curto período de tempo. A emulsão é depois colocada a agitar, a baixa velocidade, durante algumas horas para permitir a evaporação do solvente. O produto final é centrifugado e lavado abundantemente com água destilada.

Preparou-se uma solução aquosa de PVA, (hidrolisado a 80 %) a 1 %; dissolveu-se uma determinada quantidade de PLA em 10 ml de clorofórmio; levou-se a solução de PVA ao *homogeneizer*, durante 10 minutos a 8 000 rpm. Adicionou-se, gota a gota, o PLA dissolvido no clorofórmio e sob agitação do *homogeneizer*; após a adição do PLA, prolongou-se a agitação durante mais 5 minutos a 8 000 rpm.

Levou-se a emulsão para agitação magnética, durante cerca de 4 horas, a 700 rpm, a fim de evaporar o solvente (clorofórmio); centrifugou-se a 5 000rpm e procedeu-se à lavagem e respectiva centrifugação (2 vezes) do produto final, com água destilada.

Este procedimento foi repetido fazendo variar as concentrações do PVA, do PLA e da velocidade de rotação mecânica.

Realizaram-se as mesmas preparações para os co-polímeros de PLGA e PLA- γ HB.

Na Tabela 2 encontra-se o resumo das várias preparações.

Tabela 2 – Resumo das várias preparações de partículas de PLA.

Polímero	Fase Orgânica (O)	Fase Aquosa (W)	Notas
PLA1	0,25 g PLA 10 ml CHCl ₃	0,5g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h
PLA2	0,50 g PLA 10 ml CHCl ₃	0,5g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h
PLA3	0,35 g PLA 10 ml CHCl ₃	0,5g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota; (O) <i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min; Agitação magnética 500 rpm, 4 h
PLA4	0,25 g PLA 10 ml CHCl ₃	1,0g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h
PLA5	0,35 g PLA 10 ml CHCl ₃	1,0g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h
PLA7	0,25 g PLA 10 ml CHCl ₃	0,5g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 13 500 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 13 500 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h
PLA 8	0,25 g PLA 10 ml CHCl ₃	0,5g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 20 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 20 000 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h

Nota: No Anexo 1, encontram-se tabelas semelhantes para a preparação das partículas de PLGA e PLA- γ HB. A nomenclatura numérica utilizada corresponde às condições de preparação das partículas da tabela 1. Isto é, por exemplo, a PLA2, PLGA2 e PLA γ HB 2 foram todas preparadas nas mesmas condições, variando apenas o polímero.

Algumas partículas produzidas foram observadas por microscópio óptico e fez-se a análise granulométrica de algumas delas, por difracção *laser*.

Chegado a este ponto do decorrer dos trabalhos fez-se um ponto da situação: era necessário definir o polímero a utilizar e tentar reduzir um pouco mais o tamanho das partículas.

De entre os diferentes polímeros, PLA, PLA γ HB e PLGA, escolheu-se o primeiro. Esta escolha justifica-se essencialmente por dois motivos: o primeiro relaciona-se com o facto deste ser sintetizado no laboratório de do departamento de Engenharia Química pela Eng.^a Dina Marques que se encontra a realizar um doutoramento na área da produção de PLA. Este polímero foi obtido por polimerização de reacção gradual do monómero, ácido láctico, usando acetato de zinco como catalisador da reacção; apresentando um peso molecular de 26 000 e um índice de heteroregularidade de 2,6 determinados por SEC; o segundo prende-se com as vantagens já mencionadas anteriormente.

No sentido de reduzir o tamanho das partículas, utilizou-se um outro equipamento que, entretanto, chegara ao laboratório – um ultrassonificador. Com este aparelho as emulsões não ficam sujeitas a agitação mecânica, mas a ultrassons.

A preparação das partículas seguiu o mesmo protocolo anterior, tendo-se substituído o *homogeneizer* pelo ultrassonificador, já que este aparelho permite atingir tensões de corte muito superiores ao do *homogeneizer*.

A Tabela 3 mostra o resumo do procedimento para a preparação das nanopartículas.

Preparação de nanopartículas de PLA-lab utilizando um ultrassonificador

Tabela 3 – Resumo da preparação de partículas de PLA-lab com ultrassonificador.

Polímero	Fase Orgânica (O)	Fase Aquosa (W)	Notas
PLA-lab	0,25 g PLA-lab 10 ml CHCl ₃	0,5 g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>ultrassonificador</i> , 5 min (W); Adicionar o PLA gota a gota; (O) <i>ultrassonificador</i> , 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 18 h

Nota: utilizou-se o mesmo procedimento para produção de partículas de PLA comercial, que serviu de controlo.

Após a preparação das partículas procedeu-se à análise granulométrica de várias amostras: de algumas que tinham sido preparadas com o *homogeneizer* e estas com o ultrassonificador.

Dado que as partículas preparadas com ultrassons se apresentavam significativamente menores, passou a utilizar-se sempre este equipamento.

Após a preparação das nanopartículas sem substâncias activas procedeu-se à preparação de dois tipos de nanoesferas, umas com Avastin[®] e outras com vancomicina. Além disso, a modificação da superfície das nanoesferas sem fármaco encapsulado, por ligação covalente do Avastin[®]. Antes, porém, da utilização destes fármacos, fizeram-se alguns ensaios de encapsulamento e de modificação da superfície usando BSA e caso houvesse sucesso, então utilizar-se-iam as substâncias activas.

O facto de se ter começado por usar a BSA deve-se, essencialmente, a duas razões: ao elevado custo do Avastin[®] e ao tempo e à dificuldade em adquiri-la.

2.2. Encapsulamento das substâncias activas nas partículas: procedimento geral

Para se proceder ao encapsulamento da substância activa nas partículas utilizou-se o método da dupla emulsão água-em-óleo-em-água (W₁/O/W₂) [101-103], seguida de evaporação do solvente. Neste método, a solução aquosa da substância activa (W₁) é emulsionada na solução orgânica (polímero+solvente orgânico), sob agitação forte, formando-se uma emulsão do tipo água-em-óleo (W₁/O). Esta emulsão é adicionada a uma segunda fase aquosa (W₂), sob agitação forte, formando-se uma emulsão do tipo

água-em-óleo-em-água ($W_1/O/W_2$). De seguida, esta emulsão é colocada a agitar, a baixa velocidade, durante algumas horas para promover a evaporação do solvente (Fig. 20). O produto final é centrifugado e lavado abundantemente com água destilada.

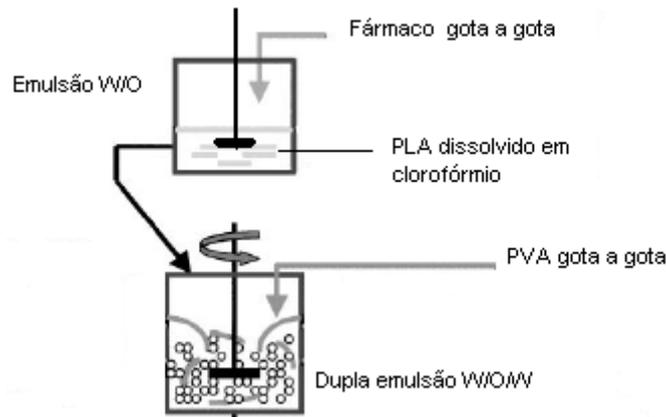


Fig. 20 – Diagrama esquemático da preparação de partículas utilizando o método da dupla emulsão ($W/O/W$) (adaptada de [103]).

2.2.1. Encapsulamento da BSA em partículas de PLA-lab

Preparou-se uma solução de PLA 30 mg/ml em clorofórmio; adicionaram-se 5 ml de solução aquosa de BSA (W_1), gota a gota e sob agitação mecânica (8 000rpm) a 30 ml de solução de PLA (O).

Esta emulsão foi adicionada gota a gota e sob agitação a 80 ml de solução aquosa de PVA a 2 %, formando-se a dupla emulsão $W_1/O/W_2$ [102, 104, 105]. A fim de evaporar o solvente orgânico, manteve-se em agitação durante 4 h à temperatura ambiente. As micropartículas formadas foram recolhidas por centrifugação (5 000 rpm, durante 10 min), ressuspensas em água destilada e novamente centrifugadas para proceder à sua lavagem. Repetiu-se este processo de lavagem duas vezes para garantir a remoção do solvente orgânico.

Na Tabela 4 estão apresentados os procedimentos para encapsular a BSA nas partículas de PLA.

Tabela 4 – Procedimentos testados para encapsulamento da BSA nas partículas de PLA.

Polímero+ Subs. Activa	Fase Aquosa (W ₁)	Fase Orgânica (O)	Fase Aquosa (W ₂)	Notas
PLA-BSA	BSA a 2 % (m/V) 5 ml	1,5 g PLA 50 ml CHCl ₃ 30 ml	2,0 g PVA80 100 ml H ₂ O 80 ml	<i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min (W ₁ /O). <i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min (W ₁ /O/W ₂) Agitação magnética 700 rpm, 4 h
PLA-BSA	BSA a 2 % (m/V) 1,5 ml	1,5 g PLA 50 ml CHCl ₃ 10 ml	2,0 g PVA80 100 ml H ₂ O 25 ml	<i>Homogeneizer</i> 13 500 rpm, 5 min (W ₁ /O). <i>Homogeneizer</i> 13 500 rpm, 5 min (W ₁ /O/W ₂) Agitação magnética 700 rpm, 4 h

2.2.2. Encapsulamento da vancomicina nas partículas de PLA-lab

O encapsulamento da vancomicina nas partículas de PLA-lab foi feito, igualmente, através de uma dupla emulsão água-em-óleo-em-água (W₁/O/W₂), seguida de evaporação do solvente [101, 103].

Preparou-se uma solução de PLA-lab 25 mg/ml em clorofórmio; dissolveram-se 0,5 g de fármaco em 100 ml de água. Adicionaram-se 5 ml de solução de vancomicina (W₁), gota a gota e sob acção do ultrassonificador a 10 ml de solução orgânica (O); esta emulsão foi adicionada gota a gota e sob ultrassonificação a 30 ml de solução aquosa de PVA a 0,5 %, formando-se a dupla emulsão W₁/O/W₂. A fim de evaporar o solvente orgânico, manteve-se em agitação magnética durante 18 h à temperatura ambiente;

As nanopartículas formadas foram recolhidas por centrifugação (7 000 rpm, durante 10 min), ressuspensas em água destilada e novamente centrifugadas para proceder à sua lavagem; repetiu-se este processo de lavagem duas vezes e liofilizaram-se as amostras.

Na tabela 5 são apresentados os procedimentos utilizados para encapsular a vancomicina nas partículas de PLA-lab.

Tabela 5 – Procedimentos testados para encapsulamento da vancomicina nas partículas de PLA-lab.

Polímero+ Fármaco	Fase Aquosa (W ₁)	Fase Orgânica (O)	Fase Aquosa (W ₂)	Notas
PLA/vancomicina	vancomicina a 0,5 % (m/V) 5 ml	1,25 g PLA 50 ml CHCl ₃ 10 ml	0,5 g PVA80 100 ml H ₂ O 30 ml	(o) <i>no Ultrassonificador</i> , 5 min e adicionar a vancomicina gota a gota (5 min). (W ₁ /O) W2 <i>no Ultrassonificador</i> , 5 min e adicionar a (W ₁ /O) para formar (W ₁ /O/W ₂) Agitação magnética 700 rpm, 18 h

2.2.3. Encapsulamento do Avastin[®] nas partículas de PLA-lab

A outra substância activa – Avastin[®] – foi encapsulada exactamente da mesma maneira, registando-se na Tabela 6 as quantidades utilizadas para o mesmo. Realça-se o facto deste fármaco se apresentar em solução aquosa com uma concentração inicial de 25 mg/ml.

Tabela 6 – Procedimentos testados para encapsulamento da Avastin[®] nas partículas de PLA-lab.

Polímero+ Fármaco	Fase Aquosa (W ₁)	Fase Orgânica (O)	Fase Aquosa (W ₂)	Notas
PLA/Avastin [®]	Avastin [®] a 2,5 % (m/V) 1,0ml	1,25 g PLA 50 ml CHCl ₃ 10 ml	0,5 g PVA80 100 ml H ₂ O 30 ml	(o) <i>no Ultrassonificador</i> , 5 min e adicionar o Avastin [®] gota a gota (5 min). (W ₁ /O) W2 <i>no Ultrassonificador</i> , 5 min e adicionar a (W ₁ /O) para formar (W ₁ /O/W ₂) Agitação magnética 700 rpm, 4 h.

Após o encapsulamento dos fármacos deu-se início aos procedimentos a adoptar para os estudos de libertação dos mesmos. Preparou-se uma solução de lágrimas artificiais, uma vez que esta apresenta uma concentração de electrólitos semelhante à encontrada no corpo humano [106].

2.3. Estudos de libertação controlada

2.3.1. Preparação de lágrimas artificiais

As lágrimas artificiais foram preparadas de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1 – Quantidades usadas na preparação de lágrimas artificiais.

Sal	mg/l	Quantidades efectivas
NaCl	6,7	6,7046
KCl	1,0	1,0190
NaHCO ₃	2,0	2,0056
CaCl ₂ .H ₂ O	0,08	0,0803

Para a preparação de 1 litro desta solução pesaram-se estas quantidades dos diferentes sais que se dissolveram em água destilada e ajustou-se o pH a 7,5 com solução de HCl 1M.

Procedeu-se à elaboração de uma curva de calibração da vancomicina, em lágrimas artificiais (Anexo 2).

2.3.2. Eficiência de encapsulamento e *Drug loading*

Para avaliar a eficiência de encapsulamento e o *drug loading* prepararam-se duas amostras de PLA-lab com vancomicina (V1 e V2) e duas com Avastin[®] (A1 e A2).

Depois de preparadas de acordo com os procedimentos descritos e, após a primeira centrifugação, recolheu-se o sobrenadante e leu-se a sua absorvância.

Depois de lavadas, as amostras foram liofilizadas.

A eficiência de encapsulamento foi calculada de acordo com a equação 9 [104, 107, 108].

$$Eficiência = \frac{M_{\text{fármaco encapsulado}}}{M_{\text{fármaco inicialmente adicionado}}} \times 100 = \frac{M_{\text{fármaco inicialmente adicionado}} - M_{\text{fármaco não encapsulado}}}{M_{\text{fármaco inicialmente adicionado}}} \times 100 \quad (9)$$

Onde $M_{\text{fármaco encapsulado}}$ corresponde à massa de fármaco encapsulada, determinada pela diferença entre a massa de fármaco inicialmente adicionado, $M_{\text{fármaco inicialmente adicionado}}$, e a massa de fármaco não-encapsulado, $M_{\text{fármaco não encapsulado}}$, esta é determinada por espectrofotometria.

$$\text{Drug loading} = \frac{M_{\text{fármaco encapsulado}}}{M_{\text{nanopartículas encapsuladas}}} \times 100 \quad (10)$$

A equação (10) permite determinar o *drug loading*. O parâmetro $M_{\text{nanopartículas encapsuladas}}$ corresponde à massa seca de nanopartículas que contêm o fármaco encapsulado.

2.3.3. Estudo da cinética de libertação da proteína

Para os estudos de libertação dos dois fármacos foram utilizadas partículas de PLA-lab com Avastin® e PLA-lab com vancomicina, preparadas de acordo com o procedimento descrito na página 50 [105, 109].

Em primeiro lugar fez-se um varrimento com o espectrofotómetro UV/vis, do PLA dissolvido em clorofórmio, no sentido de averiguar se haveria ou não absorção próxima da dos fármacos utilizados.

Depois, pesaram-se entre 10 e 30 mg de três amostras preparadas anteriormente, fazendo-se dois ensaios para cada uma delas: V1, A1 e A2. Colocou-se, cada uma delas, em tubos de ensaio (*Eppendorf Centrifuge*), e adicionaram-se 3,0 ml de solução de PBS; fecharam-se os tubos e colocaram-se num *shaker* a 37° C. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, retiraram-se os tubos e centrifugaram-se as amostras a 6 000 rpm, durante 5 min. Removeu-se periodicamente uma alíquota de sobrenadante (2,0 ml) e substituiu-se o meio com igual volume de PBS fresco.

A quantificação do fármaco em solução foi feita por espectrofotometria com o equipamento *UV/Vis Spectrophotometer V- 530 Jasco*. Para a quantificação da

vancomicina relacionaram-se os valores da absorvância obtidos com a curva padrão do respectivo fármaco em PBS, a 280 nm.

Para a quantificação do Avastin[®] utilizou-se a curva padrão do reagente de *Bradford*, em PBS, a 595 nm.

2.4. Modificação da superfície de PLA

O objectivo com a modificação da superfície de PLA era a produção de um profármaco. O fármaco ficaria ligado a determinados grupos livres à superfície das nanoesferas; o outro terminal do fármaco ligar-se-ia às moléculas de interesse. No caso concreto, quantificaram-se os grupos carboxílicos livres à superfície das nanoesferas do polímero; estes grupos foram activados para se poder estabelecer a ligação da proteína através dos seus grupos amínicos (Fig.21).

A modificação da superfície das partículas de PLA baseou-se na ligação covalente dos grupos carboxílicos livres à sua superfície, com os grupos amínicos da proteína em causa [15, 110]. Para isso, tornou-se necessário quantificar os grupos carboxílicos livres à superfície das partículas do polímero, para se poder perceber se era ou não possível ligar alguma proteína.

2.4.1. Quantificação dos grupos carboxílicos

No sentido de determinar a quantidade de grupos carboxílicos à superfície das partículas de PLA, procedeu-se do seguinte modo: preparou-se uma solução de NaOH a 0,01 M; pipetaram-se 10 ml para vários gobelés. Colocou-se uma determinada quantidade de partículas em cada um dos gobelés anteriores. Reservou-se um copo que serviu como branco, pelo que neste não foi colocada nenhuma amostra. Deixou-se em reacção durante 20 h e a 4° C [110].

Preparou-se uma solução de HCl a 0,01 M e procedeu-se à titulação das soluções contendo as partículas; após a titulação, as amostras foram filtradas e secas numa estufa a 30° C.

Esta quantificação permitiu, por um lado, verificar a existência de grupos – COOH e, por outro lado, quantificá-los, determinando assim o número de grupos possível para reacção com os grupos amina da BSA:

2.4.2. Ligação covalente da BSA à superfície das partículas

Procedeu-se então à ligação da proteína à superfície das partículas. Para isso, preparou-se uma solução tampão com acetato de sódio 0,01 M e ácido acético, ajustando-se o pH a 4,6; adicionaram-se 100 mg de BSA a 100 ml de solução tampão (solução-mãe) [110].

Adicionou-se a amostra de PLA (partículas filtradas e secas após titulação), a 10 ml da solução anterior (BSA + solução tampão) e juntou-se cerca de 30 mg (0,0351 g) de CDI a fim de activar os grupos carboxílicos. Guardou-se esta mistura no frigorífico (a 4° C), durante alguns dias, durante os quais se deu a reacção entre os grupos carboxílicos da amostra de PLA e os grupos amínicos da BSA.

A quantificação de proteína em solução foi determinada por espectrofotometria, usando o reagente de *Bradford* [111, 112].

A Figura 21 ilustra a reacção entre os grupos carboxílicos das partículas de PLA e os grupos amínicos da proteína.

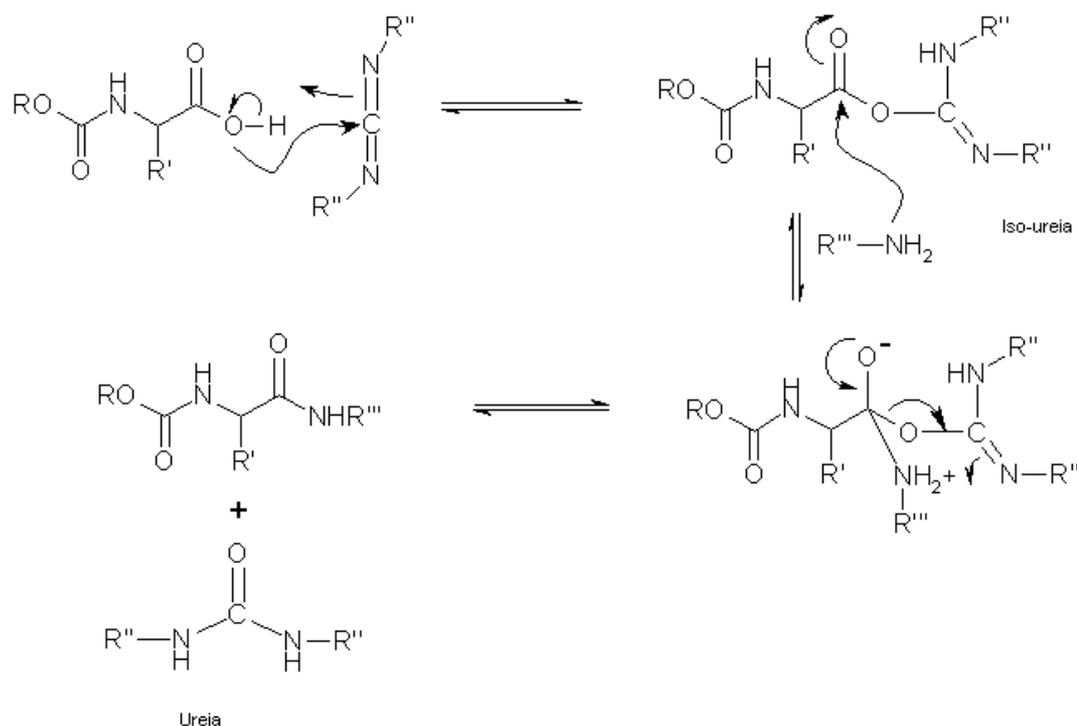


Fig. 21 – Reacção entre os grupos carboxílicos das partículas de PLA e os grupos amínicos da proteína (adaptada de [113]).

2.4.3. Quantificação de BSA – método do Reagente de *Bradford*

O reagente de *Bradford* pode ser usado para a determinação da concentração de proteínas em solução. Este método baseia-se na formação de um complexo entre o reagente e a proteína em solução. Este complexo apresenta um máximo de absorvância entre os 465 a 595 nm. A absorvância é proporcional à proteína presente. Seguiu-se o protocolo da ficha técnica na bula do próprio reagente [112].

Assim, foi construída uma curva de calibração da seguinte forma: numeraram-se 6 tubos de ensaio, de 0 a 5; o tubo nº 0 era o branco, contendo apenas solução tampão e o reagente de *Bradford*; nos restantes tubos foram colocadas soluções de BSA com diferentes concentrações, partindo da solução mãe. Mediram-se as absorvâncias por espectrofotometria e traçou-se a curva de calibração [110] (Anexo 3).

3. Caracterização das partículas

3.1. Microscopia óptica

Após terem sido preparadas as primeiras esferas de PLA, colocou-se uma gota da suspensão de partículas e procedeu-se à sua visualização, com o microscópio óptico *Olympus BH-2* disponibilizado pelo IPN. Esta primeira caracterização teve como principal objectivo observar a esfericidade das partículas.

3.2. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

Para esta caracterização colocaram-se as partículas secas sobre uma fita de carbono num suporte apropriado, sendo depois revestidas com uma fina camada de ouro. As análises decorreram num aparelho *Scanning Microscope JSM-5310* da *Jeol*, com uma voltagem de 25 kV. As ampliações utilizadas foram de 2 000 x, 5 000 x, 1 000 x, 15 000 x, 20 000 x e 35 000 x.

3.3. Difracção laser

As primeiras amostras foram observadas com o equipamento *Laser diffraction - Equipment Mastersizer 2000 MU*, do Departamento de Engenharia Química da FCTUC, no entanto, para o uso deste equipamento, era necessário uma grande quantidade de amostra em solução, para além de não possibilitar uma leitura para partículas dentro da escala nanométrica.

Posteriormente utilizou-se o *PCS Submicron Coulter Analyser* da *Beckman Coulter* disponibilizado pela *BluePharma – Indústria Farmacêutica, S.A.*. Com este aparelho, utiliza-se uma pequena quantidade de partículas em suspensão (10 µl de amostra + 3 µl de água bidestilada).

3.4. Análise dinâmica termomecânica – DMTA

As análises térmicas por DMTA foram realizadas num equipamento *Triton Tritec 2000* em *single cantilever mode* com o recurso a material pocketes a uma velocidade de aquecimento de 10° C/min.

As amostras analisadas foram as seguintes:

PLA-lab, PLA-lab com Avastin[®] e PLA-lab com vancomicina.

4. Estudos de Citotoxicidade e Viabilidade celular

Os estudos de citotoxicidade e viabilidade celular envolvem uma sequência de procedimentos que a seguir se expõem.

4.1. Protocolo para colheita, isolamento e “cultura” para macrófagos peritoneais de rato *Wistar*⁴

Todos os procedimentos referentes a este estudo devem ocorrer em ambiente totalmente estéril recorrendo-se à utilização de uma câmara de fluxo laminar, em instalações próprias numa sala de cultura celular.

- **Procedimento para a utilização da câmara de fluxo laminar**

Antes de se iniciar o trabalho experimental deve ligar-se a luz ultravioleta dentro da câmara durante cerca de 15 a 30 min. Procede-se à sua limpeza tanto no seu interior como o vidro frontal de chumbo, por dentro e por fora, com álcool a 75° para garantir a esterilidade de todo o ambiente da câmara.

Todo o material colocado no interior da câmara deve ser aspergido com a mesma solução alcoólica de forma a destruir ou inactivar os microrganismos que possam estar presentes. Dentro da câmara só se pode trabalhar de luvas. As luvas devem ser

⁴ - Estudos realizados com a colaboração do IBB-IBILI

igualmente aspergidas com álcool a 75° antes de entrarem na câmara e de cada vez que se retirem para o exterior.

No final de cada utilização deve voltar-se a limpar a câmara com álcool a 75°, como descrito anteriormente, e deixar-se a luz ultravioleta ligada, ficando em condições de ser usada por outros utilizadores. Para limpezas periódicas mais profundas deve usar-se a espuma *Steri Guard* (sterile 70% isopropyl Alcohol in purified water+nitrogen propellant – Guardine Technology Ltd) [92].

4.1.1. Sacrifício do animal

Os ratos *Wistar* machos, com cerca de dois meses de idade, foram previamente sujeitos a uma *overdose* anestésica no interior de uma câmara de vidro onde, algum tempo antes, se tinha colocado uma bola de algodão embebido em clorofórmio, durante cerca de 10 minutos, induzindo paragem cardiorespiratória indolor⁵.

4.1.2. Colheita e isolamento de macrófagos peritoneais de rato

○ Esterilização do material e reagentes

Todo o material a utilizar na colheita, isolamento e “cultura” de macrófagos, bem como o PBS, deve ser esterilizado em autoclave durante 20 min a 120° C. Os restantes reagentes e o meio de cultura (RPMI completo) são esterilizados por filtração com filtros de porosidade inferior a 0,22 µm.

○ Armazenamento dos reagentes

O meio de cultura RPMI completo ou incompleto, o PBS e o isopropanol ácido são refrigerados a 4° C. O MTT, protegido da acção da luz com papel de alumínio uma vez que é fotossensível, o soro fetal bovino (FCS), a solução de antibiótico e a L-glutamina são mantidos a uma temperatura entre -15° C e 20 ° C. À medida que foram necessários, os reagentes eram colocados em suportes apropriados num banho de água quente (com

⁵ De acordo com os procedimentos recomendados pela legislação nacional e internacional sobre o Bem-estar animal em experimentação.

um agente antifúngico) a fim de atingirem a temperatura de 37° C [114], uma vez que devem ser utilizados a esta temperatura para imitar as condições fisiológicas.

- **Colheita e isolamento de macrófagos peritoneais de rato**

Após ser colocado todo o material necessário para a experiência no interior da câmara de fluxo laminar (dedicada para o efeito), encheram-se quatro seringas de 10 ml devidamente adaptadas a agulhas de 21 G*1 com PBS estéril.

O rato foi retirado da câmara de vidro e aspergido com álcool a 75° e colocado em decúbito dorsal sobre um suporte com resguardo, previamente preparado. O tabuleiro e o animal foram novamente aspergidos com álcool a 75° e colocados no interior da câmara de fluxo laminar [92, 115].

Utilizando as seringas de 10 ml com agulhas de 25 G*5/8, injectaram-se 40 ml de PBS estéril na região peritoneal do rato com o cuidado de não atingir nenhum órgão ou algum vaso sanguíneo (Fig. 22 A). Após massagens suaves na zona abdominal, durante 1 a 2 minutos, para activação dos macrófagos, recolheu-se a suspensão celular (Fig. 22 B e C) com a ajuda de uma agulha 19 G*1 (devido ao tamanho dos macrófagos). O volume colhido foi colocado num tubo(s) *falcon* de 15 ml previamente identificado(s) e colocou-se em gelo picado. A suspensão celular foi centrifugada a 1 100 rpm, durante 10 min., a 4° C. Após centrifugação descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em meio de cultura RPMI a 10 % completo [114].

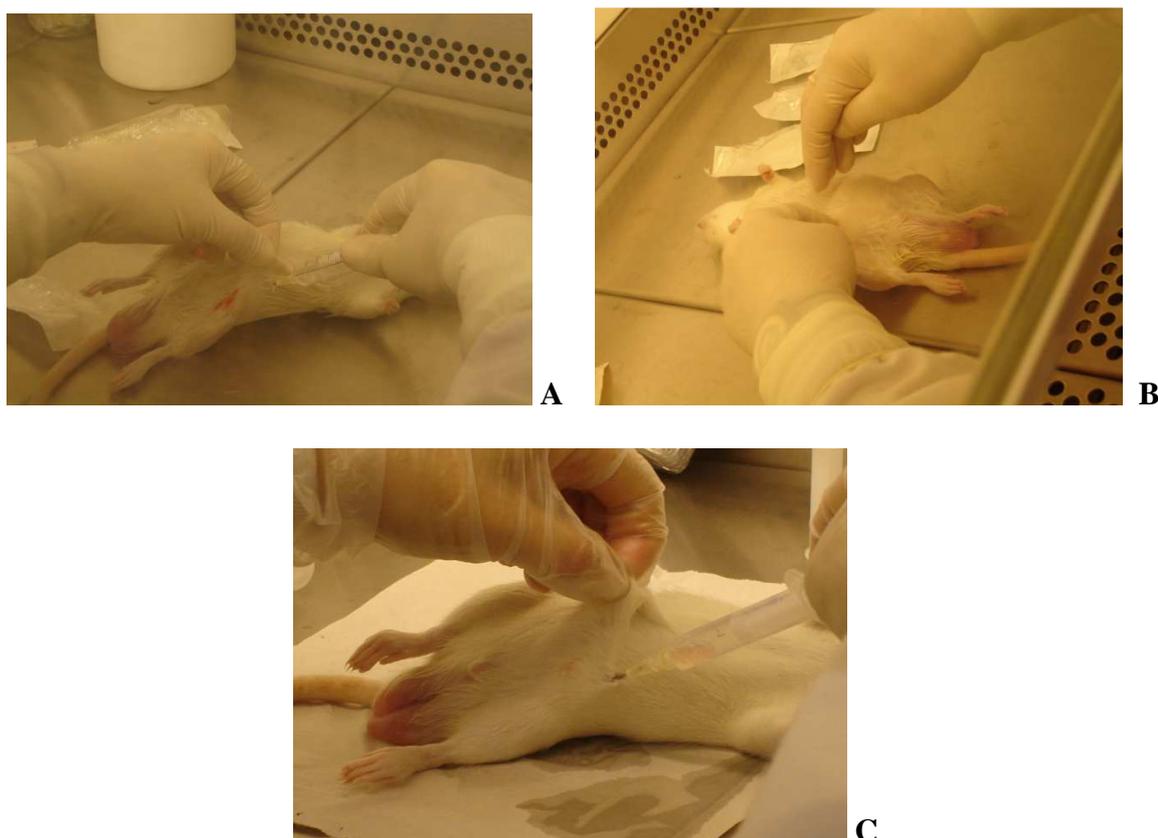


Fig. 22 – Fotografias do procedimento para: injeção de PBS (A), massagem abdominal (B) e colheita de macrófagos peritoneais (C) (fotografias pertencentes ao espólio do IBB-IBILI).

4.2. Testes de viabilidade celular e citotoxicidade para macrófagos peritoneais de rato *Wistar*

4.2.1. Teste de viabilidade celular – *Trypan Blue*

Como referido anteriormente, a finalidade deste teste é determinar o número de células, averiguar se existem em quantidade suficiente para o prosseguimento do protocolo experimental, se estão viáveis e se existem outros tipos de células ou microrganismos.

No interior da câmara de fluxo laminar retirou-se uma alíquota de 10 μ l de cada tubo de *falcon* para *eppendorfs* estéreis, previamente identificados. Adicionaram-se 10 μ l de *Trypan Blue* a 0,4 % a cada *eppendorf* e homogeneizou-se. Este passo realizou-se já fora da câmara de fluxo laminar. Retiraram-se 10 μ l desta mistura e colocou-se na

câmara de *Neubauer* (Fig. 23), procedendo-se à contagem do número de células no MOCF.

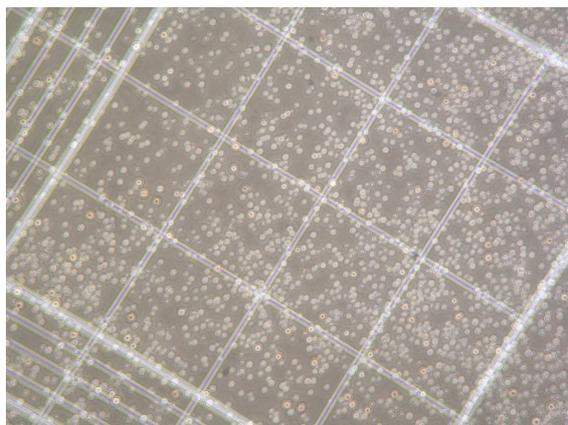


Fig. 23 – Visualização de macrófagos no MOCF dispostos na câmara de *Neubauer* (100 ×) (fotografia pertencente ao espólio do IBB-IBILI).

4.2.2. “Cultura” em placa de macrófagos peritoneais

Após o isolamento, a suspensão celular foi colocada em caixas de cultura de 96 poços⁶ com uma disposição pré-determinada. As caixas foram devidamente identificadas e isoladas com fita-cola porosa⁷ e incubadas a 37° C em estufa contendo 5 % de CO₂, durante 5 h, com a finalidade de permitir a adesão dos macrófagos ao fundo de cada poço. Decorrido este período de incubação, procedeu-se à remoção das células não-aderentes e quaisquer substâncias indesejáveis através de três lavagens com PBS estéril. Os macrófagos isolados e lavados foram incubados com novo meio de cultura RPMI a 10 % completo (300 µl), nas mesmas condições, durante cerca de 20 h. Decorrido este tempo observaram-se as várias caixas ao MOCF.

4.2.3. Preparação do ensaio de citotoxicidade

As amostras a testar (PLA-com, PLA-lab, PLA_V, PLA_A e vancomicina foram esterilizadas num esterilizador UV, no interior da câmara de fluxo laminar, com a luz UV ligada (tanto a câmara como o próprio esterilizador) durante a noite, à exceção do Avastin[®] por já se encontrar estéril.

⁶ para poder fazer-se a leitura no aparelho de micro-Elisa.

⁷ permite a difusão do CO₂

Todos os procedimentos descritos a seguir foram realizados no interior da câmara de fluxo laminar.

Após esterilização das amostras procedeu-se à sua hidratação com 1 ml de PBS estéril, sendo posteriormente vortexadas para se conseguir obter uma suspensão minimamente homogénea.

Depois da observação ao MOCF das várias caixas de cultura, procedeu-se à distribuição das várias amostras pelos respectivos poços das caixas de cultura.



Fig. 24 – Colocação das soluções de nanopartículas em contacto com os macrófagos (fotografia pertencente ao espólio do IBB-IBILI).

Foram utilizadas três concentrações distintas das várias amostras: 0,5 μ l, 5 μ l e 30 μ l, respectivamente, preparadas partindo das soluções-mãe com uma concentração de 7,7 mg/ml. Em cada poço foram adicionados volumes diferentes de meio de cultura, perfazendo um volume total de 300 μ l com meio de cultura, conforme se pode observar na Figura 25.

Foram seleccionados três tempos de estudo diferentes, tanto para a vancomicina como para o Avastin[®]: um, três e cinco dias, sendo desta forma necessário uma caixa de cultura para cada tempo em estudo e para cada um dos fármacos.

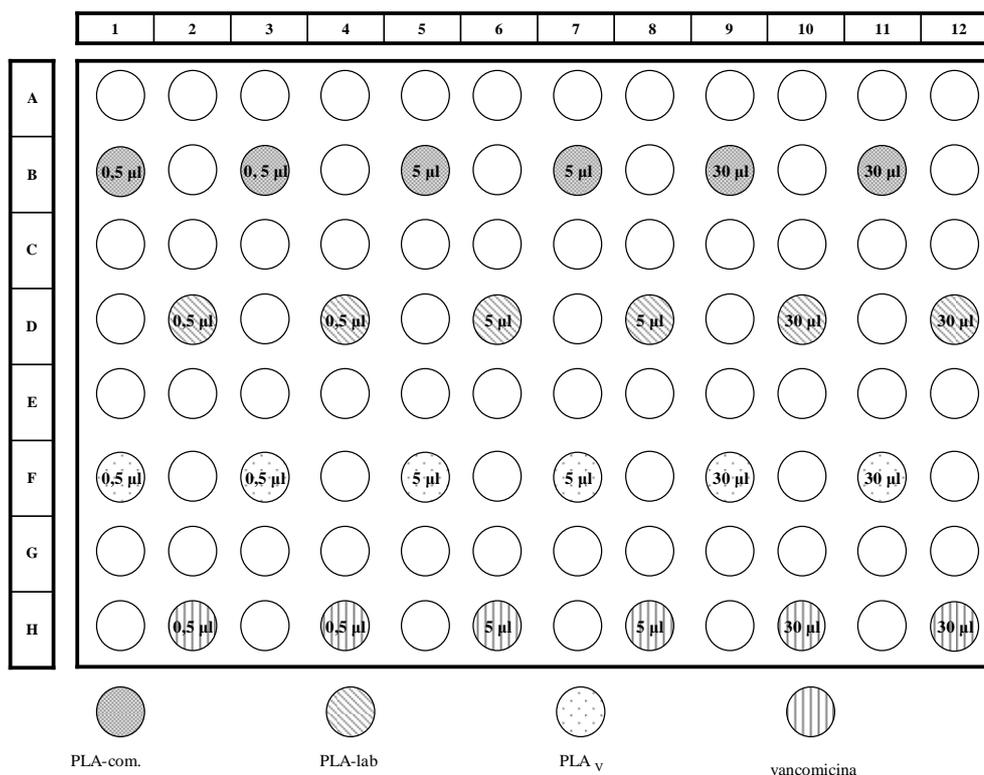


Fig. 25 – Esquema da distribuição das amostras nas caixas de cultura de 96 poços, para a vancomicina para o 1dia/3dias/5dias.

Nota: Para o Avastin® repetiu-se o mesmo esquema de distribuição, substituindo-se a vancomicina por este fármaco.

- **Testes de citotoxicidade para macrófagos**

Após a distribuição das amostras nas várias caixas de cultura, de acordo com o protocolo descrito anteriormente, estas foram colocadas a incubar na estufa a 37° C com atmosfera de 5 % de CO₂ durante os respectivos tempos a estudar. Durante o período de incubação foi feito um acompanhamento celular diário ao MOCF.

Decorrido o tempo de incubação para cada uma das caixas de cultura realizou-se o teste colorimétrico do MTT, a fim de avaliar a possível toxicidade das amostras testadas (Fig. 26).

Assim, retirou-se a caixa de cultura da estufa e, no interior da câmara de fluxo laminar, removeu-se o meio de cultura e adicionaram-se 270 µl de meio novo RPMI a 10 % completo e 30 µl da solução MTT a 10%, a todos os poços. A caixa de cultura foi

novamente colocada na estufa a incubar a 37° C com atmosfera de 5% de CO₂ , durante cerca de 3h.

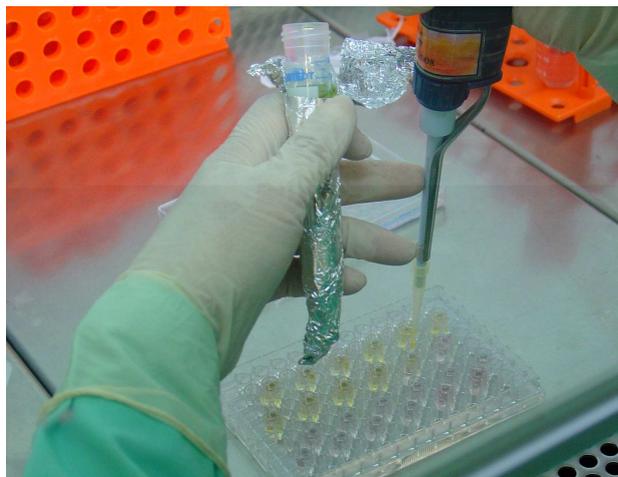


Fig. 26 – Aplicação do MTT aos poços contendo macrófagos (fotografia pertencente ao espólio do IBB-IBILI).

Findo este período de tempo, retirou-se a caixa de cultura da estufa, removeu-se o meio de cultura + MTT e adicionou-se isopropanol ácido (300 µl HCl 0,04 N em isopropanol) a todos os poços, a fim de dissolver o produto resultante da redução do MTT, os cristais de *formazan*. Este último passo foi realizado fora da câmara de fluxo laminar, mas no interior da *hotte*.

Para assegurar que todos os cristais se encontram dissolvidos, aguardam-se cerca de 20 min à temperatura ambiente, efectuando-se de seguida a leitura da caixa num leitor *MicroElisa SLT*, a 570 nm e com filtro de referência a 620 nm. Todos os valores foram registados.

Efectuou-se o mesmo protocolo para todas as caixas de cultura, quando decorridos os respectivos tempos de estudo.

4.2.4. Metodologia estatística

Para além dos cálculos de médias e limites de confiança das médias a 95 %, utilizaram-se ainda os testes paramétricos: teste *Mann-Witney*, sempre que se pretendia comparar dois grupos independentes, e o teste *Kruskal-Wallis* com o objectivo de comparar três ou mais grupos.

Todos os testes foram avaliados a um nível de significância de 5 %, tendo sido determinados através da aplicação do programa *STATISTICA*®, versão 8.

Capítulo III – Resultados e Discussão

"Não há nenhum segredo para o sucesso. É o resultado de preparação, trabalho duro, e aprender com o fracasso."

Gen. Colin L. Powell

1. Caracterização das partículas

1.1. Microscopia óptica

A caracterização das partículas preparadas neste trabalho iniciou-se pela observação óptica das mesmas recorrendo ao microscópio óptico Olympus BH-2. Os resultados das observações podem ser visualizados na Figura 27.

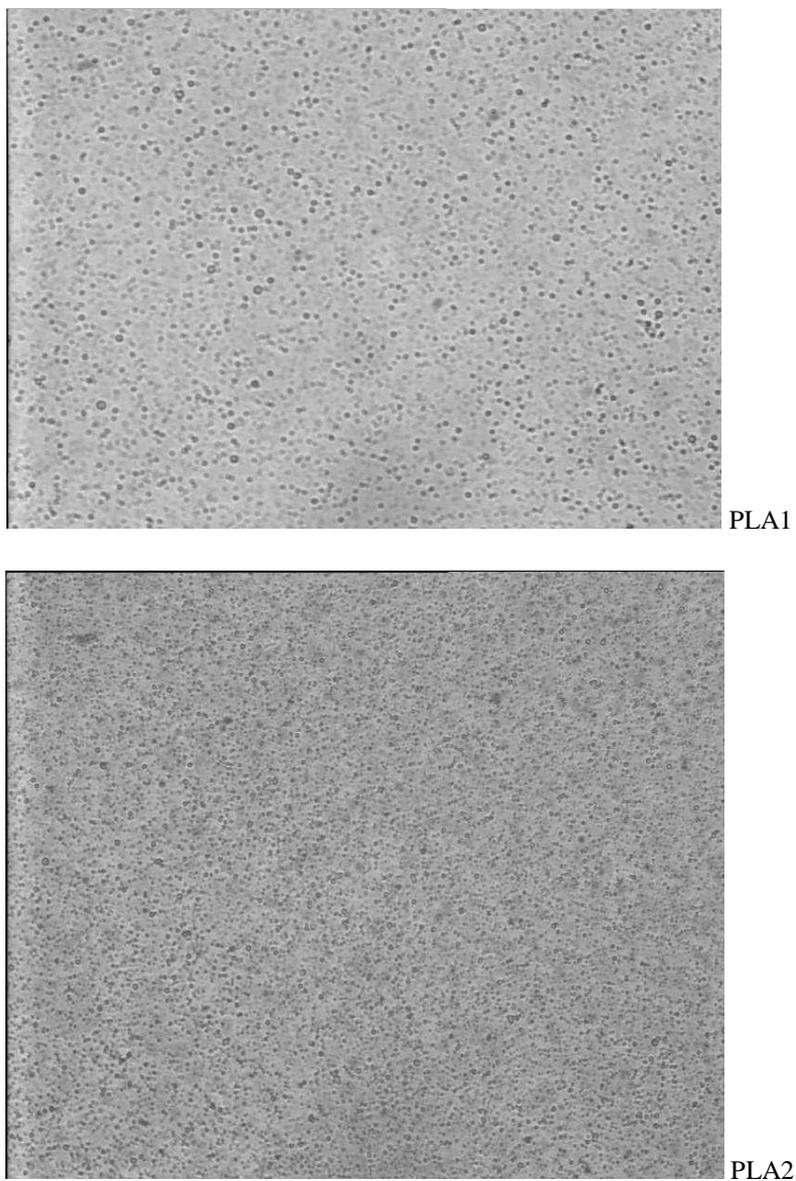


Fig.27 – Visualização das partículas de PLA1 e PLA2, por microscopia óptica (ampliação 50 ×).

A análise da Figura 27 permite constatar que as partículas preparadas pelo método da emulsão simples apresentam forma esférica. O facto das partículas serem esféricas tem particular relevância dado que permitirá uma libertação controlada das substâncias activas mais homogénea.

Procedeu-se de seguida à distribuição dos tamanhos de partícula (*PSD*).

1.2. Distribuição dos tamanhos de partícula

Após preparação das partículas de PLA, PLA γ HB e PLGA, de acordo com os procedimentos anteriormente referidos, procedeu-se à sua análise granulométrica, tendo sido usado o equipamento *PCS Submicron Particle Analyser* da *Beckman Coulter*.

De entre as diversas partículas preparadas neste trabalho, escolheram-se para PSD as que permitiam comparar a influência dos principais parâmetros de preparação. Considerando a quantidade de agente estabilizante (PVA), comparou-se PLA1 e PLA4 (Quadro 2).

Quadro 2 – Distribuição granulométrica das partículas de PLA1 e PLA4.

Quantidade de PVA	Amostra	P.I.	Média (nm)	% Pop	Distribuição volumétrica
0,5 g	PLA1	0,358	256,3±30,7 709,9±90,1	43,0 57,0	
1,0 g	PLA 4	0,572	170,1±36,7 590,2±18,0	12,9 87,1	

Os resultados demonstram que o agente estabilizante tem uma influência importante na distribuição de tamanhos de partículas obtida. Verifica-se que o aumento da quantidade de PVA (de 0,5g para 1,0 g) conduziu a uma distribuição de tamanho de partícula praticamente unimodal. Este resultado poderá dever-se ao facto de maior quantidade de agente permitir uma maior estabilização da dispersão.

No sentido de avaliar a influência da quantidade de polímero utilizado na preparação das partículas, comparou-se PLGA1 e PLGA2 (Quadro 3).

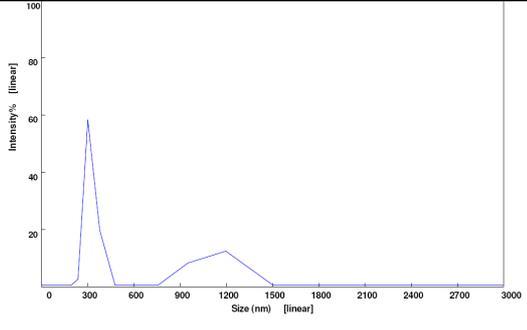
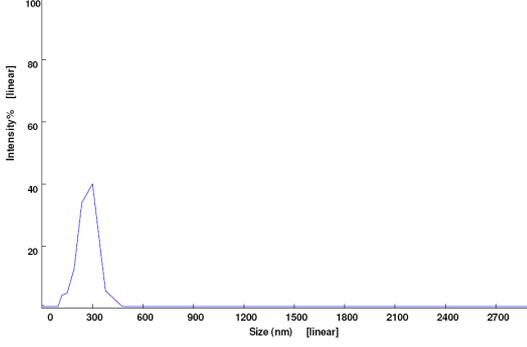
Quadro 3 – Distribuição granulométrica das partículas de PLGA1 e PLGA2.

Quantidade de polímero	Amostra	P.I.	Média (nm)	% Pop	Distribuição volumétrica
0,25 g	PLGA1	0,748	718,5±246,5	100	
0,50 g	PLGA 2	0,834	1480,9±988,8	100	

Da análise da tabela anterior, claramente se constata que quanto maior a quantidade de polímero utilizado, maior será o tamanho das partículas obtidas. Na amostra de PLGA2 foi utilizada uma concentração de polímero duas vezes maior que na amostra de PLGA1 e verifica-se que o tamanho das partículas de PLGA2 é aproximadamente o dobro das de PLGA1. Verifica-se que ambas as populações são homogêneas e o índice de polidispersão também é semelhante.

Comparando a influência do equipamento utilizado para quebra das partículas, apresentam-se no Quadro 4 os resultados de *PSD* para PLA γ HB 1 a 24 000 rpm e PLA γ HB 1 com ultrassons.

Quadro 4 – Distribuição granulométrica das partículas de PLA γ HB 1 a 24 000 rpm e PLA γ HB 1 com ultrassons.

Amostra	P.I.	Média (nm)	% pop	Distribuição volumétrica
PLA γ HB (24000rpm)	0,128	317,2 \pm 39,0 1097,6 \pm 131,5	80,1 19,9	
PLA γ HB 1 Ultrassons	0,076	255,9 \pm 69,9	100	

Constata-se que o tamanho das partículas de PLA γ HB não é homogêneo, obtendo-se duas populações de partículas, umas com um tamanho que ronda 1 μ m, com uma população de 19,9 % e as restantes são bem menores (317,2 nm). As partículas produzidas com ultrassons apresentam uma distribuição totalmente homogênea e o tamanho é inferior, devido à maior velocidade atingida com este equipamento.

Estes resultados permitem concluir que o uso do equipamento de ultrassons será o mais desejado para o fim pretendido neste trabalho.

O Quadro 5 mostra os resultados da análise *PSD* para comparação do tipo de polímero utilizado. Neste caso compararam-se amostras de PLA1 e PLGA1 (deveria ter-se a análise para a amostra do outro polímero PLA γ HB 1).

Quadro 5 – Distribuição granulométrica das partículas de PLA1 e PLGA1.

Amostra	P.I.	Média (nm)	% Pop	Distribuição volumétrica
PLA1	0,358	256,3±30,7 709,9±90,1	43,0 57,0	
PLGA1	0,748	718,5±246,5	100	

Comparando estas amostras pode dizer-se que o copolímero apresenta uma população homogénea e com tamanho semelhante a 57 % da população de partículas de PLA1. Consta-se no entanto que cerca de 43 % das partículas do polímero apresentam tamanho bastante menor. Este resultado leva-nos a pensar que a preparação de partículas de PLA poderá ser a mais indicada para a obtenção de nanoesferas mais pequenas.

Pela análise dos Quadros 2, 3, 4 e 5 pode constatar-se que:

- em alguns casos não há uma uniformidade de tamanhos para a mesma amostra;
- o tamanho das partículas de PLGA1 são menores que as de PLGA2; esta diferença de tamanhos pode ser justificada pela menor concentração de PLGA;
- as partículas de PLA1 são menores que as de PLA4, justificando-se esta diferença pelo facto de nas primeiras se ter usado maior concentração de agente estabilizante (PVA), no entanto não se pode considerar uma diferença significativa.;

- as partículas preparadas com o ultrassonificador são significativamente mais pequenas dado que a tensão de corte é muito maior;
- o parâmetro mais importante para a redução do tamanho de partículas foi a velocidade de agitação.

Sendo um dos objectivos deste trabalho precisamente a preparação de nanopartículas, produziram-se as restantes amostras utilizando o ultrassonificador.

Foram preparadas amostras de PLA-lab, PLA-com. (controlo), PLA-lab com Avastin[®] encapsulado e PLA-lab com vancomicina encapsulada. Posteriormente, procedeu-se à respectiva análise granulométrica.

O Quadro 6 mostra a distribuição granulométrica para partículas de PLA-lab e PLA-com.

Quadro 6 – Distribuição granulométrica para as partículas de PLA-lab e PLA-com.

Amostra	P.I.	Média (nm)	% pop	Distribuição volumétrica
PLA-com	0,183	218,0±47,8 1394,2±162,0	83,5 16,5	
PLA-lab	0,134	195,8±52,8 553,2±66,1	88,3 11,7	

Observando os resultados do Quadro 6 pode dizer-se que ambos os polímeros exibem distribuições granulométricas com homogeneidade semelhante, embora as de PLA-lab sejam sensivelmente mais pequenas.

O Quadro 7 refere-se aos resultados da análise granulométrica de duas amostras de nanopartículas encapsulando vancomicina (V1 e V2).

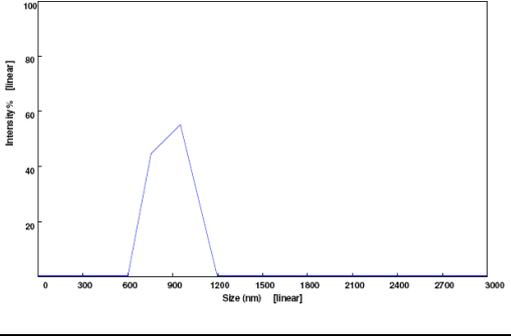
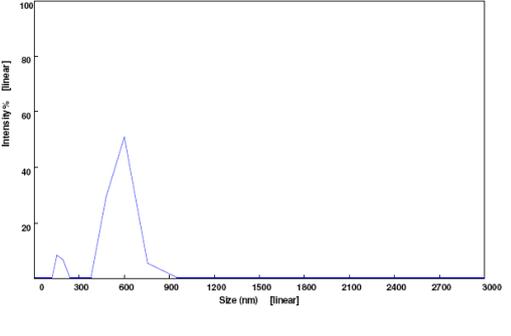
Quadro 7 – Distribuição granulométrica de duas amostras de PLA-lab encapsulando vancomicina.

Amostra	P.I.	Média	% pop	Distribuição volumétrica
V1	0,283	554,3±328,6	100	
V2	0,255	405,6±233,8	100	

Analisando os resultados de *PSD* para as amostras V1 e V2 verifica-se que são semelhantes, tanto na homogeneidade como no tamanho. Estes resultados seriam de esperar já que ambas as amostras foram preparadas do mesmo modo.

O Quadro 8 refere-se à distribuição granulométrica de duas amostras de PLA-lab encapsulando Avastin[®] (A1 e A2), em iguais circunstâncias.

Quadro 8 – Distribuição granulométrica de duas amostras de PLA-lab encapsulando Avastin®.

Amostra	P.I.	Média (nm)	% Pop	Distribuição volumétrica
A1	0,293	861,5±116,4	100	
A2	0,346	167,7±21,2 566,3±81,8	14,5 85,5	

Apesar das amostras A1 e A2 terem sido preparadas da mesma maneira, verifica-se alguma heterogeneidade nos tamanhos das partículas da amostra A2. Esta amostra apresenta partículas menores que a amostra A1, que por sua vez apresenta uma população 100 % homogênea.

Analisando os resultados expressos nos Quadros 7 e 8 pode dizer-se que:

- as populações das várias amostras são relativamente homogêneas;
- as nanoesferas de maior tamanho são as que encapsulam Avastin®, o que faz algum sentido uma vez que as moléculas deste fármaco têm elevado peso molecular.

A este respeito não se podem fazer comparações entre os resultados obtidos e outros, dado que não se encontra literatura com registos de partículas de polímeros encapsulados com Avastin®.

1.3. Microscopia Electrónica de Varrimento

Foi feita a análise morfológica e topográfica por microscopia electrónica de varrimento das amostras de PLA-com, PLA-lab, e PLA-lab encapsulando Avastin[®] (PLA_A) e PLA-lab encapsulando vancomicina (PLA_V).

A Figura 28 mostra os resultados obtidos por *SEM*, para as amostras dos dois polímeros, o PLA comercial que serve de controlo (PLA-com).

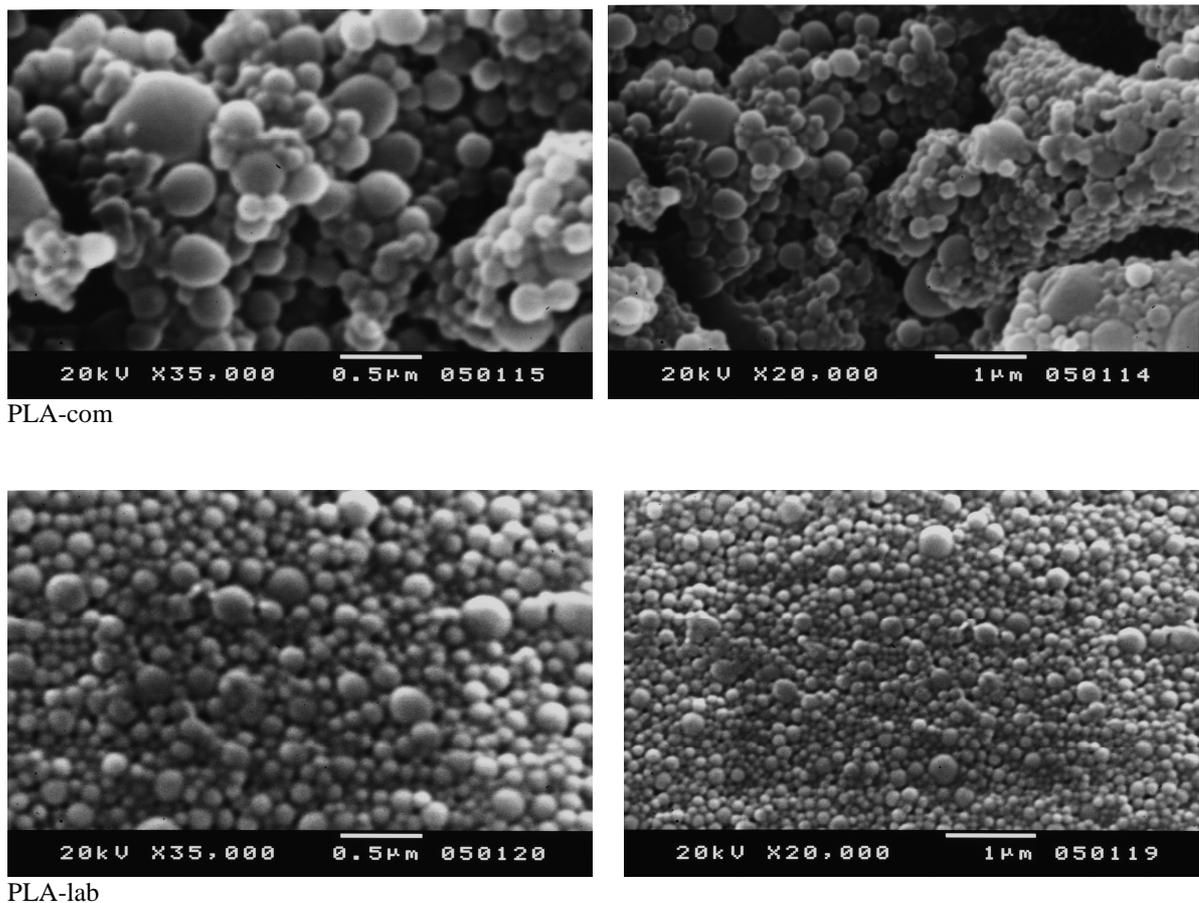


Fig. 28 – Imagens obtidas por *SEM* com a ampliação de 20 000 × e a 35 000 × para partículas de PLA-com e PLA-lab.

Pela observação da Figura 28, verifica-se que as partículas de PLA-lab apresentam uma maior esfericidade e homogeneidade relativamente às de PLA-com.

Esta diferença pode ser justificada provavelmente devido a uma diferença de composição do polímero. O PLA-lab foi preparado e purificado no DEQ pelo que se tem a certeza que a amostra contém apenas PLA. No caso do PLA-com essa certeza não existe.

A Figura 29 compara a análise *SEM* para as partículas de PLA-lab, PLA_A e PLA_V.

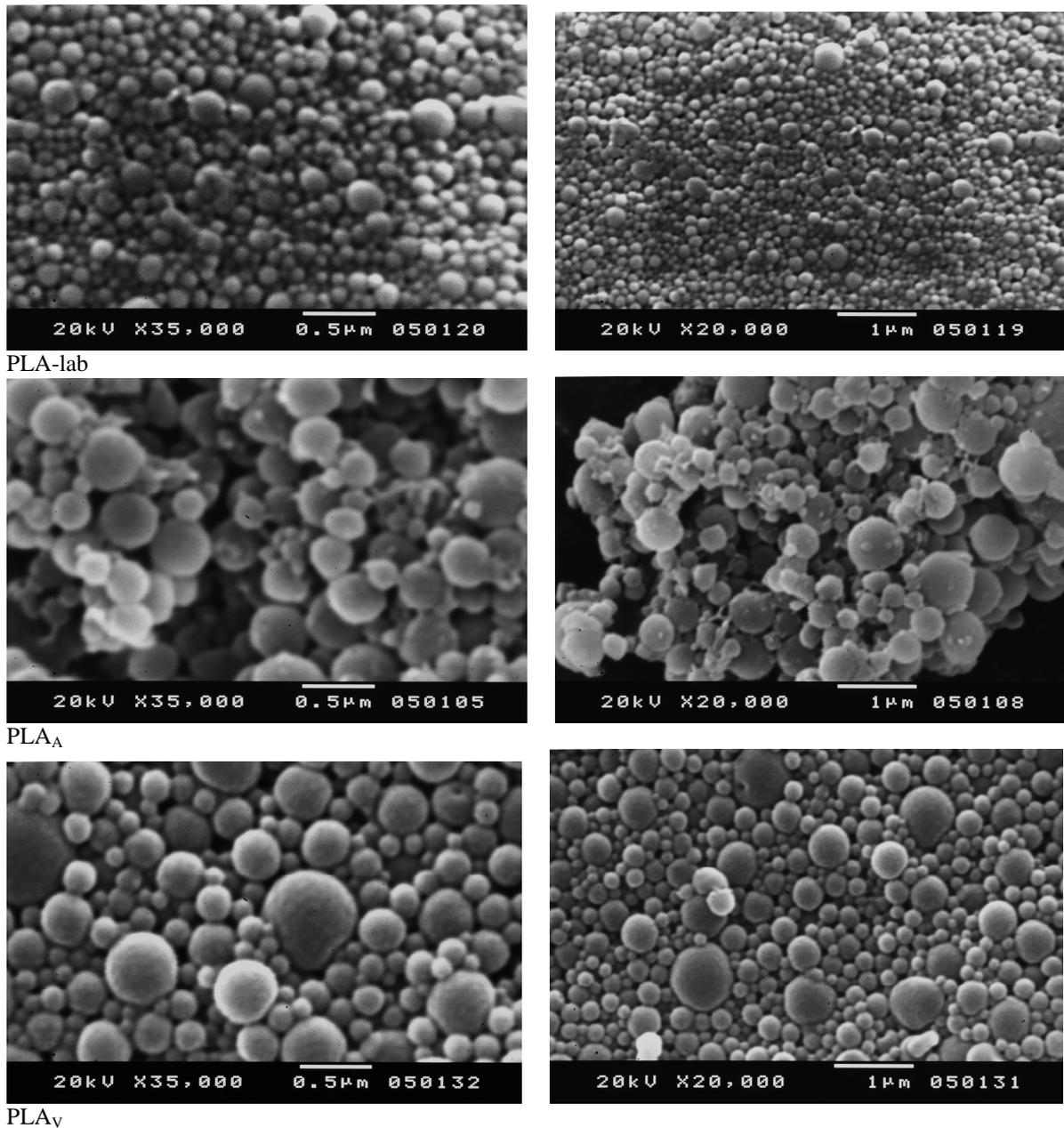


Fig. 29 – Imagens obtidas por *SEM* com a ampliação de 20000 × e a 35 000 × para as partículas de PLA-lab, PLA_A e PLA_V.

Pela análise da Figura 29 é possível constatar que as partículas de PLA-lab são de menor tamanho sendo também bastante perfeitas, em termos de esfericidade, homogêneas e uniformes. Seguem-se as de PLA_V que apresentam ótima esfericidade e homogeneidade. As partículas de PLA_A não são tão esféricas nem tão homogêneas

como as referidas anteriormente. Estas diferenças podem justificar-se pelo facto do Avastin[®] ser uma molécula de elevado peso molecular.

1.4. DMTA

Os resultados obtidos para as amostras de PLA-lab, PLA_V e PLA_A foram os seguintes:

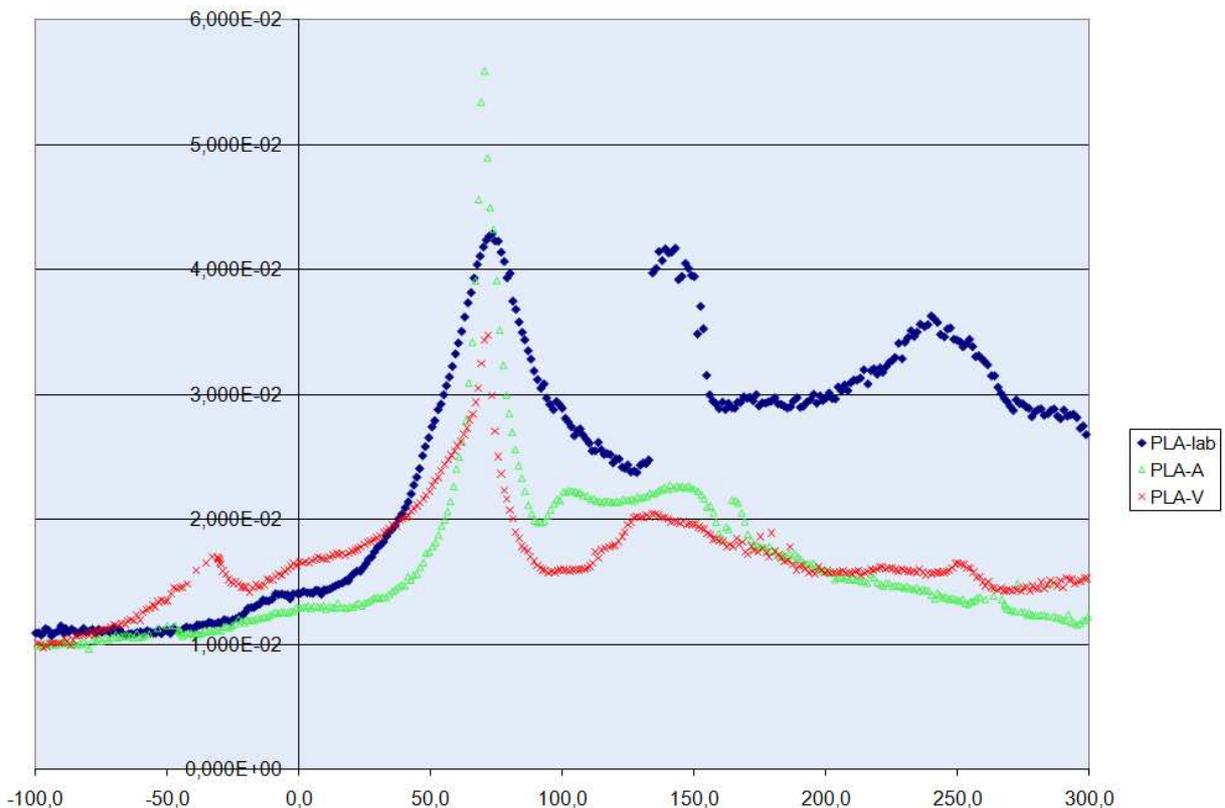


Gráfico 1 – Curva de DMTA para as amostras de PLA-lab, PLA_V e PLA_A.

Da análise do gráfico 1 verifica-se que o PLA-lab apresenta três picos de $\tan \delta$ que, de acordo com bibliografia [116], podem ser identificados como a Tg (70° C), a Tm (138° C) e a Td (237° C). É de salientar que não aparece pico de cristalização no termograma para a amostra referida.

No que diz respeito à Tg verifica-se que o valor coincide para as três amostras (PLA-lab, PLA_V e PLA_A), o que permite concluir que a incorporação das substâncias activas na matriz polimérica não altera a mobilidade das cadeias. No entanto, é importante salientar que no

caso da amostra PLA_A aparece um pico relativo à cristalização (105° C) o que, em princípio, indicará que o Avastin[®] poderá interagir com a cadeia polimérica.

Com base nos dados disponíveis até ao momento não é possível confirmar qual o tipo de interacção.

2. Estudos de libertação controlada

2.1. Eficiência de encapsulamento e *drug loading*

Após a preparação das amostras de PLA-com, PLA-lab, PLA_A e PLA_V estas foram centrifugadas. O sobrenadante desta operação foi analisado por espectrofotometria para determinar a quantidade de substâncias activas que não foram imobilizadas nas partículas de PLA-lab.

Os valores da absorvância (Abs) para as amostras de PLA_A (A1 e A2) e PLA_V (V1 e V2), encontram-se no Quadro 9.

Quadro 9 – Resultados da absorvância medidos no sobrenadante das amostras centrifugadas.

Amostra	Abs
V1	0,74687 (280 nm)
V2	1,01128 (280 nm)
A1	0,0679 (595 nm)
A2	0,2434 (595 nm)

As concentrações de fármaco presente no sobrenadante foram determinadas recorrendo às curvas de calibração correspondentes (Anexos 3 e 4).

Retirou-se o sobrenadante e liofilizaram-se todas as amostras de PLA-lab, com e sem substâncias activas e a de PLA-com. Os resultados encontram-se expressos na Tabela 7.

Tabela 7– Massas das nanoesferas depois de liofilizadas.

Amostra	Massa amostra (mg)
A1	139,0
A2	127,0
V1	140,8
V2	76,8
PLA-com	103,5
PLA-lab.	123,0

Procedeu-se à determinação da eficiência de encapsulamento e do *drug loading*.

O Quadro 10 resume as diferentes quantidades necessárias para o cálculo desses parâmetros e respectivos resultados.

Quadro 10 – Registo das quantidades necessárias para o cálculo da eficiência e do *drug loading*.

Amostra	Massa de fármaco inicial (mg)	Massa de fármaco não encapsulado (mg)	Massa de fármaco encapsulado (mg)	Massa amostra (mg)	Eficiência de encap. (%)	<i>Drug loading</i> (w/w)
A 1	25,00	0,098	24,90	139,0	99,6	17,9
A 2	25,00	0,3513	24,65	127,0	98,6	19,4
V 1	5,00	0,1725	4,83	140,8	96,6	3,4
V 2	5,00	0,2336	4,78	76,8	95,3	6,2

Nota: os cálculos referentes à eficiência de encapsulamento e ao *drug loading* encontram-se no Anexo 5.

Pela análise desta tabela, pode concluir-se que a eficiência de encapsulamento é muito próxima dos 100 % para o Avastin[®] e superior a 95 % para a vancomicina. O *drug loading* apresenta valores superiores também para o Avastin[®].

Estes resultados podem ser justificados pelo facto da molécula de Avastin[®] ser bastante grande e, uma vez encapsulada, ter dificuldades em sair (por difusão) do polímero durante o tempo de centrifugação. No caso da vancomicina, talvez tenha havido alguma libertação, ainda que muito pequena, durante o intervalo de tempo em que decorreu entre a preparação das nanopartículas e a sua centrifugação.

2.2. Estudo da cinética de libertação das substâncias activas

Para posterior quantificação dos fármacos em solução, confirmou-se que o PLA apresentava um pico numa zona do espectro UV/visível, que não interfere na zona referente aos dois fármacos utilizados (Fig. 30).

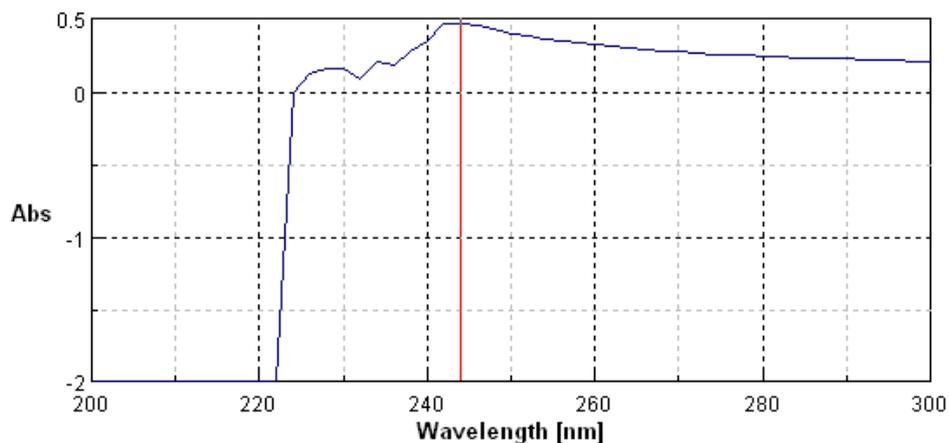


Fig. 30 – Espectro de absorção do PLA-lab.

A cinética da libertação dos fármacos foi realizada em solução de PBA. O Quadro 11 mostra as quantidades de amostras utilizadas.

Quadro 11 – Massas de A1, A2 e V2 utilizadas no estudo da cinética de liberação.

Amostras	Massa inicial das amostras liofilizadas (mg) 1º ensaio	Massa inicial das amostras liofilizadas (mg) 2º ensaio
A1	20,82	17,27
A2	16,80	20,76
V2	16,43	14,66

A liberação da vancomicina foi analisada em solução PBS a pH=7,4 e a 37° C, de modo a simular o ambiente ocular. A quantidade de fármaco libertada foi determinada por espectrofotometria UV/Vis. Os resultados das absorvâncias obtidos para os dois ensaios encontram-se na Tabela 8. O Gráfico 2 traduz a respectiva curva de calibração ao longo do tempo.

Tabela 8 – Taxa de liberação controlada para dois ensaios de vancomicina (V2).

Tempo (dias)	vancomicina libertada (%) 1º ensaio	vancomicina libertada (%) 2º ensaio
0,0625	45,78	41,4
1	63,43	54,56
2	76,42	67,22
3	85,78	76,39
7	88,11	81,73
11	94,29	93,02
15	98,62	100
23	98,97	100

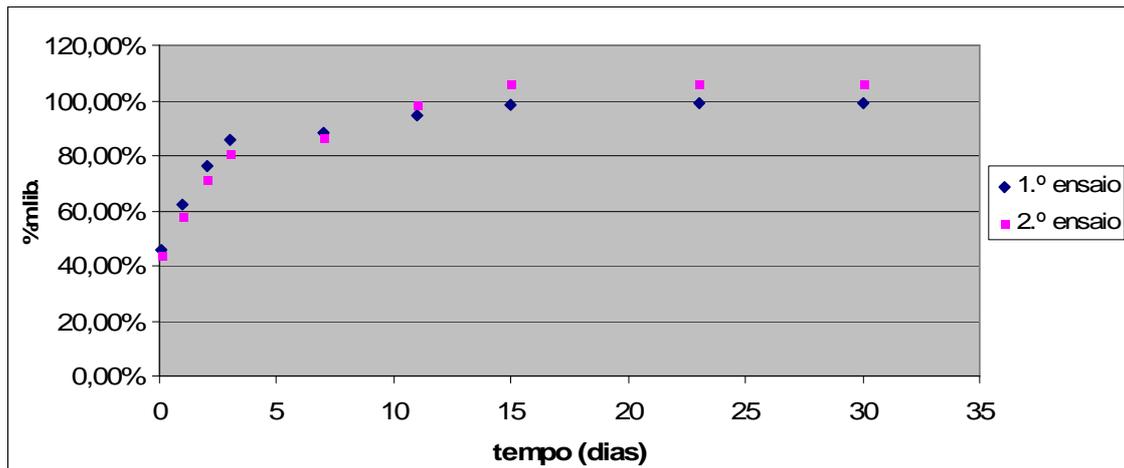


Gráfico 2 – Curvas de libertação controlada da vancomicina, relativas aos dois ensaios.

Como seria de prever, verificou-se um perfil de libertação idêntico para os dois ensaios considerados. Regra geral, os antibióticos têm uma acção terapêutica de sete dias. Neste caso, ao fim desse tempo, mais de 80 % do fármaco foi libertado das partículas do PLA-lab. Desta forma poderá afirmar-se que uma só injeção intravítrea da nanopartículas encapsulando vancomicina produz um efeito terapêutico durante cerca de quinze dias, evitando as sucessivas injeções. É claro que o número de injeções intravítreas dependerá sempre do tipo de patologia e da sua evolução.

O tempo disponível para obter resultados da libertação do Avastin[®] não foi o suficiente. Ao longo das semanas em que decorreu o estudo não se verificou qualquer libertação deste fármaco. Uma das razões que justifica este acontecimento, prende-se com o facto da molécula de Avastin[®] apresentar um peso molecular bastante elevado e não conseguir sair, por difusão, das esferas de PLA. Nesse sentido, prevê-se que o Avastin[®] se liberte devido apenas à degradação do polímero. Este resultado é extremamente promissor, dado que o grande problema dos sistemas de libertação controlada é precisamente libertações muito rápidas. A confirmar-se o resultado, a investigação deverá avançar no sentido de controlar a velocidade de degradação do PLA como forma de induzir a libertação de Avastin[®] pretendida. Nesse quadro, a solução óptima poderá passar pela mistura de diferentes partículas preparadas com PLA com perfis de degradação distintos. Dessa forma, será possível desenvolver soluções terapêuticas de libertação controlada e lenta que evitarão as injeções frequentes.

A fim de se confirmar a presença do fármaco no interior das nanopartículas, dissolveu-se uma determinada quantidade de nanoesferas PLA_A liofilizadas, em

clorofórmio e adicionou-se um pouco de solução de PBS e de Reagente de *Bradford*. A Figura 31 mostra os resultados obtidos.

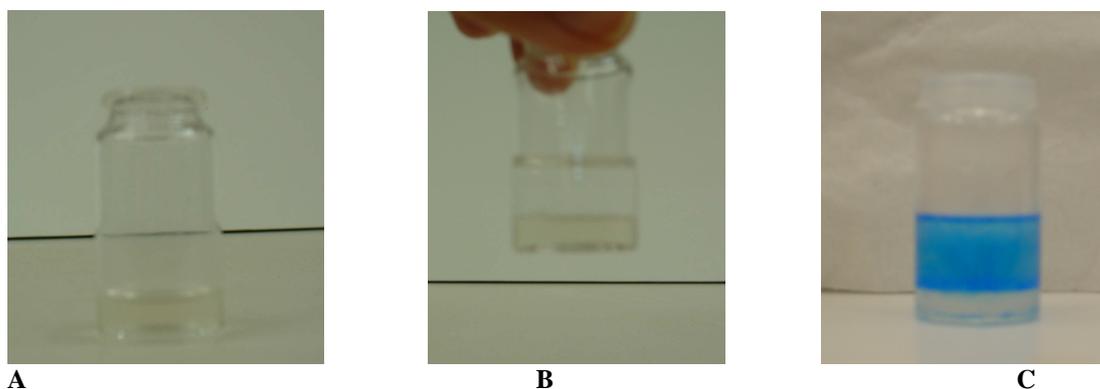


Fig. 31 PLA encapsulando Avastin[®] dissolvido em clorofórmio (A), adição de PBS (B) e Teste de *Bradford* (C).

3. Modificação da superfície de PLA

3.1. Quantificação dos grupos carboxílicos

A Tabela 9 apresenta a quantificação dos grupos carboxílicos à superfície de alguns polímeros.

Tabela 9 – Registo das massas de quatro amostras de PLA, do volume da HCl gasto na titulação, a quantidade química de grupos carboxílicos à superfície das partículas e a mesma quantidade por massa de partículas.

Polímero	Massa de partículas (mg)	Volume de HCl gasto na titulação (ml)	milimoles de grupos carboxílicos * (mmol)	Quantidade de grupos COOH (x 10 ⁻⁴ mmol/mg)
PLA1	99,0	1,8	0,064	6,4646
PLA2	228,6	3,8	0,044	1,9247
PLA3	117,5	3,4	0,048	4,0851
PLA4	112,4	1,18	0,064	5,6939
Branco	-----	8,2	-----	-----

$$* n (\text{grupos COOH}) = V_{\text{HCl do branco}} \times C_{\text{HCl}} - V_{\text{HCl gasto na sol.}} \times C_{\text{HCl}}$$

$$n (\text{grupos COOH}) = V_{\text{HCl do branco}} \times 0,01 - V_{\text{HCl gasto na sol.}} \times 0,01$$

Na preparação das amostras de PLA1, PLA2 e PLA3 apenas se variou a quantidade de PLA utilizado (ver Tabela 1). O que se verifica é que quanto menor for a quantidade de PLA usado, maior é a quantidade de grupos carboxílicos à sua superfície.

A diferença na preparação das amostras de PLA1 e PLA4 reside na quantidade de agente estabilizante (PVA) utilizado. A diferença registada na quantidade de grupos carboxílicos à superfície destas amostras não parece ser relevante.

A Tabela 10 mostra a massa das amostras filtradas e secas após titulação. Nesta operação houve perda significativa de massa que se deve a erros experimentais, nomeadamente à técnica de filtração.

Tabela 10 – Massa das amostras secas, após titulação:

Polímero	Massa das amostras filtradas e secas (mg)
PLA1	35,1
PLA2	166,2
PLA3	67,0
PLA4	49,4

3.2. Ligação covalente de uma proteína às micro/nanoesferas

Após se ter colocado a amostra de PLA1 a reagir com a CDI (para activação dos grupos carboxílicos) e com a BSA (ligação covalente dos grupos amina da BSA aos carboxílicos livres à superfície de PLA1, procedeu-se à quantificação da proteína em solução usando o reagente de *Bradford*.

A concentração da solução de BSA e quantidades de Reagente de *Bradford* e da solução da proteína utilizadas encontram-se no Quadro 12. Mediu-se a absorvância de uma amostra de PLA1 e da que tinha ficado a reagir com a BSA.

Quadro 12 – Quantidades utilizadas na aplicação do Reagente de *Bradford* em duas amostras de BSA em solução: BSA sem PLA e BSA ligada aos grupos carboxílicos livres do PLA.

Amostras ml	[BSA] mg/ml	<i>Bradford</i> (ml)
* 0,05	0,8	1,5
**0,05	0,8	1,5

* contém BSA sem partículas

** BSA ligada covalentemente às partículas de PLA1

Com os resultados da absorvância e da curva padrão, calcularam-se as concentrações de BSA em solução para as duas amostras anteriores. A diferença entre ambas corresponde à quantidade de proteína que se ligou às partículas de PLA1.

A quantidade de proteína nas duas soluções foi calculada mediante a curva de calibração obtendo-se 0,7944 mg/ml e de 0,7264 mg/ml, sem e com partículas, respectivamente.

A diferença entre estes dois resultados (0,0680 mg/ml) corresponde à quantidade de proteína que, efectivamente, se ligou às partículas de PLA1 (Anexo 6).

4. Estudos de citotoxicidade viabilidade celular

As amostras a testar em macrófagos peritoneais de rato foram colocadas em contacto com as células para tentar determinar uma possível citotoxicidade. Para determinar a viabilidade celular após incubação recorreu-se ao teste colorimétrico do MTT. A figura seguinte mostra algumas fotografias de macrófagos após um determinado período de incubação obtidas com o MOCF, antes e depois do teste de citotoxicidade celular.

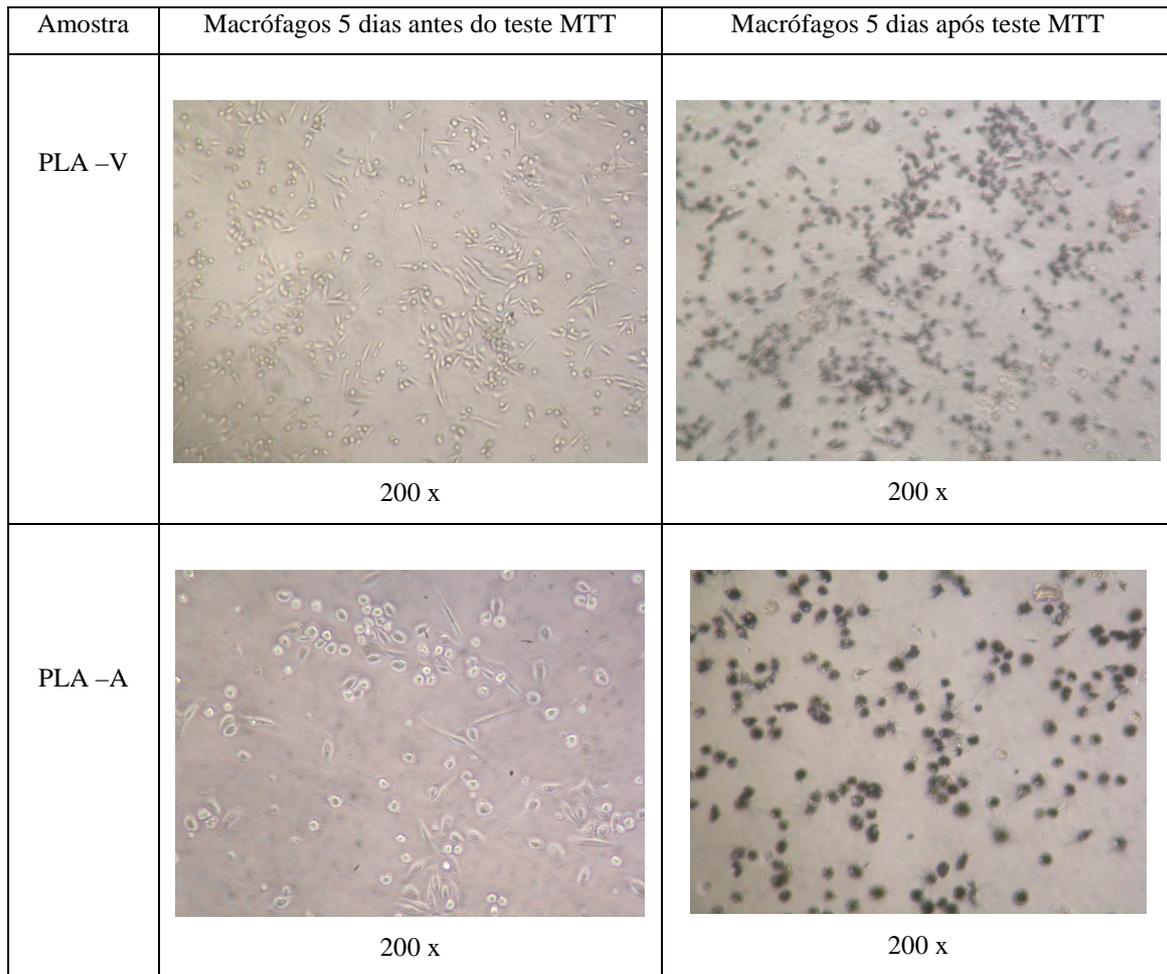


Fig.32 – Visualização microscópica dos macrófagos antes e após o teste MTT.

A leitura dos resultados do teste do MTT foi efectuada por microElisa SLT a 570 nm e com um filtro a 620 nm (Fig. 33) e os resultados encontram-se em anexo.



Fig.33 – MicroElisa SLT com uma caixa de cultura de 96 poços (fotografia pertencente ao espólio do IBB-IBILI).

Foi efectuada a análise estatística dos valores de absorvância obtidos nos testes de citotoxicidade.

O Gráfico 3 mostra os resultados estatísticos obtidos comparando as diferentes amostras em estudo, PLA-com , PLA-lab, PLA_A e Avastin[®] ao longo do tempo de estudo. Para todas as amostras estudaram-se três tempos: 1 dia (D1), 3 dias (D3) e 5 dias (D5).

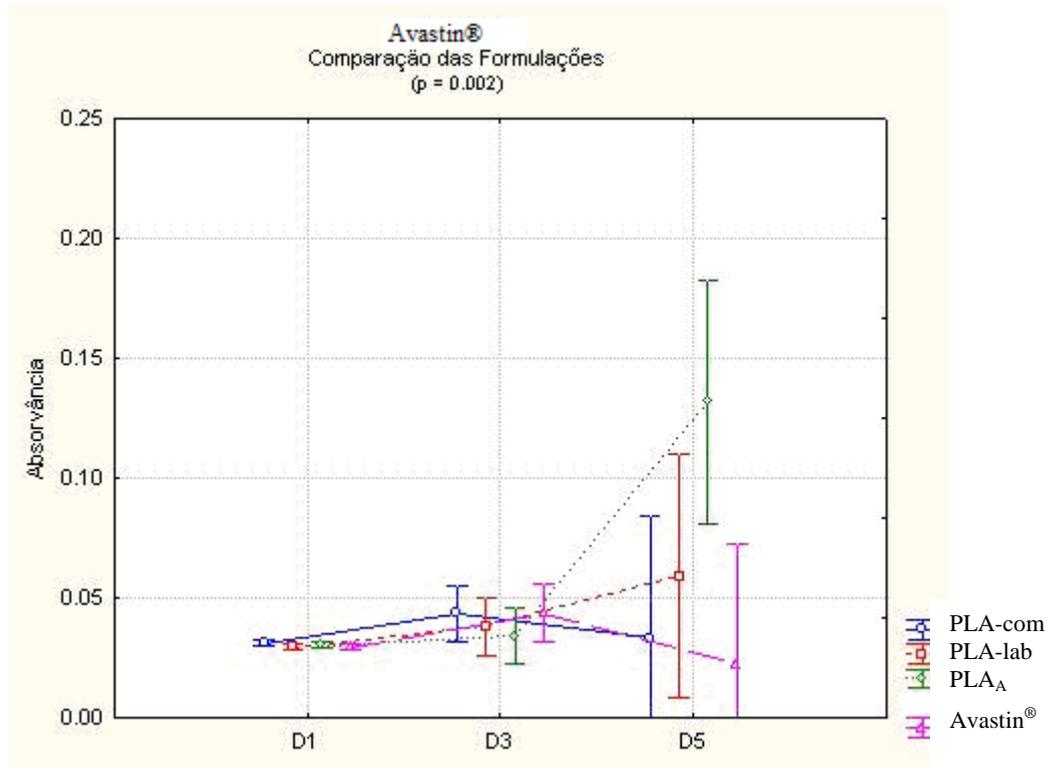


Gráfico 3 – Comparação das várias formulações em estudo com Avastin[®].

Analisando o Gráfico 3 pode constatar-se que se observam diferenças estatisticamente significativas entre as várias formulações ao longo do tempo estudado ($p=0,002$).

Nos 1^o, 3^o e 5^o dias não se observam diferenças estatisticamente significativas entre as formulações ($p=0,289$, $p=0,713$ e $p=0,056$, respectivamente). No entanto, o valor de p ao 5^o dia encontra-se muito próximo do grau de significância. Nos 3^o e 5^o dias registam-se valores de absorvância muito semelhantes.

Os valores de absorvância mais elevados são registados no 5^o dia para o PLA_A seguidos dos PLA-lab; o Avastin[®] regista os valores mais baixos.

Nas condições testadas, o 5^o dia é, sem dúvida, o melhor dia. Os valores de absorvância mais elevados verificam-se para as amostras de PLA_A e de PLA-lab ao fim

dos cinco dias. Possivelmente os macrófagos actuaram sobre as partículas de PLA_A, degradando o polímero e possibilitando a difusão do fármaco em quantidades não citotóxicas para as células. Veja-se que os valores de absorvância para o Avastin[®] ao fim dos cinco dias são muito baixos, o que sugere que possa vir a tornar-se citotóxico num estudo de maior duração no tempo.

O Gráfico 4 compara as diferentes formulações de vancomicina, ao longo do tempo.

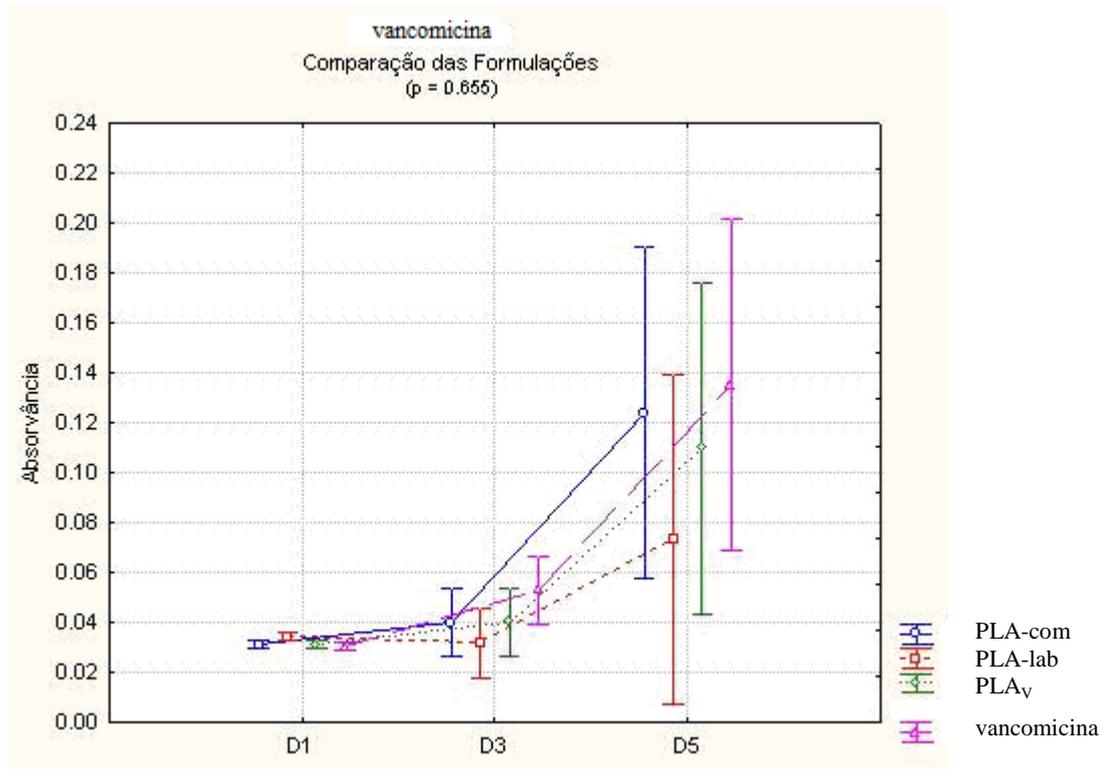


Gráfico 4 – Comparação das várias formulações em estudo com vancomicina.

Observando o Gráfico 3 não se verificam diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo ($p=0,655$).

Nos 1.º, 3.º e 5.º dias em estudo também não se observam diferenças estatisticamente significativas ($p=0,062$, $p=0,234$ e $p=0,523$, respectivamente). No 1.º dia, o PLA-lab apresenta um valor de absorvância ligeiramente superior em relação às restantes formulações. Ao 3.º dia regista-se um aumento de absorvância para a vancomicina e para PLA_v e o mesmo acontece para o 5.º dia.

Analisando o traçado do PLA_V e da vancomicina, verifica-se que são muito semelhantes. Isto vai de encontro aos resultados da cinética de libertação da vancomicina referidos anteriormente, ou seja, ao fim de cinco dias grande parte da vancomicina foi libertada das nanopartículas, tendo um efeito semelhante ao da vancomicina. Pode dizer-se que o PLA_V tem um pico de absorvância devido ao fármaco.

As células reagem de forma muito positiva à vancomicina, ao fim de cinco dias, o que também seria de esperar, uma vez que se trata de um antibiótico.

O Gráfico 5 mostra os resultados de absorvância para as partículas encapsulando Avastin[®] (PLA_A) e para o Avastin[®] ao longo do tempo.

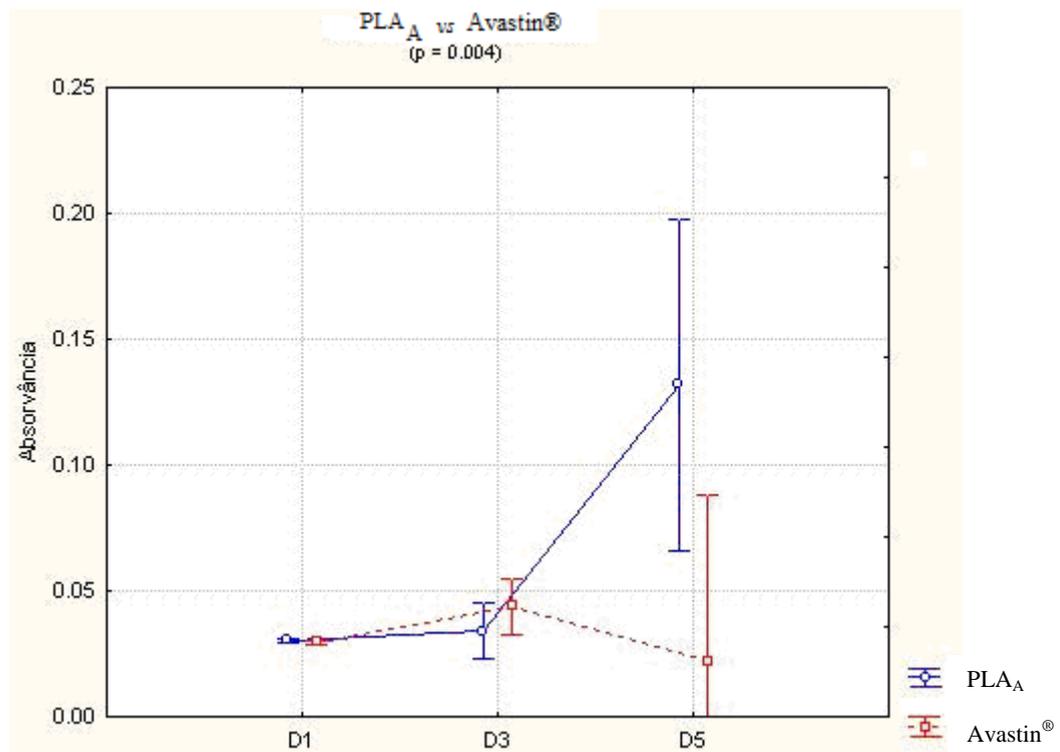


Gráfico 5 – Comparação do PLA_A e da Avastin[®] ao longo do tempo.

Observam-se diferenças estatisticamente significativas entre o PLA_A e o fármaco ao longo do tempo ($p=0,0004$).

O Avastin[®] tem tendência a tornar-se citotóxico ao longo do tempo. Como se constata pela análise do gráfico, ao fim de cinco dias, os valores de absorvância para o Avastin[®] são muito baixos. Já para a amostra de PLA_A, verifica-se um pico de

absorvância registrado para o mesmo dia. Esta análise sugere novamente a possibilidade dos macrófagos terem degradado parte do polímero, facilitando a difusão do fármaco.

O Gráfico 6 mostra os resultados de absorvância para as partículas encapsulando vancomicina (PLA_v) e de vancomicina ao longo do tempo.

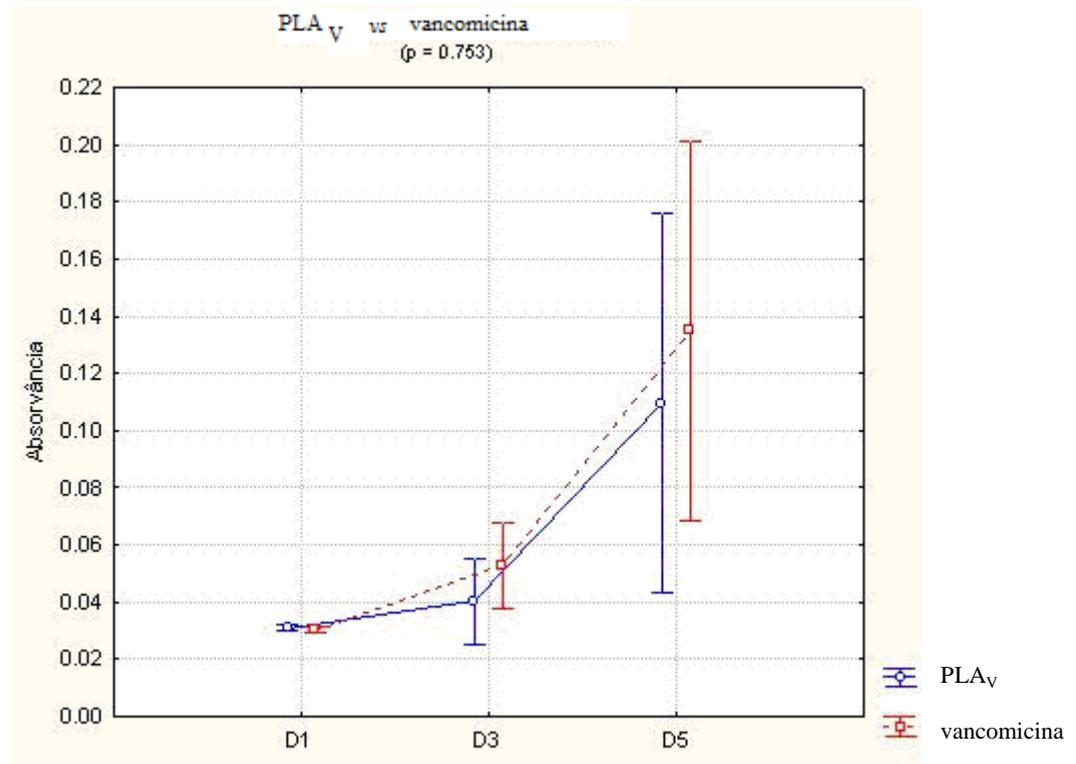


Gráfico 6 – Comparação do PLA_v e da vancomicina, ao longo do tempo.

Não são observadas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,753$), ao longo do tempo, entre as amostras de PLA_v e a vancomicina. Em todos os tempos (D1, D3 e D5) os valores de absorvância entre as duas formulações são semelhantes.

Mais uma vez se conclui que as células se adaptam muito bem à presença deste fármaco. Ao fim de cinco dias a libertação do fármaco é evidente, bem como a sua acção sobre os macrófagos.

O Gráfico 7 mostra os resultados de absorvância para as diferentes concentrações de Avastin[®] testadas ao longo do tempo de experiência.

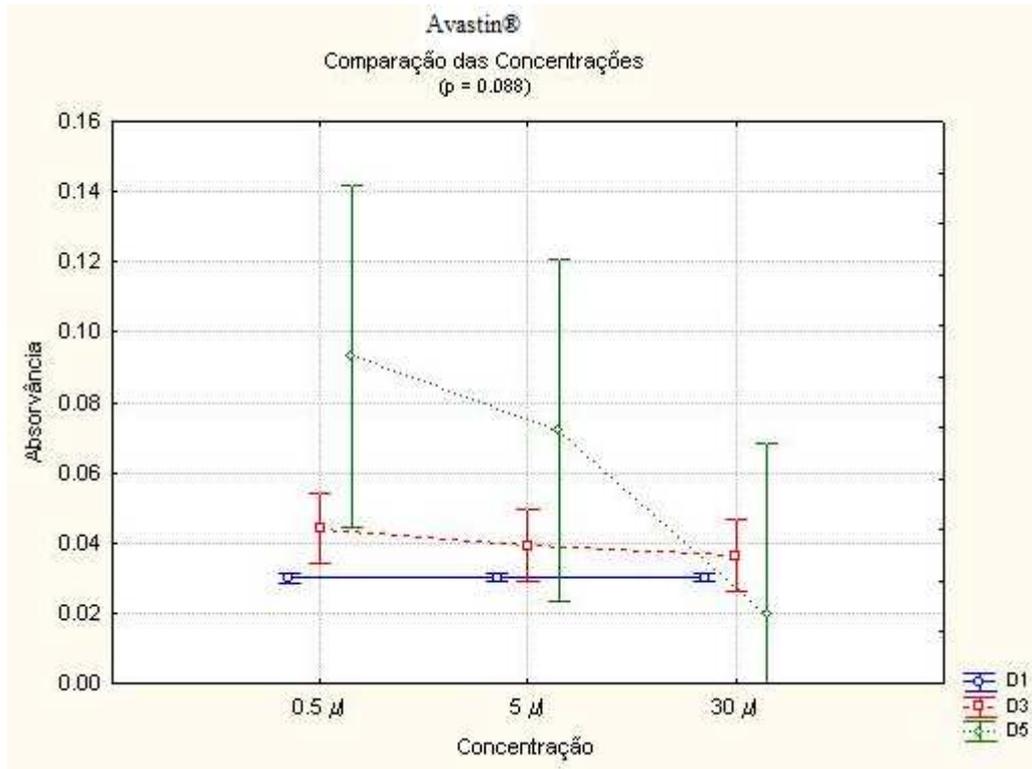


Gráfico 7 – Comparação das diferentes concentrações de Avastin® ao longo do tempo.

Observa-se que não existem diferenças significativas entre as várias concentrações ao longo do tempo ($p=0,088$).

Nos 1.º e 3.º dias não se observam diferenças estatisticamente significativas entre as várias concentrações ($p=0,650$ e $p=0,488$, respectivamente). Em ambos os dias a concentração de $0,5 \mu\text{l}$ apresenta valores mais elevados de absorvância.

Relativamente ao 5.º dia já se observam diferenças estatisticamente significativas entre as três concentrações ($p=0,026$), continuando a ser a concentração mais baixa a que tem valores de absorvância muito melhores.

A concentração de $30 \mu\text{l}$ apresenta, no geral, valores de absorvância mais baixos para os três tempos em estudo. Poder-se-á afirmar que concentrações de $30 \mu\text{l}$ poderão tornar-se citotóxicas ao longo do tempo.

O Gráfico 8 mostra os resultados de absorvância para as diferentes concentrações de vancomicina, ao longo do tempo.

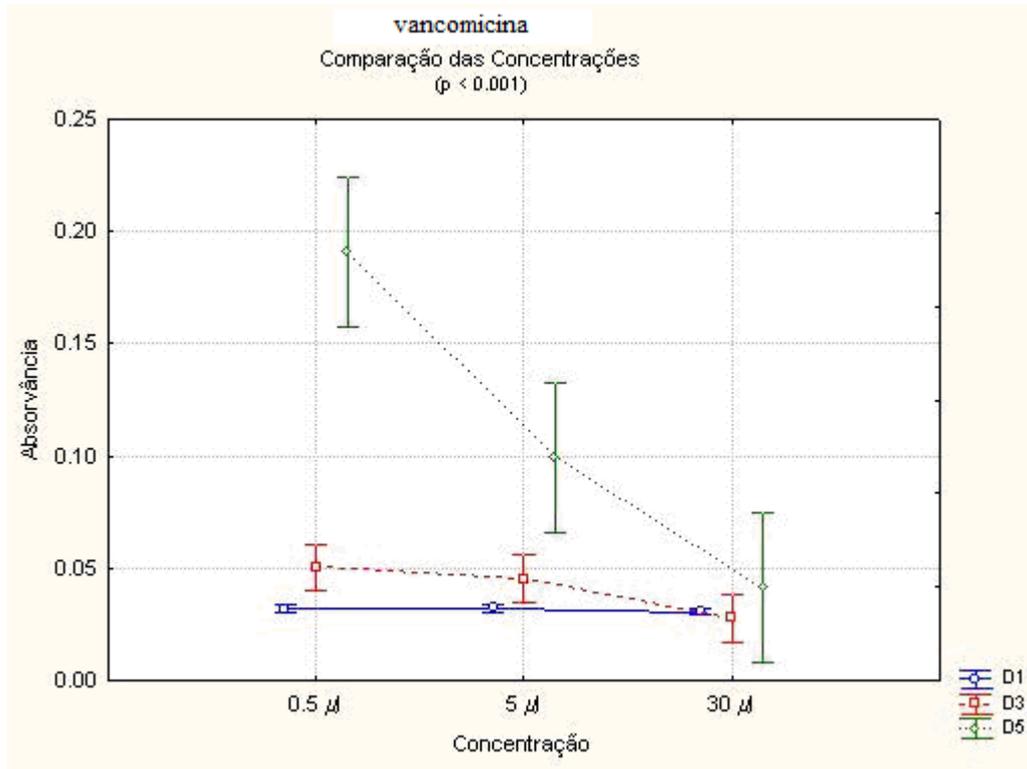


Gráfico 8 – Comparação das diferentes concentrações de vancomicina ao longo do tempo.

No gráfico anterior observam-se diferenças estatisticamente significativas entre as várias concentrações ao longo do tempo ($p=0,001$).

No primeiro dia não se observam diferenças estatisticamente significativas entre as várias concentrações ($p=0,457$), sendo os valores de absorvância muito idênticos.

Nos 3.º e 5.º dias observam-se diferenças estatisticamente significativas entre as três concentrações ($p=0,013$ e $p=0,0004$, respectivamente). Em ambos os dias a concentração de $0,5 \mu\text{l}$ apresenta melhores valores de absorvância e a de $30 \mu\text{l}$ os piores, sendo muito evidente especialmente no 5º dia.

Tal como acontecia para o Avastin® a concentração mais pequena é a que apresenta melhores valores de absorvância, principalmente ao 5º dia. Já as concentrações elevadas têm tendência a tornar-se citotóxicas. Os macrófagos não reagem bem a concentrações elevadas deste fármaco.

O Gráfico 9 mostra os resultados de absorvância das amostras de Avastin® e vancomicina ao longo do tempo.

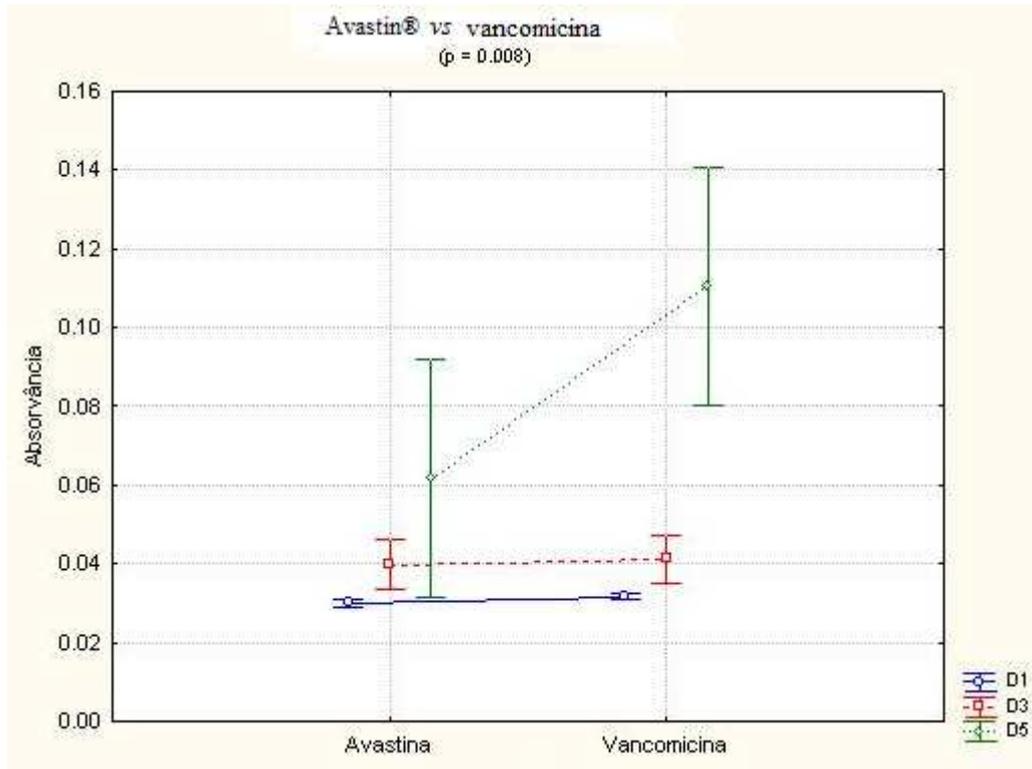


Gráfico 9 – Comparação das amostras de Avastin® e vancomicina ao longo do tempo.

Observam-se diferenças estatisticamente significativas entre o Avastin® e a vancomicina ao longo do tempo ($p=0,008$). Verifica-se um aumento de absorvância significativo do 3.º para o 5.º dia mais pronunciado para a vancomicina.

Pode dizer-se que, nas condições testadas, a vancomicina tem um efeito menos lesivo nos macrófagos, do que o Avastin®.

O Gráfico 10 mostra os resultados de absorvância das amostras de PLA_A e PLA_V ao longo do tempo.

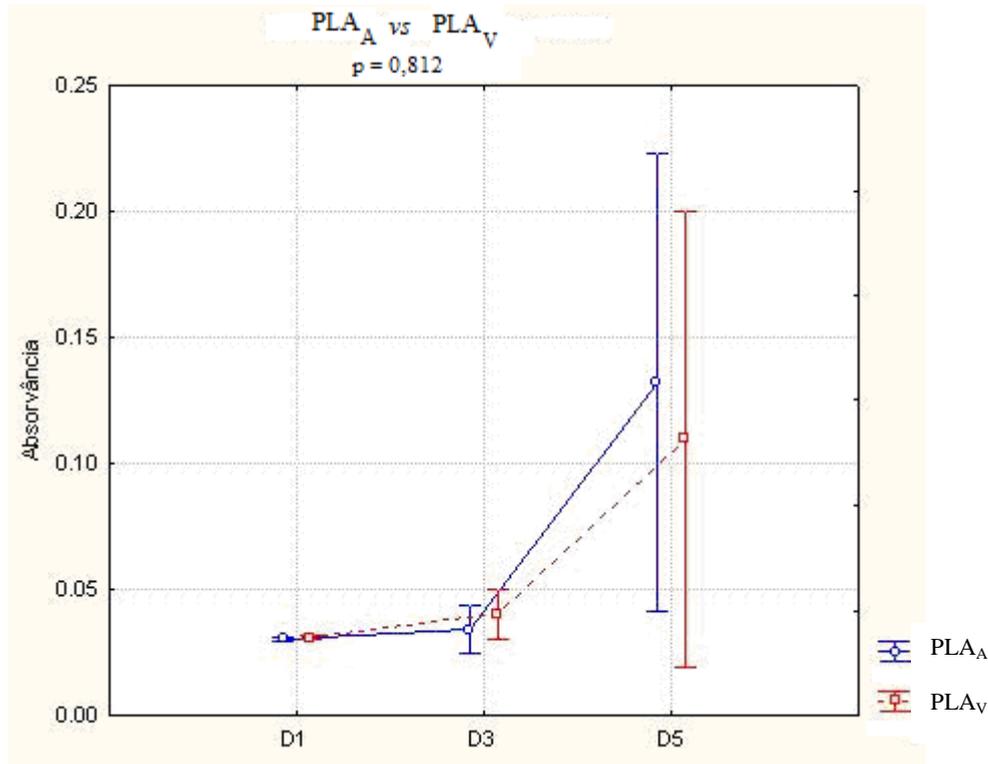


Gráfico 10 – Comparação das amostras de PLA_A e PLA_V ao longo do tempo.

Não são observadas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras de PLA lab encapsulando cada um dos fármacos ao longo do tempo ($p=0,812$).

No período de tempo em estudo também não se observam diferenças estatisticamente significativas entre as duas amostras ($p=0,179$ para o 1.º dia, $p=0,589$ para o 3.º dia e $p=0,818$ para o 5.º dia). Apresentam absorvâncias semelhantes nos três dias.

No 3.º dia os valores de absorvância são melhores para o PLA_V, possivelmente devido à libertação do fármaco.

Ao 5.º dia verifica-se um comportamento muito similar entre as duas amostras. Mais uma vez se poderão justificar estes resultados admitindo que houve degradação do PLA e, conseqüentemente, a libertação do Avastin[®], embora em muito pouca quantidade.

No Anexo 7, encontra-se uma tabela com todos os valores de p para as diferentes comparações que foram feitas anteriormente.

Conclusões e Trabalho Futuro

“Quanto maiores são as dificuldades a vencer, maior será a satisfação.”

Cícero

1. Conclusões

Foram preparadas micro e nanoesferas recorrendo à técnica da dupla emulsão, concluindo-se que a diferença de tamanhos estava muita relacionada com a velocidade e uniformidade de agitação, aquando da sua síntese. Conseguiu chegar-se à escala nanométrica, atingindo um dos objectivos deste trabalho.

As primeiras partículas de polímeros foram observadas por microscopia óptica, verificando-se que apresentavam uma forma perfeitamente esférica. Fez-se também uma análise de granulometria de onde se concluiu que havia alguma heterogeneidade de tamanhos, para além de serem da ordem dos micrómetros. Após a substituição do aparelho que provocava a agitação, durante a preparação das partículas, chegou-se então à escala nanométrica. Fez-se a análise das amostras PLA comercial, PLA-lab, A1, A2, V1 e V2 por SEM, observando-se óptima esfericidade. A análise granulométrica destas nanopartículas revelou que A1 e A2 eram maiores relativamente a V1 e V2 e que estas eram maiores que as partículas de PLA (sem fármaco encapsulado). Estes resultados são consistentes na medida em que o tamanho das moléculas de Avastin[®] é superior ao tamanho das moléculas de vancomicina. Por seu turno, as partículas vazias apresentaram o menor tamanho.

Fez-se a modificação da superfície numa das amostras de partículas de PLA, ligando aos grupos carboxílicos livres (que também foram contabilizados) uma proteína (BSA), para posteriormente se ligar o Avastin[®]. Este procedimento foi conseguido com a BSA, no entanto, por falta de tempo e de fármaco, não foi possível testar esta modificação com o Avastin[®].

Avaliou-se a eficiência de imobilização/encapsulamento para todas as amostras, obtendo-se resultados acima dos 95 % em todos os casos. Para o Avastin[®], a eficiência de encapsulamento ronda mesmo os 100 %.

Para avaliar a vantagem de utilizar as nanoesferas como um sistema de libertação dos fármacos em causa, fez-se o estudo da cinética dessa libertação. Verificou-se que a vancomicina encapsulada nas partículas de PLA-lab libertou-se completamente ao fim de 15 dias. Quanto ao Avastin[®] não se verificou a sua libertação durante quatro semanas. Por falta de tempo, não foi possível continuar com estes estudos de libertação deste fármaco.

Quanto aos testes de viabilidade celular e citotoxicidade, foi possível concluir, comparando os dois fármacos seleccionados, que a vancomicina livre (não encapsulada) apresenta valores de absorvância muito mais altos que o Avastin[®] livre (não encapsulada). Encontram-se mesmo diferenças significativas, logo este segundo fármaco poderá tornar-se citotóxico para o organismo, nas condições testadas (concentrações e tempo).

O tratamento estatístico dos resultados obtidos para as nanopartículas de PLA-lab e PLA-com revela que não há diferenças estatisticamente significativas entre elas, no entanto, as de PLA-com nem sempre mantêm o mesmo comportamento ao longo da experiência. Por vezes os macrófagos reagem melhor a estas partículas, outras vezes reagem melhor às de PLA-lab. Esta observação poderá ser explicada pelo facto do PLA-com não estar purificado e, por isso, cada amostra apresentar componentes diferentes.

Comparando os resultados obtidos para as partículas com Avastin[®] e com vancomicina pode dizer-se que não se encontram diferenças significativas, no entanto as com vancomicina têm valores mais altos de absorvância. Assim, as partículas encapsulando Avastin[®] poderão tornar-se citotóxicas para o organismo devido à libertação do fármaco ao longo do tempo.

Quando se comparam as absorvâncias registadas para partículas encapsulando vancomicina e com a vancomicina livre, não há diferenças significativas. São registados valores de absorvância elevados ao fim de cinco dias (D5). Estes resultados estão de acordo com as observações no que diz respeito à cinética de libertação da vancomicina encapsulada em amostras de PLA-lab. De facto, após cinco dias, mais de 85% do fármaco já foi libertado. Dado que este fármaco não é tóxico para os macrófagos e estes são activados por ele os valores de absorvância foram superiores aos basais.

Nas leituras de absorvância para partículas de PLA-lab com Avastin[®] e com Avastin[®] livre, pode dizer-se que não há diferenças estatisticamente significativas, no entanto, ao fim de cinco dias os valores de significância são praticamente atingidos. Os valores de absorvância mais elevados verificam-se para as amostras de PLA_A e do PLA-lab ao fim dos cinco dias. Estes resultados sugerem que possa haver uma acção dos macrófagos sobre as partículas de PLA_A, degradando o polímero e possibilitando a difusão do fármaco em quantidades não-citotóxicas para as células. Os macrófagos são activados pela presença do fármaco no meio mas dada a sua baixa concentração não se revela tóxico. Já os valores de absorvância para o Avastin[®] livre ao fim dos cinco dias

são muito baixos, o que sugere que este fármaco possa vir a tornar-se citotóxico em grandes concentrações.

2. Trabalho futuro

Para melhor interpretar os resultados obtidos em relação à interacção dos macrófagos com as nanopartículas de PLA-lab, poderiam ser efectuados estudos da quantidade de fármaco libertado após a incubação das células com este sistema transportador.

Seria interessante testar estes fármacos em nanopartículas de poli(ácido glicólico) (PGA) ou poli(ácido láctico co-glicólico) (PLGA), já que a sua degradação é muito mais rápida que a do PLA [117].

Poderia estudar-se a influência da concentração de fármaco imobilizado na determinação do seu coeficiente de difusão e verificar se a quantidade inicial de fármaco afecta o padrão de libertação.

A avaliação da cinética de libertação, partindo de diferentes quantidades de fármaco imobilizado, permitiria testar a relação ideal imobilizado/libertado e determinar a quantidade ideal de fármaco a encapsular, de forma a diminuir o número de injeções e, simultaneamente, produzir um tratamento tão rápido e eficaz quanto o possível.

O ideal seria definir a velocidade de libertação pretendida a cada patologia.

Poderia estudar-se a combinação de dois antibióticos aumentando assim o espectro de acção para um maior número de microrganismos, minimizar ou prevenir o aparecimento de estirpes resistentes e, eventualmente, tentar diminuir o efeito da toxicidade de um só antibiótico. Haveria assim uma sinergia dos dois fármacos.

Dado que o Avastin[®] ficou disponível tardiamente e em quantidades muito pequenas, não foi possível proceder à modificação da superfície das nanoesferas,

através de ligações covalentes entre os grupos carboxílicos do PLA e os amínicos do fármaco. Esta é uma sugestão para um trabalho a fazer futuramente.

Constatou-se que não houve libertação do Avastin[®] durante um grande período de tempo *in vitro*, no entanto, os testes de citotoxicidade revelaram resultados muito satisfatórios para as partículas de PLA_A. Sugere-se então que se façam estudos de degradação/libertação com estas nanopartículas encapsulando o fármaco em plasma sanguíneo ou e em sangue total para que se possa perceber melhor o mecanismo envolvido. Também poderá ser feita uma caracterização morfológica (*SEM*) destas partículas após contacto com as células.

Seria uma mais valia fazer testes *in vivo* com estes sistemas de libertação controlada. Testar-se-iam as nanopartículas com os fármacos encapsulados e com o Avastin[®] ligado covalentemente à superfície das mesmas.

Referências Bibliográficas

1. [http://www.aefml.pt/download/comissao2005/anotadas/cirurgia/ofthalmologia/S5.Traumatismo%20Ocular%20e%20Catarata%20\(10-01-2008\)%204.pdf](http://www.aefml.pt/download/comissao2005/anotadas/cirurgia/ofthalmologia/S5.Traumatismo%20Ocular%20e%20Catarata%20(10-01-2008)%204.pdf). [cited 28 de Junho de 2009].
2. <http://portal.alert-online.com/?key=680B3D50093A6A032E510E2D36020C400E2A322A2E4106273B4822515A7966>. [cited 12 de Agosto de 2009].
3. Manzano, R., P., A., et al., *Toxicidade intravítrea do Bevacizumab (Avastin)*, in *Retina*. 2006. p. 257-261.
4. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Olho>. [cited 28 de Maio, 2009].
5. http://www.visaolaser.com.br/doencas_cirurgia/conheca_o_olho/anatomia_do_olho.htm. [cited 28 de Maio de 2009].
6. Colthurst, M.J., et al., *Biomaterials used in the posterior segment of the eye*. *Biomaterials*, 2000. **21**(7): p. 649-665.
7. <http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos1.asp>. [cited 28 de Maio de 2009].
8. Alfar, S., C., *Mecanismo de permeação ocular de sistemas poliméricos coloidais: utilização da rodamina 6G como marcador de fluorescência incorporado em nanoesferas de poli-cianoacrilato de isobutilo (PIBCA)*, in *Departamento de Zoologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia* 1998, Universidade de Coimbra: Coimbra.
9. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Pupila>. [cited 28 de Maio de 2009].
10. Prereira, P.C., *Catarata e lesão oxidativa do cristalino - Uma abordagem à toxicidade de glucose na diabetes*, in *Departamento de Zoologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia*. 1996, Universidade de Coimbra: Coimbra.
11. Leiria, F.M.C., *Alterações oxidativas no cristalino durante a cataratogénese*, in *Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia*. 1996, Universidade de Coimbra: Coimbra.
12. <http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos1.asp>. [cited 28 de Maio de 2009].
13. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Pupila>. [cited 28 de Maio de 2009].
14. Mariz, M.J.M.L.M., *Preparação de uma lente intra-ocular dotada de um sistema de libertação controlada de fármaco*, in *Faculdade de Medicina*. 1999, Universidade de Coimbra: Coimbra.
15. Ratner B., H.A., Schoen F., Lemons J., *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine* ed. A. Press. 1996.
16. Sobral, M., M., *Membranas celulósicas como base de sistemas de libertação controlada de fármacos*, in *Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia*. 1994, FCTUC: Coimbra.

17. Martellini, F., *Matrizes poliméricas obtidas mediante radiação ionizante para sua utilização como sistemas de liberação controlada de fármacos*, in *Área da Tecnologia Nuclear*. 1998, Universidade de São Paulo: São Paulo.
18. Joseph Kost, R.L., *Responsive polymeric delivery systems*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001. **46**: p. 125-148.
19. Barbu, E., et al., *Polymeric materials for ophthalmic drug delivery: trends and perspectives*. *Journal of Materials Chemistry*, 2006. **16**(34): p. 3439-3443.
20. Shell, J.W., *Ophthalmic Drug Delivery Systems*. *Drug Development Research*, 1985. **6**: p. 245-261.
21. del Amo, E.M. and A. Urtti, *Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment*. *Drug Discovery Today*, 2008. **13**(3-4): p. 135-143.
22. Urtti, A., *Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006. **58**: p. 1131-1135.
23. De, T., K., et al., *Polycarboxylic acid nanoparticles for ophthalmic drug delivery: an ex vivo evaluation with human cornea*. *Journal of Microencapsulation*, 2004. **21**(8): p. 841-855.
24. Fialho, S., L. and A. Júnior, S., C., *Sistemas de transportes de drogas para o segmento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações*. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, 2007. **70**(1): p. 171-179.
25. Mariz, M., M., *Preparação de uma lente intra-ocular dotada de um sistema de liberação controlada de fármaco*, in *Faculdade de Medicina*. 1999, Universidade de Coimbra: Coimbra.
26. Vanrell, R.H., *New trends in controlled drug delivery to posterior segment*. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol*, 2007. **82**: p. 3-6.
27. Jain, R., et al., *Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1998. **24**(8): p. 703-727.
28. Bourges, J.L., et al., *Ocular drug delivery targeting the retina and retinal pigment epithelium using polylactide nanoparticles*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2003. **44**(8): p. 3562-3569.
29. Lapa, I.C.R., *Microesferas como sistema de liberação de moduladores de óxido nítrico para aplicação oftalmológica*. 2004, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra: Coimbra.
30. Kirt-Othmer, in *Encyclopedia of Chemical Thecnology*, W. Interscience, Editor. 1992. p. 628-650.
31. Arshady, *Polymer Engineering and Science*. 1990. **30**(15): p. 905-914.
32. Jahnol, V., D., et al. *Síntese e caracterização do poli (ácido L-láctico) e sua avaliação em culturas de osteoblastos humanos*. in *Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais*. 2006. Foz do Iguaçu- Brasil.

33. Steinbuechel, A. and R. Marchessault, H., *Biopolymers for Medical and Pharmaceutical Applications*, ed. Wiley-VCH. Vol. 1.
34. Drumright, R., E., P. Gruber, R., and D. Henton, E., *Polylactic acid technology*. Advanced Materials, 2000. **12**(23).
35. Anderson, J.M. and M.S. Shive, *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997. **28**(1): p. 5-24.
36. Albertsson, A.C., Karlsson, S., *Degradable polymers for the future*. Biomaterials, 1995. **46**(2): p. 114-123.
37. Griffith, L.G., *Polymeric biomaterials*. Acta Materialia, 2000. **48**(1): p. 263-277.
38. Panyam, J. and V. Labhasetwar, *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003. **55**(3): p. 329-347.
39. Vert, M., J. Mauduit, and S. Li, *Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity* Biomaterials, 1994. **15**: p. 1209-1213.
40. Athanasiou, K., A., G. Niederauer, G., and C. Agrawal, M., *Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers*. Biomaterials, 1996. **17**(2): p. 93-102.
41. Saettone, M., F. and L. Salminen, *Ocular inserts for topical delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1995. **16**: p. 95-106.
42. Couvreur, P., C. Dubernet, and F. Puisieux, *Controlled Drug Delivery with Nanoparticles: Current Possibilities and Future Trends*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1995. **41**(1): p. 2-13.
43. Verónica Lassalle, M.L.F., *PLA Nano- and Microparticles for Drug Delivery: An Overview of the Methods of Preparation*. Macromolecular Bioscience, 2007. **7**: p. 767-783.
44. Santos, A., B., V. Ferreira, P., and C. Grosso, R., *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 2000: p. 26-30.
45. Ross, M.L., P. Yuan, and M.R. Robinson, *Intraocular drug delivery implants*. Ophthalmology, 2000. **7**: p. 95.
46. Arshady, *Polymer Engineering and Science*. 1989. **29**(24): p. 1746-1758.
47. Abraham Domb, e.a., *Degradable Polymers for Site-specific Drug Delivery*. Polymers for Advanced Technologies, 1992. **3**.
48. Torchilin, V., *Introduction. Nanocarriers for drug delivery: Needs and requirements*.
49. Monteiro, J.d.F.e.B.d.P., *Desenvolvimento de microesferas/microcápsulas para modificação de superfícies*, in *Departamento de Engenharia Química da FCTUC*. 2003, Universidade de Coimbra: Coimbra.
50. Mundargi, R.C., et al., *Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives*. Journal of Controlled Release, 2008. **125**: p. 193-209.

51. Coimbra, P.M.A., *Solubilidade de fármacos oftalmológicos em dióxido de carbono supercrítico*, in *Departamento de Engenharia Química da FCTUC*. 2004, Universidade de Coimbra: Coimbra.
52. Krober, H. and U. Teipel, *Microencapsulation of particles using supercritical carbon dioxide*. *Chemical Engineering and Processing*, 2005. **44**: p. 215-219.
53. Patrícia A. Coimbra; Hermínio C. De Sousa, M.H.G., *Preparation and characterization of flurbiprofen-loaded poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) microspheres*. *Journal of Microencapsulation*, 2008. **25**(3): p. 170-178.
54. Jonsson, B., et al., *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 1998: John Wiley & Sons.
55. Lamprecht, A., et al., *Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000. **196**: p. 177-182.
56. Gardi, N., *Double emulsions - Scope, limitations and new achievements*. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 1997. **123**: p. 233-246.
57. Kreuter, J., *Nanoparticle-based drug delivery systems*. *Journal of Controlled Release*, 1991. **16**: p. 169-176.
58. Rodrigues E. B. et al, *Treatment of neovascular age-related macular degeneration with antiangiogenic drugs*. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*, 2006. **69**(5): p. 756-765.
59. Bressler, N., M. and J. Gills, P., *New hope for a common problem comes from photodynamic therapy*. *British Medical Journal*, 2000. **321**: p. 1425-1427.
60. Robert J. Klein, C.Z., 2* Emily Y. Chew,3* Jen-Yue Tsai,4* Richard S. Sackler,1 Chad Haynes,1 Alice K. Henning,5 John Paul SanGiovanni,3 Shrikant M. Mane,6 Susan T. Mayne,7 Michael B. Bracken,7 Frederick L. Ferris,3 Jurg Ott,1 Colin Barnstable,2 Josephine Hoh7, *Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration*. *Science*, 2005. **308**(5720): p. 385-389.
61. Folkman J., S.Y., *Angiogenesis*. *Journal of Biological Chemistry*, 1992. **267**: p. 10931-10934.
62. King, T.W. and C.W. Patrick, *Development and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) microspheres using a solid encapsulation/single emulsion/solvent extraction technique*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000. **51**(3): p. 383-390.
63. Ferrara, N., *The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis*. *American Journal Physiology - Cell Physiology*, 2001. **280**(6): p. C1358-C1366.
64. Kim, K., J., B. Li, and J. Winer, *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo*. *Nature*, 1993. **362**: p. 841-844.
65. Lucena, D. and R. Yamane, *Antiogénicos no Glaucoma*. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, 2008. **67**(6): p. 313-320.
66. Adamis, A., et al., *Archives ophthalmology*, 1996. **114**(1): p. 66-71.

67. Krzystolik, M., G., et al., *Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment*. Archives ophthalmology, 2002. **120**(3).
68. Aiello, L., P., et al., *Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF - receptor chimeric proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(23): p. 10457-10461.
69. Avery, R., L., et al., *Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration*. Ophthalmology, 2006. **113**(3): p. 363-372.
70. Avery, R., D., et al., *Intravitreal Bevacizumab (Avastin) for Neovascular Age-Related Macular Degeneration*. American Academy of Ophthalmology 2006. **113**: p. 363-372.
71. Rosenfeld, P., J., A. Fung, E., and C. Puliafito, A. , *Optical Coherence Tomography Findings After an Intravitreal Injection of Bevacizumab (Avastin®) for Macular Edema From Central Retinal Vein Occlusion*. Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging, 2005. **36**.
72. Rosenfeld, P., J., A. Moshfeghi, A., and C.A. Puliafito, *Optical Coherence Tomography Findings After an Intravitreal Injection of Bevacizumab (Avastin®) for Neovascular Age-Related Macular Degeneration*. Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging 2005. **36**: p. 331-335.
73. Rosenfeld, P., J., A. Fung, and C. Puliafito, *Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion*. Ophthalmic Surgery Lasers and Imaging, 2005. **36**.
74. Moshfeghi, A.A. and G.A. Peyman, *Micro- and nanoparticulates*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**(14): p. 2047-2052.
75. Saishin Y., S.R.L., et al, *Periocular Injection of Microspheres Containing PKC412 Inhibits Choroidal Neovascularization in a Porcine Model*. Ophthalmology & Visual Science, 2003. **44**(11): p. 4989-4993.
76. Carrasquillo, K.G., et al., *Controlled delivery of anti-VEGF aptamer EYE001 with poly(lactic-co-glycolic)acid microspheres*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2002. **43**: p. U553-U553.
77. http://www.lincx.com.br/lincx/saude_a_z/esp_medicas/retinopatia.asp. [cited 16 de Julho de 2008].
78. Liu, X., *The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing*. Biomaterials, 2007. **28**: p. 1280-1288.
79. Hofling-Lima, A.L. and A.M. Petrilli, *Endoftalmite bilateral por Propionibacterium acnes após facectomia com implante não simultânea*. Arquivo Brasileiro de Oftalmologia, 2001. **64**: p. 71-74.
80. Lutz, J.F. and H.G. Borner, *Modern trends in polymer bioconjugates design*. Progress in Polymer Science, 2008. **33**(1): p. 1-39.
81. Pincus, J., P. Deiter, and M. Sears, L. , *Experiences with five cases of post-operative endophthalmitis*. American Journal of Ophthalmology 1965. **59**: p. 403-409.

82. Neveu, M. and A. Elliot, J. Prophylaxis and treatment of endophthalmitis. *Am J Ophthalmol* 1959;48:368-73., *Prophylaxis and treatment of endophthalmitis*. American Journal of Ophthalmology, 1959. **48**: p. 368-373.
83. Meredith, T., A., *Antimicrobial pharmacokinetics in endophthalmitis treatment: studies of ceftazidime*. Transactions of the American Ophthalmology Society, 1993. **91**: p. 653-699.
84. Peyman, G., A. and J. Schulman, A., *Replacement of vitreous. Intravitreal Surgery-Principles and Practice*. 1994: Norwalk:Appleton & Lange.
85. Peyman, G., A. and S. Bassili, S., *A practical guideline for management of endophthalmitis*. *Ophthalmic Surgery*, 1995. **26**(4): p. 284-303.
86. Pavan, P., R., et al., *Exogenous endophthalmitis initially treated without systemic antibiotics*. *Ophthalmology*, 1994. **101**(7): p. 1289-1297.
87. Guyton, A., C., *Tratado de Fisiologia Médica*. 1992, 8ª Edição. Interamericana. McGraw-Hill: Madrid. p. 380-386.
88. Young, B. and J. Heath, W., *Histologia Funcional*. 2000, Rio de Janeiro: 4ª Edição. Guanabara Koogan. 56-60.
89. Wilson, J., D. et al, *Harrison: Medicina Interna*. Vol. 1. 1992, Rio de Janeiro: 12ª Edição. Guanabara Koogan.
90. Matos, C.M.P., *Criação de um banco de macrófagos: estudos preliminares, in Departamento de Bioquímica da FCTUC*. 2007, Universidade de Coimbra.
91. Mosmann, T., *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Applications to Proliferation and Cytotoxicity Assays*. *Journal of Immunological Methods*, 1993. **65**(1-2): p. 55-63.
92. Santos, A., C., *Água trocável do pulmão: contribuição para o desenvolvimento de uma metodologia para a sua avaliação, in Faculdade de Medicina*. 2002, Universidade de Coimbra: Coimbra.
93. Meier, W., *Polymer nanocapsules*. *Chemical Society Review*, 2000. **29**: p. 295-303.
94. Liu, Y., et al., *Mechanism of cellular 3 - (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction*. *Journal of Neurochemistry*, 1997. **69**: p. 581-5932.
95. Stuart, B.H., *Polymer Analysis*, ed. C. David J. Ando, Dartford, Kent, UK, Australia: John Wiley & Sons, Ltd.
96. Barreiros, F.M.C., *Caracterização da forma de partículas por técnicas de análise granulométrica in Departamento de Engenharia Química da FCTUC*. 1994, Universidade de Coimbra: Coimbra.
97. Cohn, D. and G. Lando, *Tailoring lactide/caprolactone co-oligomers as tissue adhesives*. *Biomaterials*, 2004. **25**(27): p. 5875-5884.
98. Fialho, S., L., et al., *Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular*. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, 2003. **66**: p. 891-896.

99. www.softalmologia.pt. [cited 25 de Julho de 2009].
100. Makarczyk, L.d.S.Q., *Vancomicina lipossomal para tratamento de endoftalmite experimental em coelhos*, in *Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto*. 2006, S. Paulo.
101. Gomez-Graete, C., et al., *Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **331**(2): p. 153-159.
102. Zhang, J., X., et al., *Optimizing double emulsion process to decrease the burst release of protein from biodegradable polymer microspheres*. Journal of Microencapsulation, 2005. **22**(4): p. 413-422.
103. Yang, Y.Y., et al., *Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method*. Chemical Engineering Science, 2000. **55**(12): p. 2223-2236.
104. Ho, M., L., et al., *Controlled release BSA made by W/O/W emulsion method containing PLGA and hydroxyapatite* Journal of controlled Release, 2008. **128**(2): p. 142-148.
105. Bittner, B., et al., *Degradation and protein release properties of microspheres prepared from biodegradable poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers: influence of buffer media on polymer erosion and bovine serum albumin release*. Journal of controlled Release, 1999. **60**: p. 297-309.
106. Rozier, A., et al., *Gelvrite: a novel ion-inactivated in-situ gelling polymer for ophthalmic vehicles. Effect on bioavailability of timolol*. International Journal of Pharmaceutics, 1989. **57**: p. 163-168.
107. Pistel, K., F., et al., *Brush-like branched biodegradable polyesters, part III: protein release from microspheres of poly(vinyl alcohol)-graft-poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)*. Journal of Controlled Release, 2001. **73**(1): p. 7-20.
108. Govender, T., et al., *PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug*. Journal of Controlled Release, 1999. **57**(2): p. 171-185.
109. Carrasquillo, K.G., et al., *Non-aqueous encapsulation of excipient-stabilized spray-freeze dried BSA into poly(lactide-co-glycolide) microspheres results in release of native protein*. Journal of Controlled Release, 2001. **76**(3): p. 199-208.
110. Gil, M., H. *Immobilization of proteins, enzymes and cells onto graft copolymeric substrates*. 1983, Leeds.
111. McClean, S., et al., *Binding and uptake of biodegradable poly-DL-lactide micro- and nanoparticles in intestinal epithelia*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998. **6**(2): p. 153-163.
112. Sigma-aldrich, *Bradford Reagent - Technical Bulletin*.
113. http://www.vuw.ac.nz/staff/paul_teesdale-spittle/peptide-synthesis/images/carbodiimide.gif. [cited 26 de Agosto de 2009].

114. Cordeiro, R.A., *Preparação e caracterização de microesferas para liberação controlada de fármacos em oftalmologia*, in *Departamento de Engenharia Química da FCTUC*. 2007, Universidade de Coimbra.
115. Weir, D., M., *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Publ. 2nd Ed. ed. Vol. 2 - Cap.36. 1973, Oxford, UK.
116. Mohamed, A., S. Gordon, H., and G. Biresaw, *Poly(lactid acid)/Polystyrene bioblends characterized by thermogravimetric analysis, differential scanning calorimetry, and photocoustic infrared spectroscopy*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007. **106**: p. 16089-1696.
117. Zimmer, A. and J. Kreuter, *Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1995. **16**: p. 61-73.

Anexos

Anexo 1

Tabela 11 – Resumo das várias preparações preparação das partículas de PLGA, onde se fez variar as concentrações da fase orgânica, as concentrações da fase aquosa e a velocidade de rotação.

	Fase Orgânica (O)	Fase Aquosa (W)	Notas
PLGA1 95/5	0,25 g PLA 10 ml CHCl ₃	0,5 g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota; <i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min (O); Agitação magnética 700 rpm, 4 h.
PLGA2 95/5	0,50 g PLA 10 ml CHCl ₃	0,5 g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h.
PLGA3 95/5	0,35 g PLA 10 ml CHCl ₃	0,5g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h.
PLGA4 95/5	0,25 g PLA 10 ml CHCl ₃	1,0g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h.
PLGA5 95/5	0,35 g PLA 10 ml CHCl ₃	1,0g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h.
PLGA7 95/5	0,25 g PLA 10 ml CHCl ₃	0,5g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 13 500 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 13 500 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h.

Tabela 12 – Resumo das várias preparações preparação das partículas de PLA- γ HB, onde se fez variar as concentrações da fase orgânica, as concentrações da fase aquosa e a velocidade de rotação.

	Fase Orgânica (O)	Fase Aquosa (W)	Notas
PLA- γ HB 1	0,25 g PLA 10 ml CHCl ₃	0,5g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 8000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 8000 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 horas.
PLA- γ HB 2	0,50 g PLA 10 ml CHCl ₃	0,5g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h.
PLA- γ HB 3	0,35 g PLA 10 ml CHCl ₃	0,5g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota; (O) <i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min; Agitação magnética 500 rpm, 4 h.
PLA- γ HB 4	0,35 g PLA 10 ml CHCl ₃	0,5g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h.
PLA- γ HB 5	0,25 g PLA 10 ml CHCl ₃	1,0g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h.
PLA- γ HB	0,35 g PLA 10 ml CHCl ₃	1,0g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 8 000 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h.
PLA- γ HB	0,25 g PLA 10 ml CHCl ₃	0,5g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 13 500 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 13 500 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h.
PLA- γ HB 1	0,25 g PLA 10 ml CHCl ₃	0,5g PVA 80 100 ml H ₂ O	<i>Homogeneizer</i> 24 000 rpm, 10 min (W); Adicionar o PLA gota a gota (O); <i>Homogeneizer</i> 24 000 rpm, 5 min; Agitação magnética 700 rpm, 4 h.

Anexo 2

Curva de calibração para a vancomicina em lágrimas artificiais:

$$m = 20\text{mg}$$

$$V = 25\text{ ml}$$

$$c_i = \frac{m}{V} = \frac{20\text{mg}}{25\text{ml}} = 0,8\text{mg/ml} = 800\text{mg/L}$$

A massa utilizada foi de 20,49 mg, pelo que se deve proceder à correcção da concentração final (Quadro 13).

Quadro 13 – Registo das concentrações e volumes das soluções de vancomicina em lágrimas artificiais.

C_f (mg/l)	V_f	$V_i=3,5\text{ml}$	Concentração corrigida (mg/l)
280	10	3,5	286,86
240	10	3,0	245,88
200	10	2,5	204,90
160	10	2,0	163,92
120	10	1,5	122,94
100	10	1,25	102,45
80	10	1,0	81,96
40	10	0,5	40,98

Quadro 14 – Quantidades utilizadas para a medição de absorvâncias de vancomicina em lágrimas artificiais.

Tubo nº	[] mg/l	A_{281}
0	0	0,0000
1	286,86	1,2159
2	245,88	1,05443
3	204,90	0,88886
4	163,92	0,70184
5	122,94	0,53185
6	102,45	0,45739
7	81,96	0,37284
8	40,98	0,18855

O tubo 0 é o branco; apenas contém solução de lágrimas artificiais

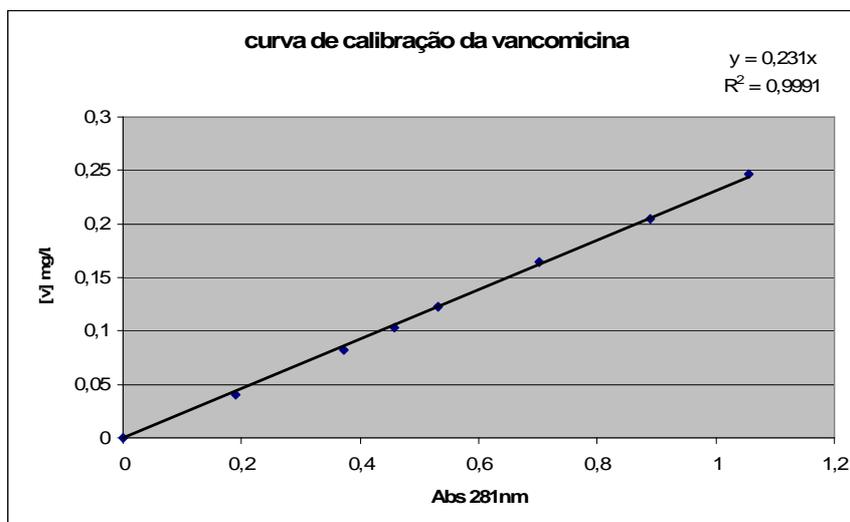


Fig. 34 – Curva de calibração da vancomicina em lágrimas artificiais.

Anexo 3

Quantificação de BSA – método do Reagente de *Bradford*

As quantidades utilizadas para o registo das absorvâncias encontram-se no Quadro 15.

Quadro 15 – Quantidades utilizadas para a medição de absorvâncias da BSA.

Tubo nº	Amostra de BSA (ml)	[BSA] mg/ml	Bradford (ml)	A ₅₉₅
0	0,05	0	1,5	0,0000
1	0,05	0,2	1,5	0,1481
2	0,05	0,4	1,5	0,2922
3	0,05	0,6	1,5	0,4196
4	0,05	0,8	1,5	0,5504
5	0,05	1,0	1,5	0,6851

O tubo 0 contém apenas Reagente de *Bradford* e solução tampão. É o branco.

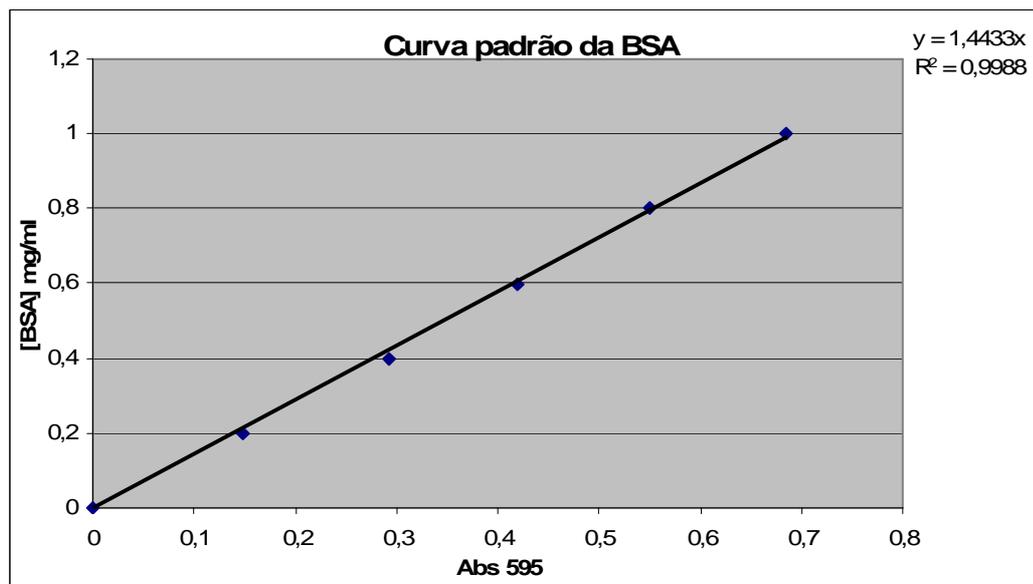


Fig. 35 – Curva de calibração para a BSA, quantificada com o reagente de *Bradford*.

Anexo 4

Quadro 16 – Quantidades utilizadas para a medição de absorvâncias de vancomicina em PBS.

Tubo n°	[Vanc] mg/l	A_{281}
0	0	0,0000
1	221,10	0,82602
2	201,00	0,77949
3	160,80	0,63418
4	120,60	0,47312
5	100,50	0,38447
6	80,40	0,32028
7	40,20	0,18049

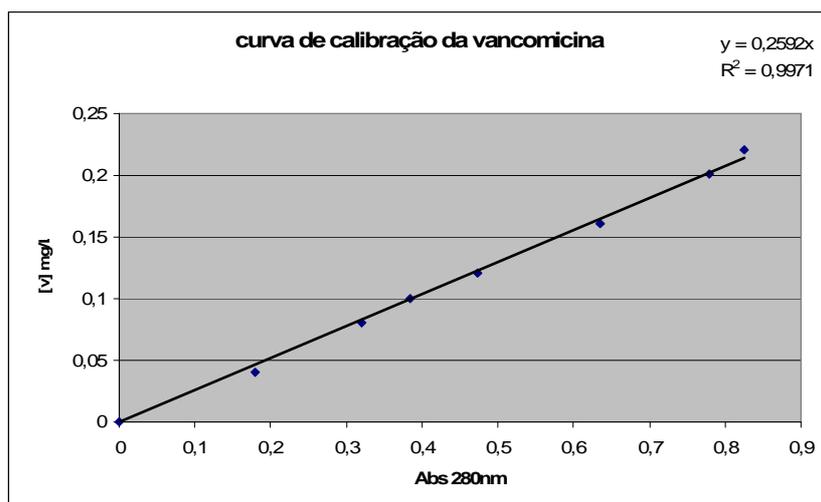


Fig. 36 – Curva de calibração para a vancomicina em PBS.

Anexo 5

Eficiência de encapsulamento e *drug loading* – cálculos

Quadro 17 – Massas das nanoesferas depois de liofilizadas.

Amostra	Massa do vial (g)	Massa total (g)	Massa amostra (mg)
A1	11,5111	11,65	139,0
A2	11,4443	11,57	127,0
V1	11,4292	11,57	140,8
V2	11,4132	11,49	76,8
PLA com.	11,50660	11,61	103,5
PLA-lab.	11,51706	11,64	123,0

$$Eficiência = \frac{M_{\text{fármaco encapsulado}}}{M_{\text{fármaco inicialmente adicionado}}} \times 100 = \frac{M_{\text{fármaco inicialmente adicionado}} - M_{\text{fármaco não encapsulado}}}{M_{\text{fármaco inicialmente adicionado}}} \times 100$$

$$Eficiência(V1) = \frac{5,00 - 0,1725}{5,00} \times 100 = 96,6\%$$

$$Eficiência(V2) = \frac{5,00 - 0,2336}{5,00} \times 100 = 95,3\%$$

$$Eficiência(A1) = \frac{25,00 - 0,098}{25,00} \times 100 = 99,6\%$$

$$Eficiência(A2) = \frac{25,00 - 0,3513}{25,00} \times 100 = 98,6\%$$

$$\text{"Drug loading"} (V1) = \frac{M_{\text{fármaco encapsulado}}}{M_{\text{nanopartículas encapsuladas}}} \times 100 = \frac{5,00 - 0,1725}{140,8} \times 100 = 3,4\%$$

$$\text{"Drug loading"} (V2) = \frac{M_{\text{fármaco encapsulado}}}{M_{\text{nanopartículas encapsuladas}}} \times 100 = \frac{5,00 - 0,2336}{76,8} \times 100 = 6,1\%$$

$$\text{"Drug loading"} (A1) = \frac{M_{\text{fármaco encapsulado}}}{M_{\text{nanopartículas encapsuladas}}} \times 100 = \frac{25,00 - 0,098}{139} \times 100 = 17,9\%$$

$$\text{"Drug loading"} (A2) = \frac{M_{\text{fármaco encapsulado}}}{M_{\text{nanopartículas encapsuladas}}} \times 100 = \frac{25,00 - 0,3513}{127} \times 100 = 19,4\%$$

Anexo 6

Ligação covalente de uma proteína às micro/nanoesferas

A uma massa de 35,1 mg de partículas de PLA1 correspondem 0,680 mg (em 10 ml de BSA+tampão). Significa que em 1 000 mg, a quantidade de BSA que se ligou à superfície de PLA1 foi de 19,37 mg/g

Anexo 7

Quadro 18 – Valores de p das comparações, em cada dia.

Gráfico	D1	D2	D3
1	0,289	0,713	0,056
2	0,062	0,234	0,523
3	0,108	0,468	0,066
4	0,378	0,298	0,378
5	0,650	0,488	0,026
6	0,457	0,013	0,0004
7	0,0009	1,000	0,051
8	0,179	0,589	0,818