

DISPOSITIVO OFTÁLMICO PARA TRATAMENTO DE GLAUCOMA

S.O. Rogero¹, F.H. Pusceddu¹, A.B. Andrade¹, G.N. Carvalho¹, A.A.S. Lima Filho², A.B. Lugão¹, J.R. Rogero¹

Av. Prof. Lineu Prestes, 2242; Cidade Universitária; 05508-000; São Paulo, SP
sorogero@ipen.br

¹ IPEN/ CNEN – SP – Centro de Química e Meio Ambiente

² Faculdade de Medicina – Departamento de Oftalmologia - UNIFESP - SP

RESUMO

O glaucoma, uma neuropatia progressiva do nervo ótico, necessita da utilização de medicação contínua durante toda a vida do paciente. Por ser uma doença que atinge geralmente a população idosa, seu tratamento pode apresentar problemas como sua interrupção pelo custo elevado do medicamento, pelo fator esquecimento e perda na aplicação do colírio. Entre os vários princípios ativos para controlar a pressão intraocular (PIO) o timolol, um beta bloqueador adrenérgico, é um dos mais usados. O objetivo deste trabalho foi utilizar o silicone como matriz polimérica para o desenvolvimento de um dispositivo oftálmico para liberação de doses diárias diluídas e contínuas do timolol para o tratamento de glaucoma. Aditivos para melhorar a cinética de liberação do timolol foram testados, tendo sido eleito o miristato de isopropila 5% na formulação, obtendo-se liberação de timolol em até 30 dias.

Palavras-chave: Glaucoma, dispositivo de liberação, silicone

INTRODUÇÃO

O glaucoma é causado por diferentes enfermidades que, na maioria dos casos, levam a um aumento da PIO (pressão intraocular). O aumento da pressão é causado por um bloqueio ao fluido no interior do olho e com o tempo isto causa dano ao nervo óptico. Esta pressão aumentada passa a atuar sobre a parte mais fraca do olho, o ponto na esclera onde o nervo óptico deixa o olho. O nervo óptico é a parte do olho que carrega a informação visual até o cérebro. É formado por mais de um milhão de células nervosas. Quando se eleva a pressão no olho, as células nervosas tornam-se comprimidas, o que as danifica, e eventualmente até causa sua morte. A morte destas células resulta

em perda visual permanente. Através da detecção precoce, diagnóstico e tratamento, o paciente e o oftalmologista podem ajudar a preservar a visão ⁽¹⁾.

Por ser uma doença que atinge geralmente a população idosa, seu tratamento pode apresentar problemas como sua interrupção pelo custo elevado do medicamento, pelo fator esquecimento e perda na aplicação do colírio ⁽²⁾. Entre os vários princípios ativos para controlar a PIO, o timolol, um beta bloqueador adrenérgico, é um dos mais usados.

O objetivo deste trabalho foi utilizar o silicone como matriz polimérica para o desenvolvimento de um dispositivo oftálmico para liberação de doses diárias diluídas e contínuas do timolol para o tratamento de glaucoma.

METODOLOGIA

Obtenção da matriz polimérica

O silicone Med 6210 da Nusil foi utilizado para obtenção de uma matriz polimérica adequada para compor um sistema de liberação de timolol para tratamento de glaucoma.

Foram preparadas matrizes de silicone com adição de cetiol AB, cetiol CC, ácido oleico e miristato de isopropila, cujas formulações estão apresentadas na Tab1.

Somente as formulações contendo ácido oleico não apresentaram reticulação adequada (formulações 3 e 4) quando obtidas em moldes circulares e em forma de meia lua, apresentados na Fig.1.

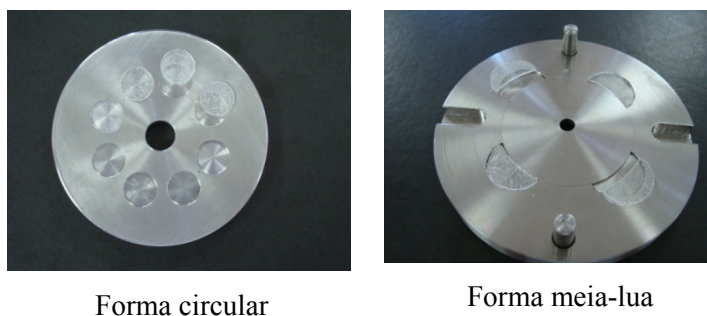


Figura 1. Moldes de aço inoxidável para obtenção dos dispositivos oftálmicos

Tabela 1. Formulações de matrizes de silicone com diferentes aditivos

Componentes	Formulação					
	1	2	3	4	5	6
Med 6210 Parte A	49,5%	49,5%	47,5%	40%	47,5%	40%
Parte B	49,5%	49,5%	47,5%	40%	47,5%	40%
Cetiol AB	1%	-	-	-	-	-
Cetiol CC	-	1%	-	-	-	-
Ácido oleico	-	-	5%	-	-	-
Ácido oleico	-	-	-	20%	-	-
Miristato de isopropila	-	-	-	-	5%	-
Miristato de isopropila	-	-	-	-	-	20%

Após a reticulação as formulações 1, 2, 5 e 6 foram esterilizadas em radiação gama (dose de 25kGy) e submetidas ao ensaio de citotoxicidade para verificar a possibilidade de uso como matriz no sistema de liberação de timolol.

Teste *in vitro* de citotoxicidade das matrizes contendo aditivos

O teste de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro foi realizado de acordo com as normas internacionais ⁽²⁾ e procedimento descrito em trabalhos publicados ^(3,4). Foi utilizado o látex de borracha natural como controle positivo e, como controle negativo, o polietileno de alta densidade (HDPE).

Primeiramente, foram preparados extratos das amostras a serem analisadas pela imersão das mesmas em meio de cultura celular (MEM), na proporção de 1cm² por mL do meio MEM, durante 24h em estufa a 37°C. Foram feitas diluições seriadas dos extratos obtidos em MEM.

O ensaio foi realizado colocando-se estas diluições seriadas dos extratos em contato com cultura de células de tecido conectivo de camundongo da linhagem NCTC L929 da American Type Culture Collection (ATCC), em microplaca de 96 poços. A microplaca foi deixada em estufa a 37°C com

atmosfera úmida e 5% CO₂ durante 24h. Após este período, as soluções foram substituídas pelo meio de cultura MEM contendo vermelho neutro, e a microplaca foi incubada por mais 3h em estufa. Decorrido este tempo, necessário para a incorporação e fixação do vermelho neutro nas células íntegras, o meio foi descartado e a microplaca lavada com tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4. As células foram então rompidas para liberação do vermelho neutro incorporado pelas células vivas com solução de ácido acético e etanol e a densidade óptica dos poços da microplaca lida em espectrofotômetro para leitura de microplaca tipo ELISA, Sunrise da Tecan, em 540nm. A partir das leituras de DO foram calculadas as porcentagens e as médias de viabilidade celular de cada diluição, tendo como padrão 100% um controle de células na mesma microplaca.

Obtenção do dispositivo de timolol

O timolol foi incorporado na matriz de silicone com 5% de miristato de isopropila, na concentração de 1%, reticulado no molde e esterilizado em radiação gama.

Cinética de liberação *in vitro* do timolol

Cerca de 1 g de dispositivos foram imersos em 5 mL de PBS 0,1M pH = 7,0 em frascos de vidro, em triplicata, e colocadas em uma incubadora da Tecnal, modelo TE-420, sob agitação constante a 37°C. Alíquotas de 1 mL foram coletadas diariamente durante 30 dias. A solução tampão, após a coleta da alíquota, foi substituída por solução tampão fresca, diariamente.

O doseamento do timolol ⁽⁵⁾ foi realizado em HPLC da Shimadzu com módulo de comunicação para operação CBM-10 A e programa para aquisição de dados CLASS-LC10. Foram injetados 80 µL das amostras coletadas em uma coluna de fase reversa C18 (4 µm x 250 mm x 4.6 mm) proveniente da Varian, utilizando fluxo de 0,8 mL/min e detecção realizada em 294 nm. A fase móvel utilizada neste ensaio consiste em 85% de solução tampão fosfatada pH 2,5, 10% de metanol e 5% de acetonitrila em um sistema isocrático. Para quantificar o timolol foi feito a análise comparativa dos picos nos

cromatogramas obtidos com os da curva padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Fig. 2 está apresentado o gráfico com as curvas da viabilidade celular das matrizes de silicone Med 6210 com diferentes aditivos. Neste gráfico pode-se verificar que todas as amostras de matrizes testadas apresentaram comportamento semelhante ao controle negativo, ou seja, não mostraram toxicidade. Somente o controle positivo mostrou-se tóxico, como era esperado, apresentando índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$) de 43.

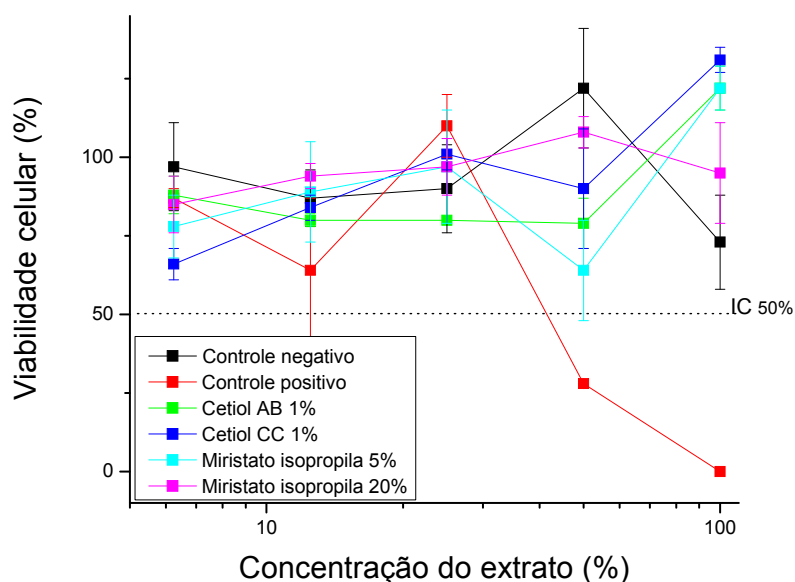


Figura 2. Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade das matrizes de silicone com diferentes aditivos, pelo método de incorporação do vermelho neutro.

O resultado do ensaio de citotoxicidade indica que o silicone Med 6210 com adição de cetiol AB, cetiol CC, na concentração de 1% e miristato de isopropila nas concentrações de 5 e 20% podem ser utilizados como matrizes para compor o sistema de liberação para tratamento de glaucoma.

Baseado nestes resultados foi eleita como matriz para obtenção do dispositivo oftálmico a formulação do silicone Med 6210 com 5% de miristato de isopropila, onde foi incorporado 1% de timolol.

Na Tab.2 estão os resultados da cinética de liberação *in vitro* do timolol.

Tabela 2. Resultados do ensaio *in vitro* de cinética de liberação do timolol dos dispositivos 1%.

Dia	Média ± dp (µg/g)
1	338 ± 29
2	93 ± 4
3	57 ± 11
4	35 ± 3
5	30 ± 12
6	23 ± 3
7	40 ± 1
14	8 ± 3
21	27 ± 1
28	13 ± 2

O perfil de liberação do timolol está apresentado na Fig.3, onde foi obtido a curva ajustada pela categoria exponencial e função ExpDec1 do Origin.

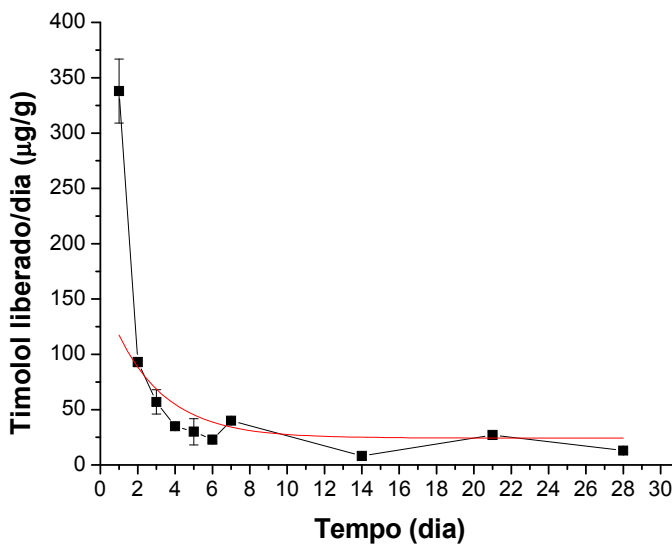


Figura 3. Perfil de liberação do timolol no ensaio *in vitro* da cinética de liberação diária, durante 28 dias.

No tratamento de glaucoma com colírio de timolol 0,5%, usualmente é utilizado uma gota a cada 12h e cada gota contém cerca de 150 µg do timolol. Considerando-se as perdas no uso do colírio e a absorção do mesmo, é retido

somente cerca de 5% do total aplicado, ou seja, somente cerca de 7,5 µg do timolol são absorvidos a cada 12h, ou seja 15 µg por dia.

De acordo com os resultados *in vitro* da liberação do timolol obtidos e a facilidade de síntese, os estudos realizados até o momento mostraram a viabilidade do desenvolvimento de dispositivos de liberação de timolol para tratamento de glaucoma.

CONCLUSÃO

As matrizes de silicone com o aditivo miristato de isopropila apresentaram características adequadas para a incorporação do princípio ativo timolol. O dispositivo obtido com 1% de timolol apresentou liberação diária em até 30 dias. Estudos devem ser continuados no sentido de aperfeiçoar a quantidade de princípio ativo a ser incorporado no dispositivo, assim como a liberação contínua, em níveis adequados para o tratamento de glaucoma.

AGRADECIMENTOS

FAPESP - projeto PIPE 08/52332-9 e CNPq - projeto RHAЕ 552448/2009-5

REFERÊNCIAS

1. LIMA FILHO A.A.S, DANTAS A.M., SALLUM J.M.F., FERREIRA FILHO N., MARBACK R.L. (2008) "Fisiologia da retina e das vias ópticas". *In: Conselho Brasileiro de Oftalmologia. Bases da oftalmologia*. São Paulo: Cultura Médica, p.627-794. (Série Brasileira de Oftalmologia).
2. BUSCACIO, E.S., GIOVANNI NICOLA UMBERTO ITALIANO COLOMBINI, G.N.U.I. (2011), "Estudo sobre os fatores relacionados a interrupção do tratamento do glaucoma". *Rev. Bras. Oftalmol.* vol 70 (6), Rio de Janeiro. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-72802011000600007>
3. International Standard Organization (ISO): Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10993-5, 2009.
4. ROGERO, S.O., LUGÃO, A.B., IKEDA, T.I., CRUZ, A.S. (2003), "Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias", *Mater. Res.* 6(3), 317-320.
5. ROGERO, S.O., MALMONGE, S.M., LUGÃO, A.B., IKEDA, T.I.,

- MIYAMARU, L., CRUZ, A.S. (2003). "Biocompatibility study of polymeric biomaterials", *Artificial Organs*, 27(5), 424-427.
6. United States Pharmacopeia. (2005) The National Formulary: USP 30. 30th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, p. 3360.

OFTALMIC DEVICE FOR GLAUCOMA TREATMENT

ABSTRACT

Glaucoma is a progressive neuropathy of the optic nerve, so the patient needs the medication during whole life. As this disease Because it is a disease that usually strikes the elderly population, the treatment may present problems as its interruption by the high cost of the medication, by the forgetfulness factor and loss on application of eye drops. Among the various active principles to control intraocular pressure (IOP) the timolol, a beta adrenergic blocker, is one of the most used. The aim of this work was the use of silicone as polymer matrix for the development of an ophthalmic device to release diluted and continuous daily timolol doses for glaucoma treatment. Additives to improve the kinetics release of timolol have been tested, having been elected the formulation with 5% isopropyl myristate, resulting in timolol release up to 30 days.

Keywords: Glaucoma, timolol, delivery system, silicone