

DISPOSITIVO DE LIBERAÇÃO DE TIMOLOL PARA TERAPIA DE GLAUCOMA

José R. Rogero¹, Renata H. Amaral¹, Wellington R. O. Fonseca¹, Acácio A. S. Lima Filho², José A. Cardillo³, Sizue O. Rogero¹, Ademar B. Lugão¹

¹Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN - SP

²Ophthalmos Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos Ltda

³Hospital de Olhos de Araraquara

E-mail: rogero@ipen.br

Resumo. O glaucoma é causado por diferentes enfermidades que, na maioria dos casos, levam a um aumento da pressão intra-ocular (PIO), devido a um bloqueio do fluído no interior do olho ocasionando dano às células nervosas, resultando em perda visual parcial ou até permanente. O diagnóstico e o tratamento precoce do glaucoma podem prevenir esta situação e é realizado pelo uso diário constante e regular de colírios, para o resto da vida do paciente. Os β bloqueadores não específicos continuam sendo os mais baratos, como os colírios de maleato de timolol 0,5% utilizados a cada 12h. O objetivo deste projeto foi desenvolver um sistema de encapsulamento de timolol em matrizes de silicone, para substituir os colírios no tratamento do glaucoma. Foram necessários estudos com adição de diferentes aditivos na matriz polimérica para um aumento na taxa de liberação, assim como o uso de compostos que proporcionasse uma boa dispersão do fármaco na matriz de silicone. Os dispositivos obtidos com silicone Med 6210 contendo timolol nas concentrações de 1% e 3% mostraram, nos ensaios in vitro da cinética de liberação, uma taxa de liberação continuada do fármaco em até 30 dias. O dispositivo de timolol 1% apresentou liberação média quase que a dose diária necessária de colírio para o tratamento da PIO (cerca de 15 μ g) sendo que o de timolol 3% uma liberação média quatro vezes maior. Os estudos devem ser continuados para otimizar a liberação ideal do timolol, reduzindo a quantidade incorporada assim como o tipo e a quantidade de aditivos utilizados na formulação.

Palavras chave: Glaucoma, Timolol, Sistema de liberação, Silicone.

1. INTRODUÇÃO

Glaucoma é uma neuropatia ótica progressiva com dano no sistema visual provocado pela morte de células nervosas. Uma vez que um número suficiente de células nervosas é destruído, pontos cegos desenvolvem, geralmente a partir do campo de visão periférico. Não existe nenhum tratamento para restaurar estas células nervosas danificadas, esta perda visual é irreversível. O glaucoma atualmente não pode ser curado, mas pode ser gerido de forma eficaz por tratamento médico ou cirúrgico [Mello Filho e col., 2011].

Para melhorar a taxa de administração de droga nos pacientes com glaucoma alguns pontos devem ser abordados:

- i) Características da doença: o glaucoma não é doloroso e não apresenta sintomas em seus estágios iniciais, mas o gerenciamento bem-sucedido exige a administração regular de colírios. Pacientes que descontinuem a medicação geralmente não sentem efeito negativo imediato e, assim, podem interromper o tratamento.
- ii) Regime de tratamento: os pacientes de glaucoma podem precisar de colírio até quatro vezes ao dia. A administração é menor com o aumento da frequência de administração.
- iii) Esquecimento: especialmente os pacientes que tem que pingar o colírio frequentemente o risco de perder a dose (pingar colírio fora do olho) ou colocar em horário errado, aumenta.
- iv) Administração incorreta do colírio: mesmo se o paciente lembrar-se de tomar a medicação pode ser difícil de fazê-lo corretamente. Particularmente os pacientes mais velhos, podem ter problemas ao abrir ou apertar o frasco do colírio ou não pingar corretamente o colírio, perdendo o efeito do tratamento.

No mundo cerca de 10 milhões de pacientes estão cegos ou com risco de cegueira devido ao glaucoma, por terem falhado na administração das gotas de colírio. Para o futuro estão sendo desenvolvidas terapêuticas de glaucoma com liberação de fármacos por longos períodos, de uma maneira sustentável para substituir a administração individual e, portanto, evitar os problemas de administração e aderência que são os problemas da administração tópica. O custo dos medicamentos e o fator esquecimento foram os fatores mais importantes para interrupção do tratamento [Buscacio e col., 2011]

A medicação aplicada pela via tópica pode ter dois objetivos: o tratamento de doenças da superfície ocular, como conjuntivites, blefarite e olho seco, ou intraocular como glaucoma e uveítes. Para o tratamento das primeiras, a aplicação tópica de medicamento diretamente na córnea e conjuntiva é ideal, devido à sua simplicidade, eficácia e segurança. Já para o tratamento de doenças intraoculares, as diversas barreiras que o fármaco deve ultrapassar dificultam a obtenção de doses terapêuticas no tecido alvo, especialmente na retina e no vítreo. Estima-se que a absorção intraocular na câmara anterior seja entre 1 e 5% da dose administrada [Bourlais e col., 1998, Geroski e col., 2000].

O colírio maleato de timolol é amplamente utilizado para tratamento de glaucoma em nosso meio e pode levar a bronco espasmo e óbito. Além da baixa penetração ocular desta via de administração, o desconforto ao instilar o colírio e reações locais de hipersensibilidade ou toxicidade direta na córnea, conjuntiva, pele da região periocular e mucosa nasal podem ocorrer, como por exemplo, pelo cloreto de benzalcônio, causando ceratopatia punteada ou ulcerativa. Outro problema frequente desta via de administração é o uso incorreto do colírio pelo paciente e sua fidelidade ao tratamento, especialmente em doenças crônicas como o glaucoma [Buscacio e col., 2011, Bourlais e col., 1998, Geroski e col., 2000, Lima Filho e col., 2008]

O maleato de timolol – 1(terc butilamino) 3- [oxi (4morfolino-1,2,5 – tiadiazol – 3 ilo)] maleato de 2-propanolol, é um agente bloqueador beta colinérgico usado no tratamento de hipertensão, sendo muito utilizado em colírios na concentração de 0,5% para terapia de glaucoma. Portanto iniciamos o estudo incorporando este princípio ativo numa matriz polimérica biocompatível.

Este estudo teve como objetivo a utilização do silicone como matriz polimérica para obtenção de um dispositivo oftálmico com liberação de doses diárias diluídas de timolol, durante um período de tempo prolongado para controle da pressão intraocular (PIO). Tais dispositivos devem apresentar mínimos efeitos colaterais, não prejudicar a visão, permanecer no local e ser de fácil colocação e remoção pelo médico oftalmologista.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados como matriz polimérica o silicone grau médico Med 6210 da NuSil Technology; maleato de timolol fornecido pela empresa Ophthalmos e todos os compostos químicos foram de grau analítico.

Na primeira etapa o timolol foi incorporado na matriz de silicone nas concentrações de 1 e 3%. Após a deaeração a mistura foi colocada em molde confeccionado com aço inoxidável 304 (Fig.1). A reticulação foi realizada de acordo com a descrição do fornecedor: 150°C durante 30 min. Os dispositivos obtidos foram colocados em papel siliconado e acondicionados em embalagem plástica e levados para esterilização em fonte de Co-60, GammaCell 200, na dose de 25 kGy.

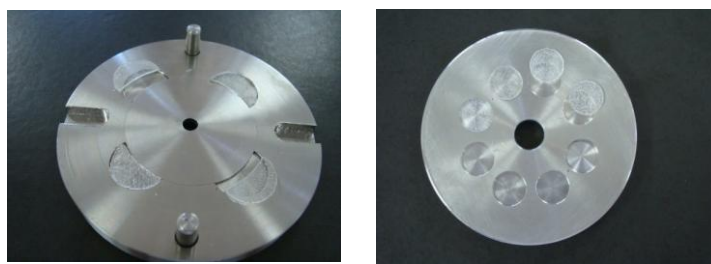


Figura 1. Dispositivos de silicone contendo timolol, preparados em moldes.

Analisando o dispositivo na microscopia eletrônica de varredura foram observadas presença de “crateras” contendo timolol (Fig.2), indicando assim que a distribuição do princípio ativo na matriz polimérica não estava homogênea.

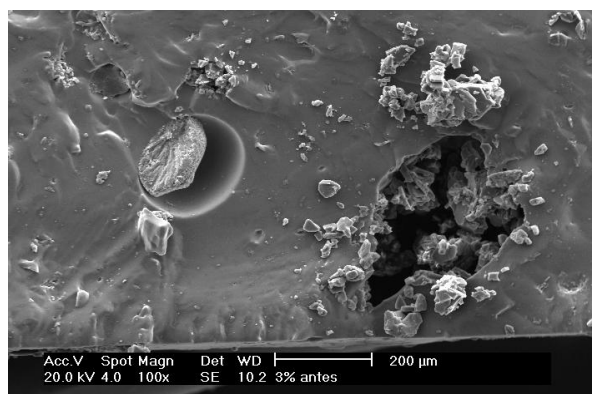


Figura 2. Foto micrografia em microscopia eletrônica de varredura, fratura de dispositivo com 3% de timolol. Aumento 100x.

Portanto foram testados alguns aditivos indicados pelo fornecedor com o objetivo de conseguir uma rede na matriz polimérica que facilitasse a liberação do princípio ativo, assim como um diluente para o timolol para obtenção de uma boa dispersão do mesmo na matriz de silicone.

Dentre os vários compostos testados para aumentar a taxa de liberação da matriz foi eleito o miristato de isopropila na concentração de 5% e como diluente o dimetilsulfóxido (DMSO) por não apresentarem interferência na cura do silicone e não mostrarem toxicidade no teste *in vitro* de citotoxicidade.

Foram preparados dispositivos contendo 1% e 3% de timolol. O miristato de isopropila foi adicionado à mistura do silicone (PART A + PART B), na proporção de 5%. O timolol foi incorporado dissolvido em H₂O e em H₂O + DMSO na proporção de 1:3. Após a homogeneização de todos os componentes da formulação, a mesma foi submetida ao vácuo durante 60 minutos, sendo três ciclos de 20 minutos cada, para a retirada de bolhas de ar. A formulação foi distribuída em moldes de aço inoxidável, com formato circular e de meia-lua e colocada na estufa a 150°C durante 30 minutos, para sua reticulação. Os dispositivos obtidos foram embalados adequadamente para sua esterilização por raios gama, na dose de 25 kGy.

Os dispositivos esterilizados foram testados em ensaios *in vitro* quanto à liberação diária de timolol, durante 30 dias consecutivos. A cinética de liberação foi realizada em tampão fosfato pH 7,0, em incubadora com agitação, na temperatura de 37°C com rotação de 120 rpm. Após a coleta diária da alíquota o tampão foi descartado e substituído por tampão fresco.

O timolol foi quantificado em HPLC seguindo metodologia encontrada na literatura [Erk, 2003] e baseado na Farmacopeia dos Estados Unidos da América [USP30, 2005]. Os parâmetros utilizados foram: coluna C18 Microsorb-MV[®] 100-5 (4µm x 250mm x 4,6 mm), detecção em UV, 294 nm, fluxo de 0,8 mL/min, tempo de retenção de 4 min e fase móvel de acetonitrila, metanol e solução tampão fosfato pH 2,5 0,1M (5:10:85 v/v/v) em um sistema isocrático.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na cinética de liberação diária dos dispositivos obtidos pela simples incorporação do timolol em matriz de silicone foram observados liberação do timolol até o 6º dia, não sendo detectada no 7º, 14º, 21º e 28º dias.

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados os resultados da cinética de liberação *in vitro* dos dispositivos de timolol 1% e 3%, respectivamente, utilizando ou não DMSO na dissolução do timolol antes da incorporação na matriz de silicone.

Analisando a Tabela 1, nota-se que o dispositivo timolol 1% não utilizando o DMSO na dissolução do timolol mostrou liberação do princípio ativo somente até o 6º dia, não sendo detectado a partir do 7º até 28 dias e aquele preparado com a adição de DMSO houve liberação de timolol até o 28º dia, indicando que o DMSO auxilia na liberação do mesmo e em nível mais constante.

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostraram que realmente o DMSO melhora a liberação do timolol do dispositivo, no ensaio *in vitro* da cinética de liberação.

Tabela 1. Resultados da cinética de liberação *in vitro* dos dispositivos de timolol 1%

TEMPO (dia)	Timolol liberado ($\mu\text{g/g}$)/dia (Média \pm dp)	
	Dispositivo de timolol não contendo DMSO	Dispositivo de timolol contendo DMSO
1	108 \pm 22	338 \pm 29
2	129 \pm 32	93 \pm 4
3	160 \pm 15	57 \pm 11
4	122 \pm 21	35 \pm 3
5	122 \pm 18	30 \pm 12
6	132 \pm 31	23 \pm 3
7	nd	40 \pm 1
14	nd	08 \pm 3
21	nd	27 \pm 1
28	nd	13 \pm 2

nd = não detectado

Tabela 2. Resultados dos ensaios de cinética de liberação *in vitro* dos dispositivos de timolol 3%

TEMPO (dia)	Timolol liberado ($\mu\text{g/g}$)/dia (Média \pm dp)	
	Dispositivo de timolol não contendo DMSO	Dispositivo de timolol contendo DMSO
1	625 \pm 59	1778 \pm 433
2	208 \pm 9	939 \pm 134
3	113 \pm 11	799 \pm 110
4	86 \pm 18	745 \pm 130
5	79 \pm 6	632 \pm 86
6	75 \pm 5	521 \pm 35
7	67 \pm 6	357 \pm 23
14	45 \pm 2	375 \pm 16
21	15 \pm 1	191 \pm 70
28	04 \pm 1	160 \pm 35

Na Fig. 3 estão apresentadas as curvas da cinética de liberação do timolol dos diferentes dispositivos obtidos: timolol 1% com adição e sem adição de DMSO e timolol 3% com e sem adição de DMSO. No gráfico da Fig.3 observa-se o mesmo comportamento dos quatro tipos de dispositivo de timolol, com nível de liberação mais alto nos primeiros dias, atingindo um platô em cerca de 7 dias, com nível mais baixo de liberação até 28 dias. Fulgêncio e col. [2012] no estudo de cinética de liberação *in vitro*, também verificaram liberação do maleato de timolol por um período de mais de 4 semanas, apesar de utilizarem diferente matriz polimérica. Observaram que 85% do fármaco foi liberado durante as primeiras duas semanas. No ensaio *in vivo*, em animais,

não observaram diferença significativa da queda da PIO quando comparada com o colírio de timolol 0,5%.

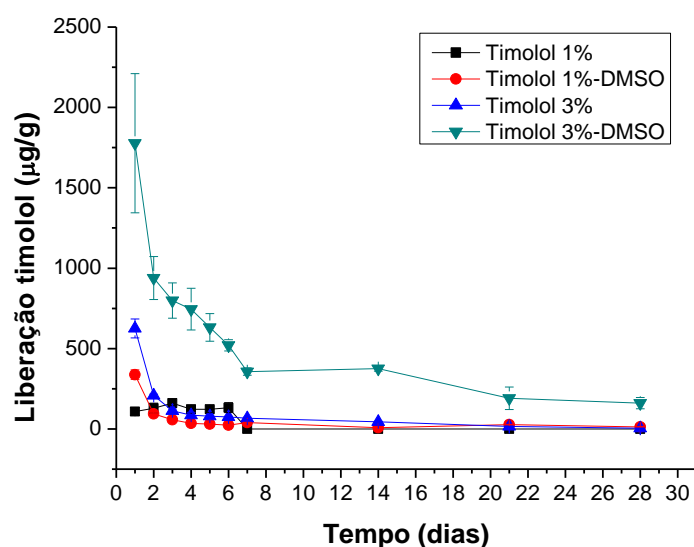


Figura 3. Cinética de liberação dos dispositivos de timolol, em diferentes concentrações, contendo ou não DMSO

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.

Na cinética de liberação *in vitro* do dispositivo de timolol 3% obtivemos na média uma liberação de 650 µg de timolol por grama do dispositivo por 24h. Considerando que o dispositivo ocular tenha uma massa de 100 mg então teremos liberação de 65 µg por dia, cerca de 4 vezes maior que o colírio. Já o dispositivo de timolol 1% apresentou uma liberação média de 13 µg/dia, quase a dose diária necessária para o tratamento do glaucoma (15 µg).

Para dar continuidade ao desenvolvimento deste projeto, testes *in vivo* deverão ser realizados em animais, com dispositivos contendo diferentes quantidades de princípio ativo para verificar a eficácia no controle da PIO. Após esta fase, se necessário, ajustes deverão ser realizados para liberação do medicamento em nível e tempo adequados.

4. CONCLUSÃO

A matriz de silicone com adição do aditivo miristato de isopropila apresentou características adequadas para a incorporação do princípio ativo timolol dissolvido em DMSO e água, na obtenção do dispositivo de liberação de timolol.

Considerando os resultados *in vitro* da liberação do timolol 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.

Portanto deverão ser realizados testes *in vivo* em animais para verificar a eficácia do dispositivo no controle da PIO além de ajustes na formulação para obtenção da liberação do princípio ativo em nível e tempo adequados.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

- Bourlais, C.L., Acar, L., Zia, H., Sado, P.A., Needham, T., Leverage, R. (1998), "Ophthalmic drug delivery systems-recent advances". *Prog Retin Eye Res.*, vol 17(1): 33-58. Review.
- 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.* vol70 (6), Rio de Janeiro. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-72802011000600007>
- Erk, N. (2003) "Rapid and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of dorzolamide hydrochloride and timolol maleate in eye drops with diode-array and UV detection". *Pharmazie*, vol 58: 491-493.
- Fulgêncio, G.O., Viana, F.A.B., Ribeiro, R.R., Yoshida, M.I., Faraco, A.G., Cunha-Júnior, A.S. (2012), "New Mucoadhesive Chitosan Film for Ophthalmic Drug Delivery of Timolol Maleate: In Vivo Evaluation". *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* [Epub ahead of print] doi:10.1089/jop.2011.0174.
- Geroski D.H., Edelhauser H.F. (2000), "Drug delivery for posterior segment eye disease". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* vol 41(5): 961-964.
- 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).
- Mello Filho, P.A.A., Maia, M., Rodrigues, E.B., Farah, M.E. (2010), "Farmacologia ocular aplicada no tratamento de doenças do vítreo, retina e coróide". *Arq. Bras. Oftalmol.* vol 73 (3), São Paulo. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27492010000300018>
- United States Pharmacopeia. (2005) *The National Formulary: USP 30*. 30th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, p. 3360.

TIMOLOL DELIVERY DEVICE FOR GLAUCOMA THERAPY

José R. Rogero¹, Renata H. Amaral¹, Wellington R. O. Fonseca¹, Acácio A. S. Lima Filho², José A. Cardillo³, Sizue O. Rogero¹, Ademar B. Lugão¹

¹Nuclear Energetic Research Institute – IPEN/CNEN - SP

²Ophthalmos Pharmaceutical Products Industry & Commerce Ltda

³Araraquara Eyes Hospital

E-mail: rogero@ipen.br

Abstract. *Glaucoma is caused by different diseases that, in most cases, lead to an increase of intraocular pressure (IOP), due to a fluid blockage inside the eye causing damage to nerve cells, resulting in partial or even permanent visual loss. Early diagnosis and treatment of glaucoma can prevent this situation and is accomplished by constant and regular daily use of eye drops, for the rest of the patient's life. The non specific β blockers continue being the cheapest, such as timolol maleate eye drops of 0.5% used every 12 hours. The objective of this project was to develop a system of timolol encapsulation into silicone matrix, to replace eye drops in the glaucoma treatment. Studies were needed with addition of different additives in the polymeric matrix to increase the release rate, as well as the use of compounds that provide a good*

dispersion of the drug in the silicone matrix. The devices obtained with silicone Med 6210 containing timolol in concentrations of 1% and 3% have shown, in the release kinetics in vitro assays, a continuing release rate of the drug up to 30 days. The timolol 1% device presented an average release of about almost the daily eye drop dose necessary to treat IOP (about 15 µg) and the timolol 3% average release rate four times higher. The studies should be continued to optimize the ideal release of timolol, reducing the encapsulated amount as well as the type and quantity of the additives used in the formulation.

Keywords: Glaucoma, Timolol, Delivery system, Silicone