



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**UTILIZAÇÃO DO QUITOSANO PARA LIBERTAÇÃO DE  
FÁRMACOS EM TERAPIA OCULAR**

Trabalho submetido por  
**Ana Carolina dos Santos Ribeiro Cavaleiro**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Novembro de 2015**





**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**UTILIZAÇÃO DO QUITOSANO PARA LIBERTAÇÃO DE  
FÁRMACOS EM TERAPIA OCULAR**

Trabalho submetido por  
**Ana Carolina dos Santos Ribeiro Cavaleiro**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Ana Paula Serro**

Novembro de 2015



## **Dedicatória**

Aos meus pais, porque este não foi um esforço só meu mas também deles.

Obrigada por fazerem com que todos os meus sonhos se tornem realidade.



## **Agradecimentos**

À minha orientadora Prof. Doutora Ana Paula Serro por me ter acompanhado ao longo deste meses, pela sua disponibilidade e suporte incondicional e acima de tudo pela sua paciência para as minhas questões existenciais.

Ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz e todo o corpo docente por me terem proporcionado um ensino de excelência ao longo de estes anos que foram provavelmente os melhores anos da minha vida em que tanto cresci e cimentei muitos valores que levo para a vida.

À minha família em especial aos meus pais que são um dos grandes pilares da minha vida. Obrigada por serem um exemplo de luta e perseverança e me fazerem acreditar que o esforço é sempre recompensado. Obrigada por tudo o que me proporcionaram e continuam a proporcionar, por nunca deixarem que os meus sonhos caiam por terra e por me apoiarem incondicionalmente mesmo nas minhas convicções mais extravagantes

A outro grande pilar da minha vida, ao Bernardo, por toda a paciência que teve para me aturar ao longo de todos estes anos, por ser o meu grande apoio e suporte emocional. Obrigada pelo amor, amizade e companheirismo, obrigado por estares sempre ao meu lado e acima de tudo obrigada por fazeres parte da minha vida e espero que assim seja para sempre.

Aos meus amigos e em especial às minhas meninas, as minhas companheiras e ombro amigo de todos os momentos. Obrigado por nunca me deixarem desistir nem fracassar, obrigada pela amizade incondicional, mas acima de tudo obrigada por terem aparecido na minha vida e terem feito de mim um pouco de vós.



## Resumo

O globo ocular apresenta, ao nível da sua estrutura anatómica e fisiológica, várias barreiras que comprometem uma eficaz penetração e retenção dos fármacos, e que originam uma fraca biodisponibilidade destes ao longo do tempo.

A administração tópica de fármacos faz-se, geralmente, através de formas farmacêuticas convencionais, que apresentam limitações aquando da interação com as estruturas oculares. Essas limitações resultam não só da fraca penetração dessas formas farmacêuticas ao nível das estruturas oculares e elevada e rápida eliminação dos fármacos pelos sistemas de proteção do olho contra agentes externos, mas também da degradação dessas mesmas substâncias por enzimas presentes no olho.

Em resposta às limitações apresentadas pelos sistemas convencionais, surgiram novos sistemas de libertação controlada de fármacos que permitem uma maior biodisponibilidade dos fármacos nos tecidos oculares.

Alguns polímeros têm sido testados em sistemas de libertação controlada, de forma a potenciar os seus efeitos e melhorar o efeito terapêutico dos fármacos. Um dos polímeros que tem tido grande destaque é o quitosano.

Ao longo deste trabalho, irão ser evidenciadas as vantagens que o quitosano pode trazer em sistemas de libertação controlada, bem como, os mecanismos pelos quais atua e induz uma melhoria nos sistemas já existentes.

Serão referidos estudos, quer *in vitro* quer *in vivo*, que comprovam a utilidade e as mais-valias do quitosano em associação com soluções, sistemas coloidais, sistemas de microencapsulação e sistemas com revestimento dirigidos à terapia ocular.

Os benefícios do uso do quitosano para o controlo da libertação de fármacos oculares, aliados ao facto deste polímero policationico ser biodegradável, biocompatível, não tóxico e apresentar propriedades antimicrobianas e cicatrizantes, fazem do quitosano um composto particularmente interessante para o desenvolvimento de novas formas de terapia ocular mais eficazes.

**Palavras-chave:** Quitosano; Biodisponibilidade; Sistemas de libertação controlada de fármacos; Terapia ocular.



## **Abstract**

At the level of physiological and anatomical structure, the eyeball has several obstacles that compromise effective penetration and retention of drugs. These obstacles give a poor bioavailability of drugs over time.

Topical administration of drugs is done by conventional pharmaceutical forms. Those forms have limitations at their interaction with the ocular structures. Those limitations result in poor penetration of dosage at level of ocular structures and high and rapid elimination of drugs for eye protection. They result from degradation of substances by enzymes present in the eye.

Limitations presented by conventional systems led to new controlled release drug systems which allow for increased bioavailability of drugs into ocular tissues.

In order to maximize its effect and improve the therapeutic effect of drugs some polymers have been tested in controlled release systems. One of the polymers that has been remarkable is chitosan.

This work, will emphasize the benefits of chitosan and what it can bring in controlled release systems as well as the mechanisms by which it operates and induces an improvement on existing systems.

During the work will refer studies in vitro and in vivo that show the usefulness and added value of chitosan in combination with solutions, colloidal systems, microencapsulation systems and systems with coating directed to ocular therapy.

The benefits of chitosan used to control the release ocular drugs, combined with the fact that this polymer polycationic be biodegradable, biocompatible, nontoxic and display antimicrobial and healing properties, makes chitosan a compound particularly interesting for the development of new forms of therapy ocular more effective.

**Keywords:** Chitosan; Bioavailability; Drug release controlled systems; Ocular therapy.



## Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Índice de figuras .....</b>  | <b>13</b> |
| <b>Índice de tabelas .....</b>  | <b>15</b> |
| <b>Lista de abreviaturas.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>1. Contextualização e objetivos do trabalho .....</b>  | <b>19</b> |
| <b>2. Características anatómicas e fisiológicas do olho que afetam a eficácia dos tratamentos farmacológicos.....</b> | <b>21</b> |
| <b>3. Doenças oculares passíveis de tratamento farmacológico .....</b>  | <b>25</b> |
| 3.1 Conjuntivite: .....   | 25        |
| 3.2 Blefarite: .....  | 26        |
| 3.3 Queratite: .....  | 27        |
| 3.4 Glaucoma: .....   | 28        |
| 3.5 Edema macular: .....  | 28        |
| 3.6 Retinite causada por Citomegalovírus: .....   | 29        |
| 3.7 Uveíte:.....  | 29        |
| <b>4. Liberação controlada de fármacos em terapia ocular.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>5. Quitosano .....</b>   | <b>37</b> |
| 5.1 Estrutura e propriedades .....  | 37        |
| 5.2 Aplicações biomédicas/farmacêuticas .....   | 40        |
| 5.3 Aplicações do quitosano em terapia ocular .....   | 42        |
| 5.3.1 Soluções .....  | 42        |
| 5.3.2 Micropartículas.....  | 51        |
| 5.3.3 Sistemas coloidais .....  | 58        |
| 5.3.4 Revestimentos e implantes .....   | 71        |
| <b>6. Análise do mercado .....</b>  | <b>77</b> |
| <b>7. Conclusão .....</b>   | <b>79</b> |
| <b>8. Bibliografia .....</b>  | <b>81</b> |



## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Estrutura e anatomia do globo ocular. ....  | 21 |
| <b>Figura 2:</b> Fatores que afetam a eficácia da aplicação de fármacos a nível ocular.....  | 23 |
| <b>Figura 3:</b> Comparação dos métodos convencionais de administração múltipla com os sistemas de libertação controladas.....   | 33 |
| <b>Figura 4:</b> Número de estudos efetuados sobre o quitosano e seus derivados ao longo de 1935 a 2014 .....  | 37 |
| <b>Figura 5:</b> Estrutura moléculas da quitina e do quitosano. ....   | 38 |
| <b>Figura 6:</b> Processo de desacetilação para produção do quitosano.....   | 38 |
| <b>Figura 7:</b> Esquema de formação, administração e controlo do hidrogel termosensível à base de CS/G/GP .....   | 43 |
| <b>Figura 8:</b> Cinética de libertação da ofloxacina para os fluidos lacrimais após administração.....  | 48 |
| <b>Figura 9:</b> Concentração do maleato de timolol no humor aquoso após administração do mesmo na forma da solução comercial do fármaco e na forma de solução de PNIPAAm.CS.....                                    | 49 |
| <b>Figura 10:</b> Comparação do efeito do maleato de timolol na redução da PIO em solução convencional e em solução de PNIPAAm.CS.....   | 50 |
| <b>Figura 11:</b> Representação de micropartículas (microcápsula e microesfera).....   | 51 |
| <b>Figura 12:</b> Perfis de libertação <i>in vitro</i> de uma solução comercial de aciclovir e de aciclovir veiculado por meio de nanopartículas de quitosano.....   | 54 |
| <b>Figura 13:</b> Perfis de concentração de ofloxacina no humor aquoso de coelho após administração tópica do fármaco nas mesmas concentrações mas por diferentes veículos .....                                     | 55 |
| <b>Figura 14:</b> Representação de nanopartículas (nanocápsula e nanoesfera). ....   | 59 |
| <b>Figura 15:</b> Concentração de ciclosporina na córnea após aplicação tópica em olho de coelho do fármaco veiculado por nanopartículas de quitosano, solução de quitosano e suspensão do fármaco em água .....     | 62 |
| <b>Figura 16:</b> Concentração de ciclosporina na conjuntiva após aplicação tópica em olho de coelho do fármaco veiculado por nanopartículas de quitosano, solução de quitosano e suspensão do fármaco em água ..... | 62 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 17:</b> Concentração de ciclosporina na córnea após aplicação tópica em olho de coelho do fármaco veiculado por nanopartículas de quitosano, solução de quitosano e suspensão do fármaco em água. ....                                   | 63 |
| <b>Figura 18:</b> Estudo <i>in vivo</i> comparativo da veiculação do 5-Fu em nanopartículas de quitosano e numa solução comercial de 5-FU.....   | 64 |
| <b>Figura 19:</b> Representação estrutural dos lipossomas e seus diferentes tipos .....  | 66 |
| <b>Figura 20:</b> Estabilidade física de nanopartículas de diferentes tamanhos num fluido lacrimal simulado (CS-NP-nanopartículas de quitosano; L-lipossomas; LCS-NP-nanopartículas de quitosano veiculadas em lipossomas).....                    | 68 |
| <b>Figura 21:</b> Estrutura de uma $\beta$ -ciclodextrina.....   | 69 |
| <b>Figura 22:</b> Inibição do crescimento de <i>C. albicans</i> (%) pela solução comercial de nitrato de econazol e dois tipos de nanopartículas de CS/ SBE - $\beta$ - CD contendo o fármaco. ....  | 70 |
| <b>Figura 23:</b> Perfis de libertação <i>in vitro</i> obtidos a partir d veiculação do fármaco em filmes de camada dupla contendo dexametasona: (A) fármaco veiculado em filme de monocamada; (B) fármaco veiculado em filme de dupla camada..... | 73 |
| <b>Figura 24:</b> Concentração média de ofloxacina na lágrima em função do tempo, após administração do fármaco por meio da sua solução comercial e veiculado por um implante oftálmico à base de quitosano.....                                   | 74 |
| <b>Figura 25:</b> Preparação da película de quitosano, tipo “sandwich”, contendo ciclosporina A .....  | 74 |
| <b>Figura 26:</b> Solução á base de quitosano para olhos secos e cansados.....   | 77 |

## Índice de tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> Principais vantagens e fármacos veiculados pelos sistemas de liberação controlada. ....  | 33 |
| <b>Tabela 2:</b> Análise dos estudos realizados por Cheng <i>et al.</i> , 2014; Wu <i>et al.</i> , 2006 sobre hidrogéis termo e pH sensíveis á base de quitosano.....   | 45 |
| <b>Tabela 3:</b> Análise dos estudos realizados por Felt <i>et al.</i> , Colo <i>et al.</i> e Cao <i>et al.</i> sobre soluções á base de quitosano. ....  | 46 |
| <b>Tabela 4:</b> Descrição do comportamento farmacocinético do aciclovir no humor aquoso após administração única de microesferas de quitosano contendo aciclovir e uma suspensão comercial de aciclovir no olho de coelho..... | 52 |
| <b>Tabela 5:</b> Comparação das concentrações de aciclovir no humor aquoso após aplicações isoladas tanto do sistema em estudo como do sistema comparativo (suspensão do fármaco) .....   | 53 |
| <b>Tabela 6:</b> Análise de estudos realizados por Genta <i>et al.</i> , Colo <i>et al.</i> e Calderón <i>et al.</i> sobre sistemas de microencapsulação á base de quitosano .....  | 56 |
| <b>Tabela 7:</b> Análise de estudos realizados por Wassner <i>et al.</i> sobre sistemas de microencapsulação á base de quitosano . ....   | 57 |
| <b>Tabela 8:</b> Análise do estudo realizado por Calvo <i>et al.</i> , Campo <i>et al.</i> , Motwani <i>et al.</i> e Nagarwal <i>et al</i> sobre sistemas coloidais á base de quitosano.....                                    | 60 |
| <b>Tabela 9:</b> Comparação de parâmetros farmacocinéticos atingidos na veiculação de 5-FU por nanopartículas de quitosano e por uma solução comercial do fármaco.....  | 65 |
| <b>Tabela 10:</b> Tamanho dos diferentes tipos de lipossomas .....  | 66 |
| <b>Tabela 11:</b> Análise do estudo feito por Dielbold, Jaarín <i>et al.</i> sobre sistemas coloidais á base de quitosano.....  | 67 |
| <b>Tabela 12:</b> Análise do estudo realizado por Mauhmoud <i>et al.</i> sobre sistemas coloidais á base de quitosano.....  | 69 |
| <b>Tabela 13:</b> Análise dos estudos realizados por Byrro <i>et al.</i> e L.B. Rodrigues <i>et al.</i> e Fulgêncio, Saliba, Fialho, e Júnior, 2013 sobre sistemas de revestimento á base de quitosano.....                     | 71 |



## **Lista de abreviaturas**

**(A/O):** Água em óleo

**(O/A):** Óleo em água

**5-FU:** 5-Fluouracilo

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AINES:** Anti-inflamatórios não esteroides

**AUC:** Área sobre a curva

**BSA:** Albumina de soro bovina

**CDs:** Ciclodextrinas

**C<sub>max</sub>:** Concentração máxima

**CMCs:** N- carboximetilquitosano

**CMV:** Citomegalovírus

**Cs:** Quitosano

**CS/G/GP:** Quitosano/Gelatina/Fosfato de glicerol

**Cs/SBE-β-CD:** β ciclodextrina de sulfobutil éter

**CS-HCl:** Clorohidrato de quitosano

**CyA:** Ciclosporina A

**EM:** Edema macular

**ERG:** Eletroretinografia

**GP:** Fosfato de glicerol

**GUV:** Vesículas unilamelares gigantes

**HTCCS:** (N - [(2-hidroxi-3-trimetilamônio) propil] cloreto de quitosano

**L:** Lipossomas

**LCs-NP:** Nanopartículas de quitosano veiculadas em lipossomas

**LCST:** *Low critical solution temperature*

**LUV:** Vesículas unilamelares grandes

**MIC:** Concentração mínima inibitória

**MLV:** Vesículas multilamelares

**MPCs:** Micropartículas de quitosano

**NCL:** Nanopartículas carregadas com lípidos

**NLS:** Nanopartículas de lípidos sólidos

**PECL:** Poli-ε-Caprolactona

**PEG-PLA:** Polietilenoglicol-Ácido polilático

**PEO:** Poli(óxido de etileno)

**PIO:** Pressão intra-ocular

**PLL:** Poli-L-Lisina

**PNIPAAm-Cs:** N-isopropilacrilamida-Quitosano

**PVA:** Álcool polivinílico

**SUV:** Vesículas unilamelares pequenos

**TAT-EGFP:** Péptido ativador de transcrição marcado com proteína verde fluorescente

**T<sub>max</sub>:** Tempo máximo

**TTP:** Tripolifosfato

**UCST:** *Upper critical solution temperatures*

**UV:** Vesículas unilamelares

## **1. Contextualização e objetivos do trabalho**

A aplicação ocular tópica de fármacos constitui em si uma questão problemática, pois são muitos os fatores que afetam não só a biodisponibilidade que o fármaco administrado desta forma apresenta como também a efetividade da terapêutica (Kaur, Pal, & Smitha, 2002; Sa, 2003; de la Fuente *et al.*, 2010).

São variadas as formas farmacêuticas de aplicação ocular, sendo que cerca de 90% se apresentam na forma de colírios. No entanto sabe-se que apenas 5% dessas mesmas soluções conseguem atingir os tecidos intra-oculares, após aplicação tópica (Sa, 2003; Gaudana, Ananthula, Parenky, & Mitra, 2010; Patel, 2013).

Várias são os obstáculos à efetividade do fármaco administrado, destacando-se as barreiras anatómicas ou físicas que advêm da constituição do globo ocular e da funcionalidade das suas variadas estruturas e as barreiras químicas que se refletem na possível degradação do fármacos por parte de algumas enzimas (Sa, 2003; de la Fuente *et al.*, 2010).

Para além destas barreiras há que ter em conta também as características do próprio fármaco e seu veículo pois é a conjunção destas variáveis que vai determinar tanto a retenção do fármaco e tempo de permanência do mesmo na superfície ocular, como a sua difusão através da córnea (Kaur *et al.*, 2002; Sa, 2003; de la Fuente *et al.*, 2010).

Assim, e perante a baixa biodisponibilidade apresentada pelas formas farmacêuticas convencionais, surgiu a necessidade de explorar formas farmacêuticas que apresentassem mecanismos de libertação controlada dos fármacos (Amo & Urtili, 2008; Sahoo, Dilnawaz, & Krishnakumar, 2008; Patel, 2013; Baranowski, Gajda, & Pluta, 2014).

Muitas são as vantagens dos sistemas de libertação controlada de fármacos para terapia ocular que presentemente existem no mercado. O presente trabalho foca-se sobre a utilização de um composto particular, o quitosano, nesse tipo de sistemas e tem como principal objetivo reportar o estado da arte e perspectivas futuras relativamente à utilização desse composto em terapia ocular.

Sendo o quitosano um polímero estudado desde o século XIX, só mais recentemente se tem investigado a sua possível utilização como veículo para a libertação controlada de fármacos. No entanto o seu estudo continua em exponencial ascensão, captando o interesse de um elevado número de investigadores (Hamidi *et al.*, 2008; Chi *et al.*, 2015).

A quitina é, depois da celulose o polissacárido mais abundante na natureza, podendo extrair-se do exosqueleto de crustáceos, insetos e até de alguns fungos, o que transforma o quitosano num polímero economicamente muito atrativo (Kumar, 2000; Hamidi, Azadi, & Ra, 2008).

O quitosano destaca-se pelas suas propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade bem como pelas suas propriedades antimicrobianas e cicatrizantes, apresentando um comportamento pseudoplástico e viscoelástico (Sa, 2003; Ludwig, 2005; Dash *et al.*, 2011).

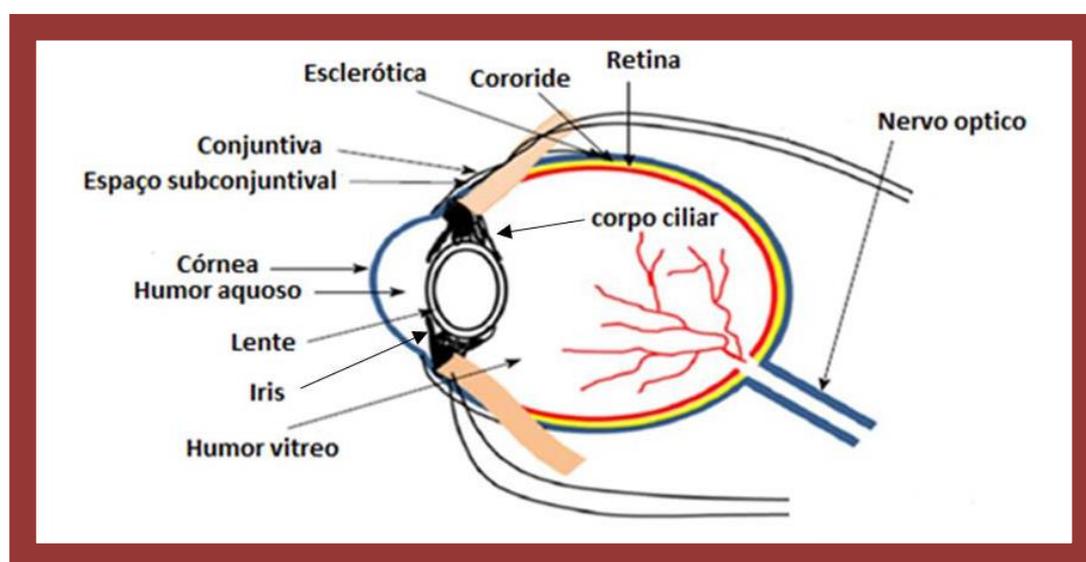
A aplicabilidade do quitosano tem-se demonstrado bastante vasta. Devido às suas inúmeras vantagens tem sido aplicado a áreas como a engenharia de tecidos e medicina regenerativa, cicatrização e a sistemas de libertação controlada de fármacos ( Dodane & Vilivalam, 1998; Bhattarai, Gunn, & Zhang, 2010; Dash *et al.*, 2011; Bernkop-schnürch & Dünnhaupt, 2012; Chi, Cheung, Ng, Wong, & Chan, 2015).

Na terapia ocular, o quitosano tem surgido sob diferentes formas, ex.: soluções, sistemas de microencapsulação, sistemas coloidais e revestimentos. Todas estas alternativas visam aumentar o tempo de contacto do fármaco com os tecidos da conjuntiva e/ou aumentar a sua biodisponibilidade. Ao longo deste trabalho serão descritas estas formulações farmacêuticas e procurar-se-à demonstrar de que forma a utilização deste polímero pode ser uma mais-valia para aumentar a eficácia dos tratamentos (Sa, 2003).

## **2. Caraterísticas anatómicas e fisiológicas do olho que afetam a eficácia dos tratamentos farmacológicos**

De forma a entender o potencial desempenho do quitosano e das diversas formas que ele pode assumir para atuar no tratamento de doenças a nível ocular é essencial numa primeira fase analisar quais os alvos dos fármacos a utilizar e também quais as barreiras que são necessárias ultrapassar para se poder atingir esses mesmos alvos, uma vez que a aplicação ocular de fármacos pode ter como objetivo o tratamento de doenças superficiais como a conjuntivite, blefarite, queratite, ou mesmo uma terapia intra-ocular como o glaucoma ou uveíte (Sa, 2003).

O globo ocular é, tal como representado na (Figura 1), constituído por duas regiões anatómicas: o segmento anterior que apresenta como estruturas principais a córnea, conjuntiva, humor aquoso, iris, corpo ciliar e lente, e um segmento posterior onde se encontra a retina, esclerótica, coróide, nervo óptico e humor vítreo. Estas regiões anatómicas estão divididas em três camadas (externa, intermédia e interna) (Ludwig, 2005; de la Fuente *et al.*, 2010; Patel, 2013).



**Figura 1: Estrutura e anatomia do globo ocular (adaptado Patel, 2013).**

A córnea é uma região não vascularizada que apresenta uma resistência significativa à difusão passiva de iões e moléculas e cujas características condicionam a pressão intra-ocular, sendo tanto a sua superfície como permeabilidade menor quando comparada com a da conjuntiva (de la Fuente *et al.*, 2010).

A córnea está dividida em três segmentos distintos: o epitélio, estroma e endotélio (Sa, 2003).

O epitélio (camada mais externa) funciona como uma barreira seletiva à entrada de compostos hidrófilos e ionizados (Sa, 2003).

O estroma apresenta uma hidrofobicidade significativa e funciona como barreira seletiva à entrada de compostos lipofílicos. Este segmento pode contribuir para aumentar a biodisponibilidade dos fármacos no humor aquoso, funcionando como reservatório dos mesmos (Sa, 2003).

O endotélio é formado por uma monocamada de células epiteliais bem organizadas e estruturadas, logo, não tem qualquer envolvimento na barreira à penetração de fármacos (Sa, 2003).

Sendo a córnea considerada a principal via de penetração nos tecidos intra-oculares, há que ter em conta não só as limitações acima referidas como também as propriedades físico-químicas do próprio fármaco bem como o comportamento apresentado pelo próprio veículo (Sa, 2003).

Em adição às barreiras anatómicas que dificultam a retenção e permanência dos fármacos na superfície do olho temos ainda uma outra limitação que se prende com a difusão destes mesmos fármacos através da córnea (Sa, 2003).

A conjuntiva tem vindo a ser cada vez mais estudada, pensando-se em tempos que assumia um papel meramente protetor e de barreira. Hoje em dia sabe-se que esta não assume um papel meramente passivo ( Sa, 2003; de la Fuente *et al.*, 2010).

Na conjuntiva ocorre penetração de fármacos devido a transportadores como as p-glicoproteína, aminoácidos, etc., tendo estes um papel essencial (Sa, 2003; de la Fuente *et al.*, 2010).

Sendo a conjuntiva um segmento vascularizado, uma das consequências é a absorção sistémica significativa, o que constitui um problema pois não só o fármaco não produz o efeito desejável como também pode dar lugar a efeitos colaterais sistémicos graves (Sa, 2003; de la Fuente *et al.*, 2010).

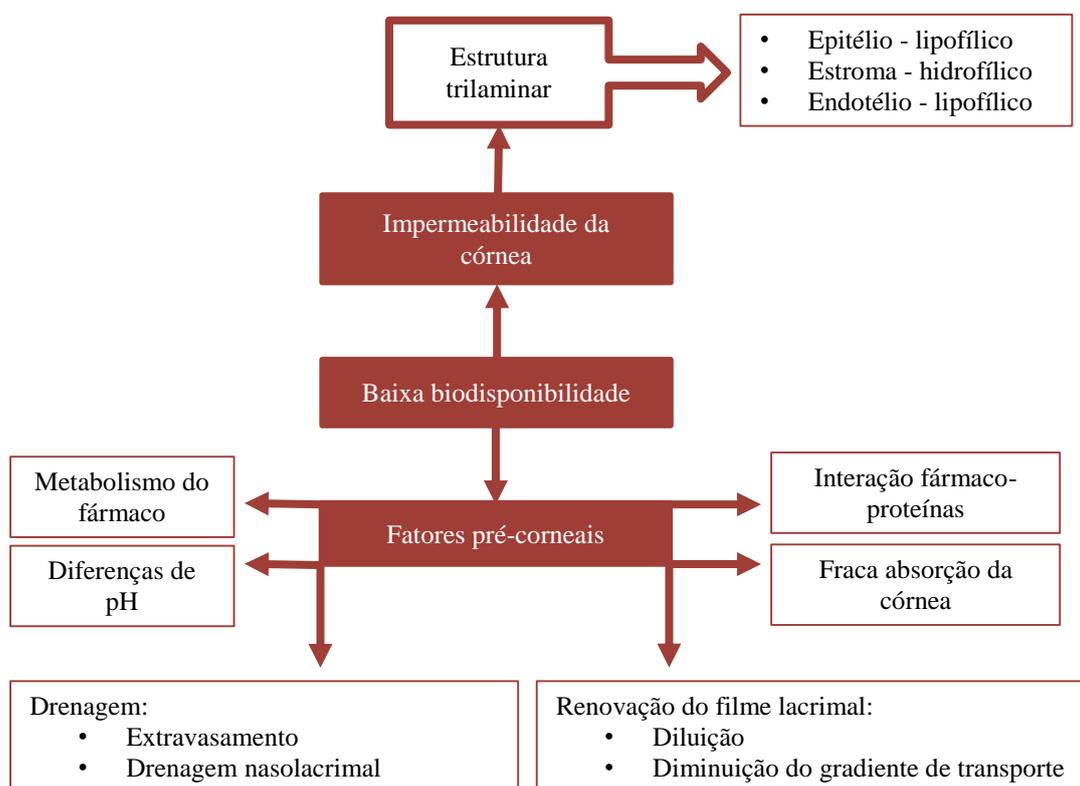
A córnea e a conjuntiva são revestidas por uma camada de muco, constituídos na sua essência por mucina, proteínas, lípidos e ácidos desoxirribonucleicos (ADN), que é parte integrante do filme lacrimal. Este último desempenha um papel fundamental na hidratação do epitélio da córnea e da conjuntiva, inibe o desenvolvimento de microorganismos e é fundamental na defesa contra corpos estranhos. No entanto pode ser um dos obstáculos à penetração de fármacos bem como ao tempo de permanência do

fármaco na superfície do olho devido as suas características de constante renovação (Sa, 2003; de la Fuente *et al.*, 2010).

Sendo que as barreiras acima referidas se tratam de barreiras físicas, aditava-se ainda a problemática das barreiras químicas tais como algumas enzimas metabólicas (ex.: esterases, aldeído e cetona redutases) que podem contribuir para uma diminuição da eficácia ou mesmo degradação dos fármacos (de la Fuente *et al.*, 2010).

Posto isto e como representado na (

Figura 2) é possível perceber que a aplicação tópica de fármacos a nível ocular muitas vezes não é efetiva e que são muitos e variados os mecanismos que podem contribuir para tal (Kaur *et al.*, 2002; de la Fuente *et al.*, 2010).



**Figura 2: Fatores que afetam a eficácia da aplicação de fármacos a nível ocular (adaptado de Kaur *et al.*, 2002).**

Todas estas problemáticas se refletem ao facto de que apenas 5% dos fármacos, em forma de líquidos, aplicados a nível da córnea conseguem penetrar na mesma e atingir os tecidos intra-oculares (Sa, 2003).

Por todos os motivos tornou-se crucial a pesquisa e projeção de sistemas que possam contornar todas as barreiras supra mencionadas (Kaur *et al.*, 2002; Sa, 2003; de la Fuente *et al.*, 2010; Patel, 201;).

### **3. Doenças oculares passíveis de tratamento farmacológico**

Existem várias doenças oculares, algumas suscetíveis de serem tratadas farmacologicamente, outras que necessitam de outros recursos (Kanski, 2004).

Neste capítulo irão ser descritas apenas as doenças oculares passíveis de tratamento farmacológico e de entre todas elas serão apenas incluídas as mais recorrentes.

Serão abordadas patologias como: conjuntivite, blefarite, queratite, glaucoma, edema macular (EM), retinite causada por citomegalovírus (CMV), uveíte (Sharma, 2002; Tranos *et al.*, 2004; Senaratne & Gilbert, 2005; Muñoz-Fernández & Martín-Mola, 2006; Iester, 2008; C. E. M. Rodrigues *et al.*, 2009; Opitz & Harthan, 2012).

De forma a enquadrar as patologias acima referidas será abordado e contextualizado a sua etiologia, manifestações clínicas e tratamento farmacológico adequado.

#### **3.1 Conjuntivite:**

- **Etiologia:**

A conjuntivite pode advir de uma de três principais causas: alérgica (podendo ser classificada como sazonal ou perene consoante duração da sintomatologia), viral ou bacteriana (ambas de origem infecciosa) (Senaratne & Gilbert, 2005; Sheikh & Hurwitz, 2009; Bilkhu, Wolffsohn, & Naroo, 2012).

- **Manifestações clínicas:**

A conjuntivite alérgica caracteriza-se pelo prurido intenso e eritema ocular podendo observar-se edema da pálpebra e inchaço ao nível da conjuntiva (Chigbu, 2009; Sheikh & Hurwitz, 2009; Bilkhu, Wolffsohn, & Naroo, 2012).

A conjuntivite viral caracteriza-se por ser auto-limitada causando inflamação, sensação de corpo estranho, fotofobia, edema das pálpebras. Trata-se de uma patologia contagiosa e que tem como característica um corrimento ocular aquoso (Senaratne & Gilbert, 2005; Sheikh & Hurwitz, 2009).

A conjuntivite bacteriana caracteriza-se por sensação de corpo estranho e irritação a nível ocular e ainda por ser autolimitada tal como a conjuntivite viral. No entanto na conjuntivite bacteriana existe um corrimento ocular de muco purulento (Senaratne & Gilbert, 2005; Sheikh & Hurwitz, 2009).

- **Tratamento farmacológico:**

Na conjuntivite alérgica o tratamento é feito à base de anti-histamínicos orais e tópicos, estabilizadores dos mastócitos, anti-inflamatórios não esteroides (AINES) e corticosteróides (Senaratne & Gilbert, 2005; Chigbu, 2009; Bilkhu *et al.*, 2012; INFARMED, 2013).

Na conjuntivite viral pode recorrer-se às lágrimas artificiais e em casos mais avançados a fármacos antivirais tópicos, como por exemplo a pomada de aciclovir (Senaratne & Gilbert, 2005; Sheikh & Hurwitz, 2009; INFARMED, 2013).

Na conjuntivite bacteriana recorre-se na generalidade a antibióticos de largo espectro como é exemplo o cloranfenicol (Senaratne & Gilbert, 2005; Sheikh & Hurwitz, 2009; INFARMED, 2013).

### **3.2 Blefarite:**

- **Etiologia:**

A blefarite é caracterizada por uma inflamação das pálpebras sendo uma doença crónica. Pensa-se que esteja associada a infeções bacterianas, xeroftalmia e/ou a algumas patologias da pele. Poder ser classificada consoante a localização da infeção, dividindo-se em blefarite anterior, (que pode ainda subdividir-se em blefarite estafilocócica e blefarite seborreica), blefarite posterior e blefarite mista (Kanski, 2004).

- **Manifestações clínicas:**

De um modo geral a blefarite caracteriza-se por sensação de queimadura e areia no olho, havendo ainda fotofobia pouco acentuada, descamação e vermelhidão na zona da margem das pálpebras (Kanski, 2004).

A blefarite anterior apresenta hiperémia e telangiectasias nas margens anteriores da pálpebra, crostas que variam na consistência e localização consoante a blefarite é de origem estafilocócica ou seborreica e alterações ao nível dos cílios (Kanski, 2004).

A blefarite posterior caracteriza-se por uma disfunção da glândula meibomiana (disfunção de glândula sebácea do olho), nas pálpebras e base dos cílios (Kanski, 2004).

- **Tratamento farmacológico:**

Na blefarite anterior o tratamento farmacológico tem por base pomadas antibióticas (ácido fúsidico ou cloranfenicol) e esteroides tópicos fracos (fluorometolona), podendo-se ainda recorrer-se às lágrimas artificiais (Kanski, 2004; INFARMED, 2013).

Na blefarite posterior recorrer-se essencialmente a tetraciclina sistémicas (Kanski, 2004; INFARMED, 2013;).

### **3.3 Queratite:**

- **Etiologia:**

A queratite também designada inflamação da córnea pode dividir-se em queratite ulcerativa ou queratite não ulcerativa, podendo ter origem infecciosa ou não (Sharma, 2002).

A queratite ulcerativa pode ter por base uma origem bacteriana, viral ou fúngica. A queratite não ulcerativa geralmente associa-se a causas auto-imunes (Sharma, 2002; S. K. & K. R., 2009).

- **Manifestações clínicas:**

As manifestações clínicas caracterizam-se de uma forma geral por dor, fotofobia, perda de visão e lacrimejo (Alex, Bartolomei, Feldman, & Edell, 2014; Alex, Feldman, & Alcaraz-Micheli, 2014; Alex, Feldman, Nijm, Doss, & Bunya, 2015).

- **Tratamento farmacológico:**

Na queratite bacteriana recorre-se a antibióticos tópicos principalmente de largo especto. O antibiótico escolhido vai depender da extensão da lesão bem como do microrganismo envolvido (Alex, Bartolomei, *et al.*, 2014).

Na queratite viral recorre-se essencialmente aos fármacos antivíricos tópicos sendo contra indicados corticosteroides (Alex *et al.*, 2015).

Na queratite fúngica o tratamento de eleição são os antifúngicos tópicos (Alex, Feldman, *et al.*, 2014).

### **3.4 Glaucoma:**

- **Etiologia:**

O glaucoma resulta no dano do nervo ótico geralmente devido ao aumento da pressão intra-ocular (PIO). Patologias como a diabetes e miopia extrema estão associadas ao aparecimento da doença (University of Maryland Medical Center, 2012).

O aumento excessivo da PIO deve-se a uma acumulação de humor aquoso no interior do olho por problemas que derivam do ângulo de drenagem, não havendo assim um escoamento correto dos fluidos (University of Maryland Medical Center, 2012).

Existem vários tipos de glaucoma: glaucoma de ângulo aberto ou primário, glaucoma de ângulo fechado, glaucoma de pressão normal, glaucoma congênito e glaucoma secundário, sendo o glaucoma de ângulo aberto o mais comum (University of Maryland Medical Center, 2012).

- **Manifestações clínicas:**

No glaucoma de ângulo aberto as manifestações clínicas apenas aparecem numa fase avançada da doença, sendo assintomática até então. Estas manifestações podem traduzir-se em diminuição gradual da visão periférica, sendo característico desta patologia a visão em túnel (University of Maryland Medical Center, 2012).

No glaucoma de ângulo fechado as manifestações podem estar presentes intermitentemente e aparecem de forma gradual havendo dor intensa e enorme pressão a nível ocular. Há vermelhidão e pode ocorrer visão de halos de arco-íris em redor das luzes (University of Maryland Medical Center, 2012).

- **Tratamento farmacológico:**

Existe uma vasta gama de fármacos indicados para o tratamento do glaucoma. Estes podem ser utilizados em monoterapia ou em associação (University of Maryland Medical Center, 2012).

Os grupos farmacoterapêuticos indicados nesta patologia são os betabloqueadores, simpaticomiméticos, inibidores da anidrase carbónica, prostaglandinas e parassimpaticomiméticos (University of Maryland Medical Center, 2012).

### **3.5 Edema macular:**

- **Etiologia e manifestações clínicas:**

O edema macular é uma patologia da mácula que geralmente resulta do culminar de algumas complicações intra-oculares e sistémicas, na sua origem podem estar

patologias vasculares, inflamatórias e tumorais. Pode também ser induzida por medicação (Tranos *et al.*, 2004).

O edema macular pode apresentar-se sob um padrão difuso caracterizado pelo espessamento anormal da mácula ou sob a forma de edema macular cistóide que adquire uma configuração petalóide havendo formação de quistos (Tranos *et al.*, 2004; Bhagat, Grigorian, Tutela, & Zarbin, 2009; Johnson, 2009).

Esta patologia está associada à deposição de fluido e proteínas sobre esta zona da retina (Tranos *et al.*, 2004; Bhagat *et al.*, 2009; Johnson, 2009).

- **Tratamento farmacológico:**

A terapêutica do edema macular assenta essencialmente em grupos farmacoterapêuticos como os anti-inflamatórios não esteróides, inibidores da anidrase carbónica, corticosteróides, corticoides e imunomoduladores (Tranos *et al.*, 2004).

### **3.6 Retinite causada por Citomegalovírus:**

- **Etiologia:**

A retinite por CMV é uma patologia comumente associada a doentes portadores do vírus da sida (HIV) (71 a 85% (Kempen *et al.*, 2003)). No entanto outros doentes imunocomprometidos são também uma população alvo (C. E. M. Rodrigues *et al.*, 2009; Gupta, Patel, Patel, & Patel, 2014).

- **Manifestações clínicas:**

As principais manifestações clínicas são visão turva e alteração do campo visual, podendo dar-se deslocamento da retina e perda de visão progressiva (C. E. M. Rodrigues *et al.*, 2009).

- **Tratamento farmacológico:**

O tratamento farmacológico passa pela utilização de antirretrovirais nomeadamente ganciclovir (Kempen *et al.*, 2003).

### **3.7 Uveíte:**

- **Etiologia:**

A uveíte decorre da inflamação da camada média do olho (camada uveal, formada pela íris, corpo ciliar e coróide). Pode derivar de infeções, lesões ou doenças auto-imunes. No entanto a sua origem ainda não está completamente esclarecida, estando

muitas vezes relacionada com patologias reumatológicas (Muñoz-Fernández & Martín-Mola, 2006; Rathinam & Babu, 2013).

Esta patologia é classificada consoante a sua localização (anterior, posterior, intermédia ou panuveíte), sendo a uveíte do segmento anterior a mais comum.

Dependendo do tempo de evolução da doença a uveíte pode ainda ser classificada em aguda, crónica ou recorrente. A uveíte ocular pode afetar apenas um (unilateral) ou os dois olhos (bilateral) (Muñoz-Fernández & Martín-Mola, 2006; Rathinam & Babu, 2013).

- **Manifestações clínicas:**

Na uveíte anterior os principais sintomas são a dor, vermelhidão e fotofobia. A flutuação nos pontos de visão é um importante sintoma para detetar a uveíte intermédia ou posterior (Rathinam & Babu, 2013).

- **Tratamento farmacológico:**

O tratamento farmacológico da uveíte passa essencialmente pela aplicação de corticosteróides, antivíricos ou antibióticos, sendo que aquando associada a outra patologia, o tratamento dessa mesma patologia deve ser incluído (Muñoz-Fernández & Martín-Mola, 2006).

#### **4. Libertação controlada de fármacos em terapia ocular**

Existem várias formas farmacêuticas de aplicação ocular no atual arsenal terapêutico (ex.: soluções, emulsões, suspensões e pomadas) (Gaudana *et al.*, 2010; Patel, 2013).

De entre elas as soluções constituem a forma farmacêutica de eleição, representando 90% do consumo de fármacos de aplicação por via tópica a nível ocular (Patel, 2013).

As principais vantagens das soluções têm a ver com o facto de se tratar de uma forma farmacêutica pouco dispendiosa, não invasiva e que o doente pode autoadministrar sem grandes complicações. No entanto apresenta uma baixa biodisponibilidade tornando-as assim, um tratamento pouco efetivo, uma vez que muitas vezes as doses atingidas são sub-terapêuticas (Gaudana *et al.*, 2010; Patel, 2013).

As emulsões foram concebidas com a finalidade de melhorar a biodisponibilidade dos fármacos. No entanto revelaram-se sistemas bastante instáveis, que apenas com a adição de um emulgente atingem a estabilidade pretendida podendo ser necessário a adição de compostos catiónicos que se podem revelar tóxicos (Liang *et al.*, 2008).

Apesar de tudo quando comparadas com as soluções, as emulsões apresentam maior estabilidade e aumentam o tempo de permanência do fármaco na zona pré-corneal (Angare, Giri, Tripathi, Amit, & Ajazuddin, 2012; Opitz & Harthan, 2012; Patel, 2013).

Esta forma farmacêutica pode assumir uma de duas formulações: água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A), sendo que as emulsões (O/A) se mostraram menos irritantes e melhor toleradas a nível ocular (S Tamilvanan, 2004; Liang *et al.*, 2008; Shunmugaperumal Tamilvanan, Venkateshan, & Ludwig, 2008; Patel, 2013).

As suspensões tal como as emulsões necessitam da adição de agentes estabilizadores nomeadamente agentes suspensores e dispersantes. É certo que as partículas em suspensão vão dar origem a uma maior biodisponibilidade, no entanto a drenagem do fármaco para o ducto lacrimal, o desconforto e a visão turva continuam a ser desvantagens que se aditivam ao facto de ser necessário a manipulação do tamanho das partículas de modo a permitir uma maior retenção destas na zona pré-corneal (Iester, 2008; A. Kumar, Malviya, & Sharma, 2011; Patel, 2013).

As pomadas de aplicação ocular são formuladas para que a sua temperatura de fusão seja coincidente com a temperatura ocular (aproximadamente 34°C), de modo a que quando entrem em contacto com esta superfície haja uma mudança de estado e

passando estas a ficar na forma de pequenas gotas assim aumentando a biodisponibilidade do fármaco. No entanto a aplicação de pomadas nesta região anatômica apresenta algumas desvantagens pois causa visão turva e em alguns casos irritação da zona, o que leva não só ao desconforto como a uma má adesão à terapêutica (C. E. M. Rodrigues *et al.*, 2009; A. Kumar *et al.*, 2011; University of Maryland Medical Center, 2012).

As formulações supra citadas acarretam bastantes desvantagens não só a nível da baixa disponibilidade e mau perfil terapêutico que em geral apresentam (embora umas sejam melhores que outras) como também ao nível do desconforto para o paciente tanto a nível ocular (irritação, vermelhidão e visão turva) como ao nível das consecutivas aplicações que têm de ser feitas (Kushwaha *et al.*, 2012; Cholkar, Patel, Vadlapudi, & Mitra, 2013).

Deste modo surgiu a necessidade de criar estratégias de formulação de formas farmacêuticas de aplicação ocular que ultrapassassem estas desvantagens e que permitissem garantir uma melhor biodisponibilidade (Patel, 2013).

A fim de combater as desvantagens acima referidas surgiram novas formas farmacêuticas que propõem mecanismos de liberação controlada dos fármacos. Estas formas farmacêuticas permitem uma menor frequência de administração mantendo os níveis terapêuticos, o que se torna uma grande vantagem quando comparadas com as formas farmacêuticas convencionais (Lyra *et al.*, 2007).

Na (Figura 3) compararam-se os perfis de concentração plasmática de um fármaco administrado através de métodos convencionais de aplicação múltipla e de sistemas de liberação controlada. Da análise da figura, é evidente que os sistemas de liberação controlada permitem manter as concentrações de fármaco sempre num nível efetivo, aproximadamente constante, enquanto que os sistemas convencionais dão origem a perfis tipo serra, com picos e vales de concentração, que podem atingir níveis tóxicos e/ou sub-terapêuticos (Lyra *et al.*, 2007).

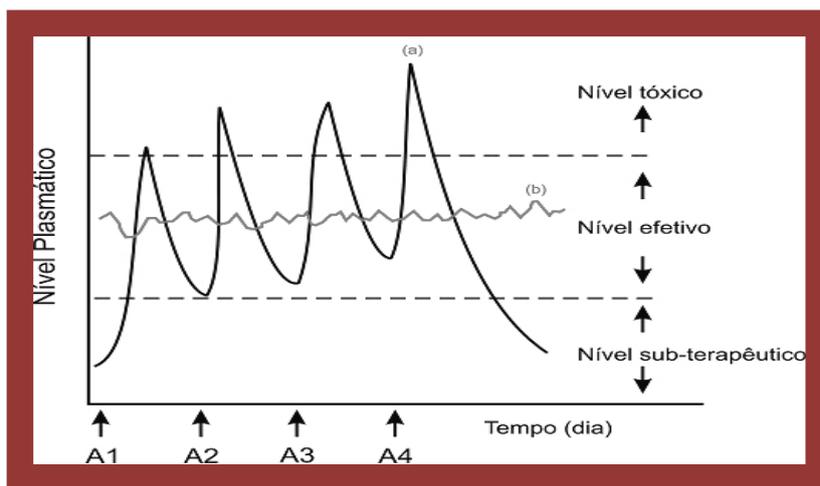


Figura 3: Comparação dos métodos convencionais de administração múltipla com os sistemas de liberação controladas (Adaptado de Lyra *et al.*, 2007).

Nos últimos anos têm sido desenvolvidas diversas estratégias alternativas aos sistemas convencionais, para veicular fármacos de forma controlada, a nível ocular. Na (Tabela 1) são referidos alguns desses tipos de formulações, bem como as suas principais vantagens. São também indicados fármacos veiculados em cada caso (Sahoo *et al.*, 2008; Amo & Urtti, 2008; Patel, 2013; Baranowski *et al.*, 2014).

Tabela 1: Principais vantagens e fármacos veiculados pelos sistemas de liberação controlada (adaptada de Campos *et al.*, 2001; Sahoo *et al.*, 2008; Patel, 2013; Baranowski *et al.*, 2014).

| Sistemas de liberação controlada a nível ocular |   |  |
|---|---|--|
| Sistemas  | Vantagens   | Fármacos veiculados  |
| <b>Microemulsão</b>                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Baixos custos de produção;</li> <li>✓ Estáveis;</li> <li>✓ Aumento da biodisponibilidade do fármaco;</li> <li>✓ Veiculam grandes quantidades de princípio ativo;</li> <li>✓ Solubilização de princípios ativos com solubilidades distintas.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Timolol</li> <li>- Dexametasona</li> <li>- Cloranfenicol</li> <li>- Prednisolona</li> <li>- Pilocarpina</li> <li>- Ciclosporina A</li> <li>- Flurbiprofeno (axetil)</li> <li>- Difluprednato</li> </ul> |
| <b>Nanoemulsão</b>                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Cineticamente estáveis;</li> <li>✓ Aumento da biodisponibilidade do fármaco;</li> <li>✓ Viscosidade reduzida;</li> <li>✓ Gotículas de reduzido tamanho.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Clorohidrato de terbinafina</li> <li>- Pilocarpina</li> <li>- Flurbiprofeno</li> <li>- Sulfacetamida</li> <li>- Aciclovir</li> <li>- Piroxicam</li> <li>- Ciclosporina A</li> </ul>                     |

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>Lipossomas</b>                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Caracter anfílico (incorpora tanto fármacos lipofílicos como hidrofílicos);</li> <li>✓ Libertação do fármaco em locais específicos e aumento do tempo de permanência dos mesmos;</li> <li>✓ Proteção do fármaco quanto à sua degradação;</li> <li>✓ Baixa toxicidade.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pilocarpina</li> <li>- Ofloxacina</li> <li>- Cloranfenicol</li> <li>- Fluconazol</li> <li>- Diclofenac de sódio</li> <li>- Acetazolamida</li> <li>- Ganciclovir</li> </ul> |
| <b>Nanopartículas</b>                                |   |   |
| <b>• Lipídicas</b>                                   |   |   |
| ○ <b>Nanopartículas de lípidos sólidos (NLS)</b>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Estabilidade física;</li> <li>✓ Proteção do fármaco quanto a sua degradação;</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Diclofenac de sódio (NLS)</li> </ul>   |
| ○ <b>Nanoestruturas carregadas com lípidos (NCL)</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Baixo custo de produção;</li> <li>✓ Libertação do fármaco em locais específicos e aumento do tempo de permanência nos mesmos;</li> <li>✓ Baixa toxicidade.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tobramicina (NLS)</li> <li>- Ibuprofeno (NCL)</li> <li>- Flurbiprofeno (NCL)</li> </ul>  |
| <b>• Poliméricas</b>                                 |   |   |
| ○ <b>Nanoesferas</b>                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Aumento da estabilidade do fármaco;</li> <li>✓ Baixa toxicidade;</li> <li>✓ Aumento do tempo de permanência do fármaco na córnea.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Surfacetamida</li> <li>- Esparfloxacina</li> <li>- Levofloxacina</li> <li>- Aciclovir</li> <li>- Piroxicam</li> </ul>  |
| ○ <b>Nanocápsulas</b>                                |   |   |
| <b>Hidrogéis</b>                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Aumento do tempo de contacto do fármaco com o local de aplicação;</li> <li>✓ Baixa toxicidade;</li> <li>✓ Biocompatibilidade;</li> <li>✓ Fácil administração;</li> <li>✓ Possibilidade de aplicação na forma líquida.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gatifloxacina</li> <li>- Brimonidina</li> <li>- Maleato de timolol</li> <li>- Fluconazol</li> <li>- Pilocarpina</li> </ul>   |

| <b>Implantes</b>            |  |  |
|-----------------------------|--|--|
| <b>• Biodegradáveis</b>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Libertação do fármaco em local específico;</li> <li>✓ Poucos efeitos secundários;</li> <li>✓ Capacidade de contornar a barreira hemato-retiniana;</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ganciclovir</li> <li>- Ciprofloxacina</li> <li>- Triancinolona</li> </ul>         |
| <b>• Não biodegradáveis</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Os implantes biodegradáveis apresentam a vantagem de não ser necessário a sua remoção.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pilocarpina</li> </ul>  |
| <b>Ciclodextrinas</b>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Aumento da estabilidade dos fármacos;</li> <li>✓ Aumento da biodisponibilidade do fármaco;</li> <li>✓ Diminuição de interações;</li> <li>✓ Maior estabilidade dos próprios fármacos;</li> <li>✓ Menos efeitos secundários.</li> </ul>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pilocarpina</li> <li>- Dexametasona</li> </ul>                                    |
| <b>Dendrimeros</b>          | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Permite incorporação de fármacos de diferentes naturezas (hidrofilicos e lipofílicos);</li> <li>✓ Aumenta a biodisponibilidade do fármaco e seu tempo de permanência;</li> <li>✓ Facilita a penetração do fármaco no local alvo.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nitrato de pilocarpina</li> <li>- Tropicamida</li> </ul>                          |
| <b>Lentes de contacto</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Aumento da biodisponibilidade;</li> <li>✓ Aumento da permanência do fármaco no local alvo;</li> <li>✓ Maior eficácia terapêutica;</li> <li>✓ Diminuição dos efeitos adversos.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Beta-bloqueadores</li> <li>- Anti-histaminicos</li> <li>- Antibióticos</li> </ul> |

Muitos dos sistemas acima referidos já se encontram disponíveis no mercado como sistemas de libertação controlada de fármacos com vista à terapia ocular. No entanto alguns destes sistemas, embora permitam melhorar a eficácia do tratamento relativamente à conseguida com os sistemas tradicionais (colírios), ainda não atingiram o grau de desempenho ideal (Tangri & Khurana, 2011).

Estes sistemas devem permitir atingir uma determinada concentração de fármaco no alvo pretendido durante um período de tempo, que permita uma elevada eficácia da terapêutica, bem como minimizar efeitos secundários a nível sistémico. Além disso, para promover uma maior adesão à terapêutica por parte do doente, devem ter em conta o conforto e a fácil aplicação por parte do utilizador (Tangri & Khurana, 2011; Patel, 2013).

Algumas das desvantagens destes novos sistemas de libertação controlada prendem-se com questões tecnológicas, uma vez que alguns destes sistemas são de difícil e complexa produção. Acrescem nalguns casos problemas de estabilidade, por exemplo em sistemas como os lipossomas e nanopartículas devidos à agregação que possam sofrer (Amo & Urtili, 2008; Sahoo *et al.*, 2008; Baranowski *et al.*, 2014; Patel, 2013).

Uma das formas de contornar algumas destas dificuldades é a combinação dos diferentes tipos de sistemas numa única forma de administração, (Patel, 2013) conciliando as vantagens das mesmas. Alguns exemplos são a inclusão de lipossomas e nanopartículas em sistemas de géis *in situ* ou o revestimento de sistemas como lipossomas e nanopartículas por polímeros bioadesivos (Tangri & Khurana, 2011).

Alguns destes sistemas serão explorados no capítulo 5, secção 5.3, com o intuito de os relacionar com o polímero em estudo nesta monografia.

## 5. Quitosano

O quitosano é um polímero que tem captado cada vez mais o interesse da comunidade científica devido às propriedades únicas que apresenta e à sua aplicabilidade não só a nível biológico como também biomédico (Cheung *et al.*, 2015).

Todas estas características e propriedades serão descritas ao longo do capítulo. O crescente interesse pelo estudo do quitosano e seus derivados está demonstrado na (figura 4) pelo aumento do número de estudos envolvendo estes compostos ao longo da última década (Cheung *et al.*, 2015).

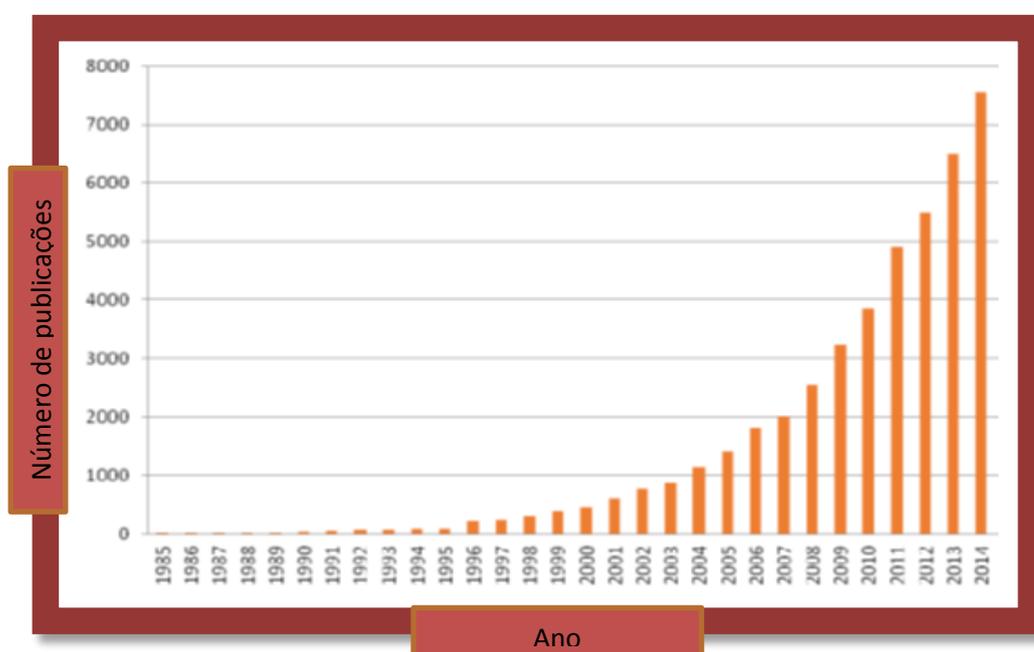


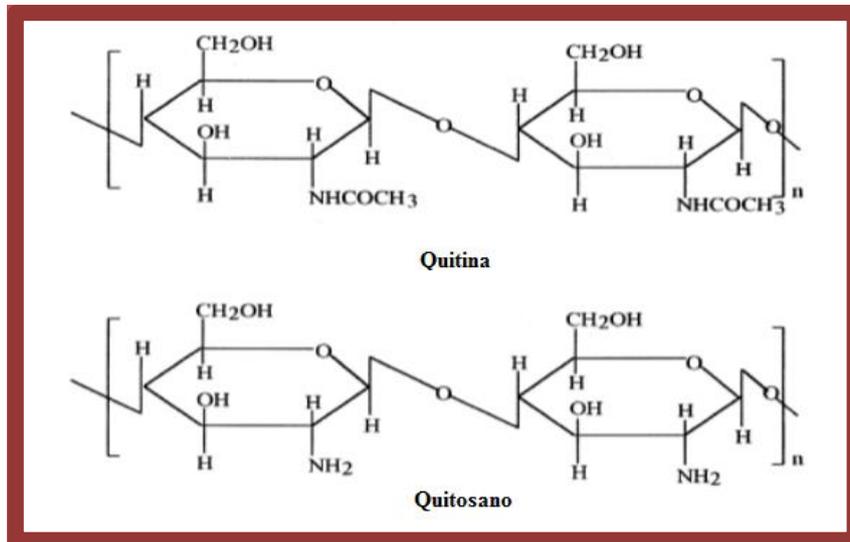
Figura 4: Número de estudos efetuados sobre o quitosano e seus derivados ao longo de 1985 a 2014 (Adaptado de Cheung *et al.*, 2015).

### 5.1 Estrutura e propriedades

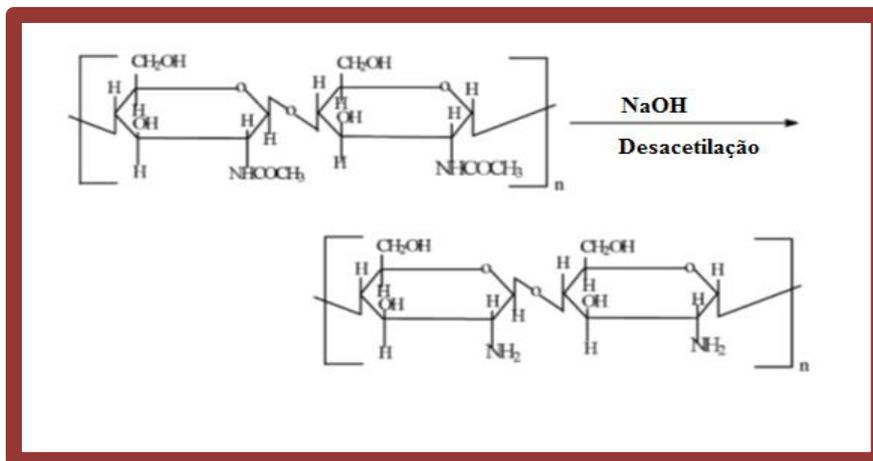
O quitosano (figura 5) deriva de uma desacetilação alcalina da quitina, podendo extrair-se do exoesqueleto dos crustáceos e insetos e também a partir de alguns fungos. Depois da celulose este é o polissacárido mais abundante na natureza (M. N. V. R. Kumar, 2000; Hamidi *et al.*, 2008).

A quitina (Figura 5) é constituída por duas unidades, 2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranosose e 2-amina-2-desoxi-D-glucopiranosose, que estabelece entre elas ligações

glicosídicas  $\beta(1-4)$ , aquando da formação do quitosano, através do processo de desacetilação anteriormente referido (Figura 6). Na molécula de quitosano há então uma predominância de 2-amina-2-desoxi-D-glucopirranose (unidade desacetilada) (M. N. V. R. Kumar, 2000; Dash *et al.*, 2011)



**Figura 5:** Estrutura molecular da quitina e do quitosano (adaptado M. N. V. R. Kumar, 2000).



**Figura 6:** Processo de desacetilação para produção do quitosano (adaptado M. N. V. R. Kumar, 2000).

O quitosano na forma como é conhecido, foi descoberto no século XIX. No entanto só mais recentemente foram desenvolvidos estudos focados na utilização deste polímero como veículo para liberação controlada de fármacos e outras aplicações biomédicas/farmacêuticas. As suas excelentes propriedades físico-químicas e biológicas, motivaram a realização de estudos envolvendo macromoléculas como

péptidos, proteínas, antigénios, oligonucleótidos e genes (Hamidi *et al.*, 2008; Dash *et al.*, 2011).

Trata-se de um polissacárido catiónico que apresenta propriedade mucoadesivas superiores à maioria dos polímeros biomédicos. Tal deve-se à sua capacidade para estabelecer interações electroestáticas (forças de atração molecular) com as cargas negativas do muco. Daí o interesse no seu estudo enquanto veículo de fármacos a nível oftálmico (Sa, 2003; Ludwig, 2005; Dash *et al.*, 2011).

O quitosano é um polímero biodegradável, biocompatível e não tóxico, sendo reconhecido pelas suas características antimicrobianas e cicatrizantes, que constituem inequívocas vantagens (Ludwig, 2005).

A biodegradabilidade deste polímero deve-se à ação hidrolítica da lisozima e de outras enzimas (Ludwig, 2005).

Para além de tudo isto, apresenta um comportamento pseudoplástico (a viscosidade diminui com o aumento da tensão de corte) e viscoelástico (i.e. ao deformar-se, sofre simultaneamente deformação elástica e viscosa) (Ludwig, 2005).

As propriedades acima referidas resultam tanto da formação de ligações químicas como as pontes de hidrogénio como de interações iónicas que se estabelecem entre a carga positiva do grupo amino da molécula de quitosano e a carga negativa dos resíduos de ácido síalico presente na mucina (Sa, 2003).

Este polímero aumenta a permeabilidade celular influenciando tanto as vias para como intra-celulares de um modo reversível sem comprometer a viabilidade das células. Um dos fatores limitantes à sua ação é o pH, uma vez que o seu desempenho é potenciado a pH neutro ou ligeiramente alcalino como acontece no filme lacrimal. Este polímero é solúvel em soluções aquosas ácidas e insolúveis em soluções básicas ou neutras, sendo que a solubilidade do quitosano está diretamente relacionada com a protonação dos seus grupos NH (Sa, 2003; Ludwig, 2005; Coimbra, 2010).

O quitosano é um polímero bastante interessante com vista a formulação de micro e nanopartículas devido não só às suas propriedades mucoadesivas, que são responsáveis pela retenção destas partículas, na superfície do olho, mas também ao aumento da permeabilidade que confere a nível celular (Ludwig, 2005).

A taxa de degradação é proporcional ao grau de acetilação que a molécula apresenta. Desta forma a capacidade de libertação prolongada do fármaco pode ser alterada através da escolha das características do polímero a esse nível (Ludwig, 2005).

## 5.2 Aplicações biomédicas/farmacêuticas

O quitosano é considerado um biomaterial que devido às suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e atividade biológica se revela um polímero bastante versátil (Sa, 2003; Ludwig, 2005; Dash *et al.*, 2011).

Este polímero demonstra propriedades de resistência à tração e condutividade bastante promissoras ressaltando ainda que apresenta uma grande área de superfície bem como porosidade. Outra das grandes vantagens deste composto é poder apresentar grande versatilidade ao nível do tamanho e da forma que apresenta, podendo apresentar-se sob a forma de filme, fibra, esponja, solução, gel, pó e mesmo grânulos (Dodane & Vilivalam, 1998; Dash *et al.*, 2011; Cheung *et al.*, 2015).

Assim o quitosano revelou-se um polímero com inúmeras vantagens que se podem aplicar a diversas áreas, tais como:

- Engenharia de tecidos e medicina regenerativa:

A engenharia de tecidos e medicina regenerativa é uma área altamente interdisciplinar que relaciona os princípios e métodos da ciência, da engenharia e da tecnologia. Tem por objetivo melhorar ou substituir funções biológicas estabelecendo uma relação que permita desenvolver substitutos biológicos funcionais de um tecido (associado a patologia ou não), de modo a restabelecer, melhorar ou manter as funções desse mesmo tecido (Dash *et al.*, 2011; Cheung *et al.*, 2015).

De entre as aplicações biomédicas pode distinguir-se várias que podem ir desde a reparação ou substituição de pequenas partes ou partes integrais de um tecido como por exemplo vasos, ossos, cartilagens, sangue, bexiga, fígado, pele e músculo (Dash *et al.*, 2011; Cheung *et al.*, 2015).

- Cicatrização:

O quitosano sendo um polímero biodegradável, biocompatível, com atividade antimicrobiana e baixa imunogenicidade confere vantagens tendo em vista o desenvolvimento de um biomaterial com o objetivo de cicatrização (Dodane & Vilivalam, 1998; Dash *et al.*, 2011; Cheung *et al.*, 2015).

Em relação ao modo de atuação de um modo geral o quitosano permite o crescimento de uma matriz de tecido tridimensional estimulando a atividade dos macrófagos e a proliferação celular, promovendo a atividade dos leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos (Cheung *et al.*, 2015).

Há uma degradação do quitosano em N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina o que promove a multiplicação de fibroblastos, havendo deposição de colagénio e síntese de ácido hialurónico no local (Cheung *et al.*, 2015).

Assim todo o processo vai promover e diminuir o tempo de recuperação, diminuir o risco de infeção tendo ainda como grande vantagem o impedimento de formação de cicatriz (Dash *et al.*, 2011; Cheung *et al.*, 2015).

- Sistemas de libertação controlada de fármacos:

Os sistemas de libertação controlada de fármacos tem sido bastante estudado nas últimas décadas e um dos polímeros acoplados a este tipo de formulações é o quitosano que tem tido um grande impacto e utilização por parte da indústria farmacêutica (Dodane & Vilivalam, 1998; Dash *et al.*, 2011; Cheung *et al.*, 2015).

São variadíssimas as formas que estes sistemas podem assumir a forma de comprimidos, microesferas, micelas, hidrogéis, nanopartículas entre outros, veiculando proteínas/péptidos, fatores de crescimento, anti-inflamatórios, antibióticos entre muitos outros, sendo de ressaltar que o quitosano é o único polímero biodegradável que tem propriedades que permitem veicular compostos catiónicos (Dodane & Vilivalam, 1998; Dash *et al.*, 2011; Bernkop-schnürch & Dünhaupt, 2012; Cheung *et al.*, 2015).

A sua aplicabilidade tem por base diversas vias tais como a via oral, nasal, vaginal, parental, transdérmica, intravesical, sendo a via ocular a que terá o grande enfoque ao logo de toda esta monografia (Dodane & Vilivalam, 1998; Bhattarai *et al.*, 2010; Dash *et al.*, 2011; Bernkop-schnürch & Dünhaupt, 2012; Cheung *et al.*, 2015).

### 5.3 Aplicações do quitosano em terapia ocular

#### 5.3.1 Soluções

As formulações mais bem aceites para administração tópica de fármacos a nível ocular são as líquidas (Sa, 2003; Diebold *et al.*, 2007).

As soluções à base de quitosano são a forma mais simples em que este polímero se pode apresentar para este tipo de aplicações, sendo por vezes referidas como hidrogéis (Sa, 2003; Kushwaha *et al.*, 2012).

Os hidrogéis são por definição polímeros que em contacto com a água aumentam o seu volume devido à incorporação da mesma na sua estrutura. No caso concreto do quitosano e seus derivados, em determinadas condições, as formulações líquidas têm a capacidade de passar de líquido a gel. A modificação das cadeias do quitosano por enxerto de outros polímeros ou grupos funcionais específicos, permite a forma de resposta do polímero (Sa, 2003; Kushwaha *et al.*, 2012).

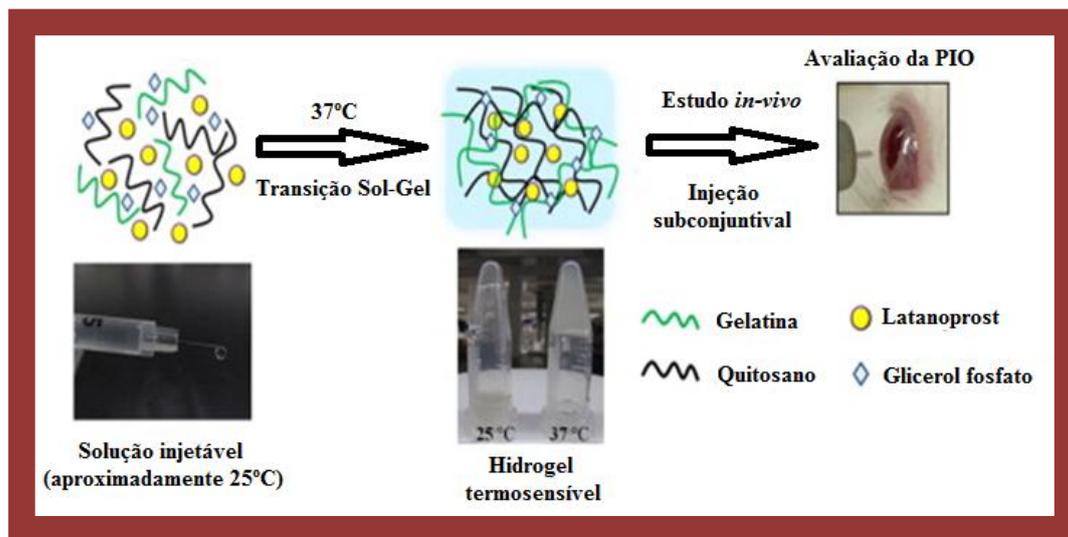
Esta categoria de hidrogéis é normalmente designada como hidrogéis inteligentes ou hidrogéis sensíveis a estímulos, sendo por alguns autores também referenciada como géis *in situ*. Estes polímeros permitem não só atuar de forma direta no alvo pretendido, como também fazer a libertação prolongada do fármaco (Bernkop-schnürch & Dünnhaupt, 2012; Kushwaha *et al.*, 2012).

A transição de uma fase líquida para uma fase gel pode estar associada a diferentes estímulos que podem ser físicos, como a temperatura, ou químicos, como o pH ou interações iónicas (Bernkop-schnürch & Dünnhaupt, 2012; Kushwaha *et al.*, 2012).

No caso da temperatura, a formulação apresenta-se líquida à temperatura ambiente (20-25°C) e transita para a forma de gel em contacto com os fluidos corporais (35-37°C). Esta transformação resulta da formação de domínios hidrofóbicos decorrentes de alterações estruturais nas cadeias do polímero (Bernkop-schnürch & Dünnhaupt, 2012; Kushwaha *et al.*, 2012).

Nos polímeros termosensíveis, a transição de fases ocorre em geral de uma forma reversível. Consoante a temperatura à qual o sistema polimérico se torna insolúvel, este tipo de polímeros pode classificar-se em *lower critical solution temperature* (LCST) e *upper critical solution temperature* (UCST) (James, John, Alex, & Anoop, 2014).

Os polímeros termosensíveis mais utilizados são os LCST, como é o caso particular do quitosano (Cheng, Hung, Tsai, Lee, & Ku, 2014; James *et al.*, 2014). Cheng *et al.* (Tabela 2) dirigiram um estudo de forma a entender o potencial de um hidrogel termosensível à base de quitosano, gelatina e fosfato de glicerol (CS/G/GP) para veicular o fármaco latanoprost e atingir uma maior efetividade no tratamento do glaucoma (Figura 7) (Cheng *et al.*, 2014).



**Figura 7: Esquema de formação, administração e controle do hidrogel termosensível à base de CS/G/GP (Adaptado de Cheng *et al.*, 2014).**

Os resultados obtidos revelaram que a temperatura de gelificação do hidrogel CS/G/GP contendo latanoprost era de 34,12°C, transitando de fase em apenas 1 min a 37°C. Estudos *in vitro* demonstraram que o sistema tinha a capacidade de sustentar a libertação prolongada do fármaco durante 28 dias. Demonstrou-se ainda que o grau de desacetilação do quitosano (neste caso superior a 95%) está associado à sua biocompatibilidade. O quitosano com maior grau de desacetilação originou um maior tempo de permanência do fármaco no local alvo sem qualquer tipo de sinal de toxicidade detetável (Cheng *et al.*, 2014). Estudos *in vivo* demonstraram que a injeção subconjuntival deste hidrogel permitiu uma diminuição da PIO eficaz no prazo de 8 dias, permitindo uma manutenção destes valores durante 31 dias (Cheng *et al.*, 2014).

Globalmente, os resultados deste estudo demonstram que a veiculação do latanoprost num hidrogel termosensível de CS/G/GP é bastante promissora e reveste-se

de diversas vantagens quando comparada com a aplicação dos colírios convencionais (Cheng *et al.*, 2014).

Relativamente ao pH, existem soluções que passam a gel com o aumento do pH (por exemplo de 4 para 7). Ao pH fisiológico, determinados polímeros à base de quitosano formam ligações de hidrogénio com a mucina levando assim à formação do hidrogel. O quitosano apresenta uma carga positiva a pH fisiológico, o que promove a sua capacidade bioadesiva e permite uma maior retenção do fármaco no local (Berger *et al.*, 2004; Bernkop-schnürch & Dünnhaupt, 2012).

Um estudo de Wu *et al.* (Tabela 2) permitiu dar a conhecer um hidrogel sensível à temperatura e ao pH, produzido com base num derivado de quitosano (N - [(2-hidroxi-3-trimetilamónio) propil] cloreto de quitosano (HTCC)) e glicerofosfato (GP). Os autores investigaram o comportamento do hidrogel na veiculação da doxirrubicina (Wu *et al.*, 2006). Verificaram ser possível incorporar a doxirrubicina numa solução deste material, estável a temperaturas perto da ambiente e que sofre transição de fase aos 37°C, passando à forma de gel transparente. A liberação prolongada do fármaco foi estudada em pH ácido e básico, comparando-se o gel HTCC/GP com um gel CS/GP. Obtiveram-se melhores resultados com o gel contendo o derivado de quitosano, uma vez que o quitosano na sua forma base não mostrou qualquer sensibilidade ao pH (Wu *et al.*, 2006). Foi possível obter um perfil de liberação controlada quando o pH se aproxima da neutralidade, sendo que em ambiente ácido a liberação da doxirrubicina é feita a uma velocidade bastante alta (Wu *et al.*, 2006). Além disso, o hidrogel de HTCC/GP mostrou-se promissor na utilização em terapia ocular uma vez que é transparente (Wu *et al.*, 2006). Este estudo constituiu uma nova abordagem para utilização do quitosano, evidenciando as suas propriedades em hidrogéis inteligentes para veiculação de fármacos.

Finalmente, a formulação líquida pode passar a gel pela presença de interações iónicas. Por exemplo, no fluido lacrimal, a passagem da solução a gel poder-se-ia dar pela complexação com catiões polivalente (ex. Ca<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup>). No entanto segundo o estudo de Rupenthal *et al.* o quitosano demonstrou não sofrer grandes alterações nem adicionar grandes vantagens a este nível (Rupenthal, Green, & Alany, 2011; Bernkop-schnürch & Dünnhaupt, 2012).

**Tabela 2: Análise dos estudos realizados por Cheng *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2006 sobre hidrogéis termo e pH sensíveis à base de quitosano (Adaptado de Wu *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2014).**

| <b>Autor</b>                     | <b>Sistema em estudo</b>   | <b>Sistemas comparativos</b> | <b>Fármaco</b>       | <b>Conclusão</b>   |
|----------------------------------|--|------------------------------|----------------------|--|
| <b>Cheng <i>et al.</i>, 2014</b> | <b>Hidrogel termosensível injetável de quitosano /gelatina/fosfato de glicerol</b> |                              | <b>Latanoprost</b>   | <b>Diminuição da PIO eficaz num prazo de 8 dias, permitindo uma manutenção destes valores durante 31 dias</b>  |
| <b>Wu <i>et al.</i>, 2006</b>    | <b>Hidrogel termo e pH sensível com base num derivado de quitosano HTCC/GP</b>     | <b>Hidrogel de CS/GP</b>     | <b>Doxirrubicina</b> | <b>Solução estável a temperaturas perto da temperatura ambiente, apresentando transição de fase aos 37°C; Obtenção de um perfil de libertação controlada quando o pH se aproxima da neutralidade</b> |

A maioria dos estudos envolvendo soluções de quitosano utiliza soluções com concentrações na ordem dos 0.5 - 5 %. Embora em geral o quitosano usado para esse fim tenha peso molecular superior a 70±100 kDa, outros tipos de quitosano que podem diferir no seu peso molecular, sais e grau de desacetilação (usualmente mais de 60% devido à variação da solubilidade versus grau de desacetilação) podem ser usados (Sa, 2003).

As características das soluções de quitosano tem sido estudadas tendo em vista comportamentos pseudoplásticos, viscoelásticos assim como comportamentos reológicos e de mucoadesão. Estas propriedades podem ser ajustadas procedendo à alteração tanto do peso molecular como da concentração deste polímero e/ou à incorporação de outros polímeros que apresentem propriedades hidrófilas e assim interajam com o polímero de quitosano (Sa, 2003).

Alguns estudos confirmaram as propriedades biodesivas do quitosano na superfície ocular (Tabela 3).

**Tabela 3: Análise dos estudos realizados por Felt *et al.*, Colo *et al.* e Cao *et al.* sobre soluções à base de quitosano (Adaptado de Felt, Gurny, Buri, & Baeyens, 2001; Colo, Zambito, Burgalassi, Nardini, & Saettone, 2004; Cao, Zhang, Shen, & Cheng, 2007).**

| Autor               | Felt <i>et al.</i> , 2001  | Colo <i>et al.</i> , 2004  | Cao <i>et al.</i> , 2007  |
|---------------------|--|--|---|
| Sistema em estudo   | <p>Solução de quitosano contendo tobramicina</p> <p>Solução de quitosano contendo Ofloxacina</p>             | <p>Soluções de ofloxacina contendo derivados de quitosano (cloridrato de quitosano (CS-HCl) e N-carboximetilquitosano (CMCS))</p>  | <p>Solução de poli (N-isopropilacrilamida) - quitosano (PNIPAAm-CS) contendo maleato de timolol</p>   |
| Sistema comparativo | <p>Solução comercial de Tobramicina</p> <p>Solução comercial de Ofloxacina</p>                               | <p>Solução comercial de ofloxacina</p> <p>Solução de ofloxacina contendo álcool polivinílico</p>   | <p>Solução comercial de maleato de timolo</p>   |
| Fármaco             | <p>Tobramicina</p> <p>Ofloxacina</p>   | <p>Ofloxacina</p>  | <p>maleato de timolo</p>  |
| Conclusão           | <p>Aumento significativo do tempo de contacto do fármaco com a córnea pelas soluções contendo quitosano.</p> | <p>As soluções de ofloxacina contendo CS-HCL permitiram um aumento da penetração do fármaco nos tecidos da córnea enquanto a solução de ofloxacina contendo CMCS aumentaram a retenção do fármaco no espaço pré-corneal.</p> | <p>A solução de (PNIPAAm-CS) contendo Maleato de Timolol demonstrou uma maior biodisponibilidade do fármaco bem como uma maior eficácia de utilização do mesmo.</p> |

Estudos de Felt *et al.* (Tabela 3) pretendiam comprovar que o quitosano aumentava o tempo de retenção pré-corneal dos fármacos. O estudo teve como modelo coelhos. Utilizando cintilografia gama, procedeu-se à marcação radioativa tanto da solução de quitosano contendo tobramicina e ofloxacina, como dos fármacos sozinhos. Ambos foram aplicados na córnea do coelho, sendo o tempo de retenção pré-corneal avaliado pela leitura da radioactividade. Os resultados do estudo comprovaram que a associação do quitosano ao fármaco aumentou em 3 vezes a sua permanência no espaço pré-corneal. Foi ainda possível comprovar que a formulação com quitosano permitiu a permanência de 25 - 50% dos compostos na córnea enquanto a solução comercial se concentrou no ducto-lacrimal (Felt *et al.*, 2001; Sa, 2003).

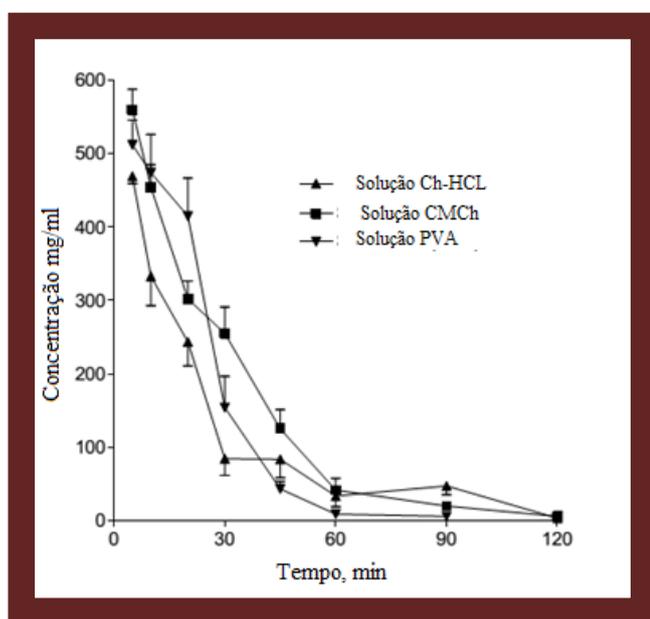
Segundo este estudo foi ainda possível concluir que os resultados são semelhantes, independentemente da concentração ou peso molecular do quitosano utilizado, (0,5 - 1,5% e 0,5 - 1,5% respetivamente). Tal levou os autores a sugerir que o melhor desempenho, em termos de tempo de permanência e retenção do quitosano pode ter por base um mecanismo de bioadesividade saturável, i.e. o carácter bioadesivo do quitosano não é diretamente proporcional à sua concentração, demonstrando assim, ser suficiente uma solução de quitosano que apresente uma baixa concentração e um baixo peso molecular para obter um bom resultado (Felt *et al.*, 2001; Sa, 2003).

Felt *et al.* demonstraram que a administração conjunta de quitosano e ofloxacina num colírio aumenta a biodisponibilidade dos fármacos bem como o tempo de permanência destes no fluido lacrimal, devido à sua viscosidade, sendo comprovada a sua eficácia no tratamento de infeções oculares externas (Felt *et al.*, 2001).

Colo *et al.* (Tabela 3), estudaram de que forma a utilização conjunta do quitosano com um desses fármacos (ofloxacina) permitiria um transporte efetivo desse antibiótico a nível transcorneano para melhorar o tratamento tópico de infeções oculares internas (Felt *et al.*, 2001; Colo *et al.*, 2004). Estes autores demonstraram que a inclusão do derivado de quitosano CS-HCL numa solução de ofloxacina permitiu um aumento da permeabilidade da córnea, que se traduziu num aumento da taxa de penetração do fármaco, o que foi atribuído pelos autores ao carácter catiónico do composto. Já as soluções de ofloxacina contendo CMCS não apresentaram resultados promissores quanto à penetração do fármaco na córnea, dado que este derivado é um polianião, mas permitiram um aumento da retenção do fármaco no espaço pré-corneal. Os autores atribuíram tais resultados ao seu carácter mucoadesivo do polímero e ao facto do mesmo

conduzir a um aumento da viscosidade da solução (Colo *et al.*, 2004; Severino, Vasconcelos, & Figueiredo, 2007).

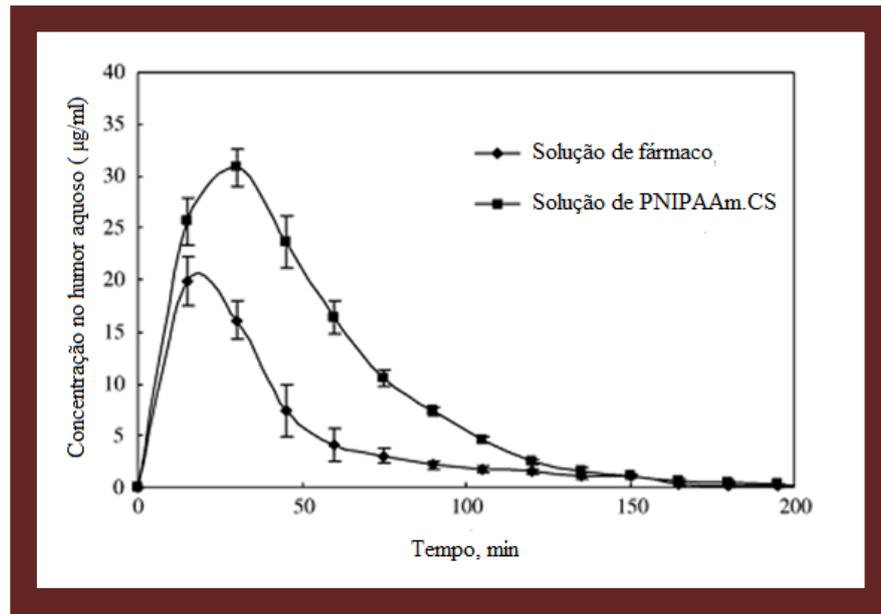
A cinética de eliminação do fármaco do fluido lacrimal (figura 8) e os perfis de concentração da ofloxacina no humor aquoso versus tempo foram estimados por um modelo farmacocinético. Este modelo tinha como variáveis a constante de eliminação precorneal do fármaco, a absorção do fármaco e a passagem do fármaco da córnea para o humor aquoso, sendo estas variáveis traduzidas num valor que correspondia ao T<sub>max</sub> (Tempo necessário para atingir a concentração máxima de fármaco na córnea após aplicação tópica do mesmo) (Colo *et al.*, 2004).



**Figura 8: Cinética de libertação da ofloxacina para os fluidos lacrimais após administração (Adaptado de Colo *et al.*, 2004).**

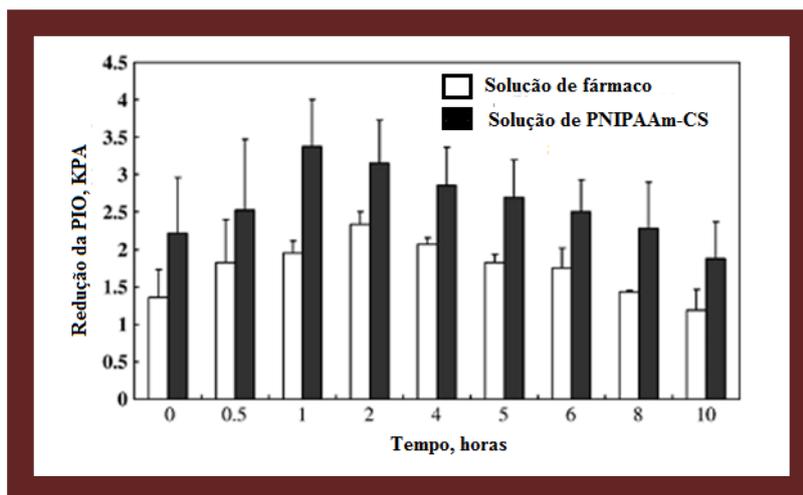
Cao *et al.* (Tabela 3) investigaram a utilização de poli (N-isopropilacrilamida)-quitosano (PNIPAAm-CS), tendo por base a sua capacidade de formar geles *in situ* e a sua termosensibilidade, sendo que a sua LCST de 32°C, esta aproxima-se bastante da temperatura da superfície ocular (aproximadamente 34°C) (Cao *et al.*, 2007).

A poli (N-isopropilacrilamida)-quitosano (PNIPAAm-CS), solução formadora de gel foi avaliada pelo seu caráter termosensível em comparação com uma solução convencional de maleato de timolol, medindo-se a capacidade que apresentavam na redução da PIO durante um período de 12 horas, como se pode observar na (Figura 9) (Cao *et al.*, 2007).



**Figura 9:** Concentração do maleato de timolol no humor aquoso após administração do mesmo na forma da solução comercial do fármaco e na forma de solução de PNIPAAm-CS (Adaptado de Cao *et al.*, 2007).

Verificou-se que a solução de PNIPAAm-CS contendo maleato de timolol apresentou uma maior atividade na redução da PIO, quando comparada com a solução comercial de maleato de timolol (Figura 10) (Cao *et al.*, 2007).



**Figura 10:** Comparação do efeito do maleato de timolol na redução da PIO em solução convencional e em solução de PNIPAAm-CS (Adaptado de Cao *et al.*, 2007).

Tais dados sugerem que efetivamente a PNIPAAm-CS induz um aumento de eficácia do fármaco em estudo, tanto na sua biodisponibilidade como nas suas características farmacocinéticas, uma vez que a PNIPAAm-CS é um biopolímero policatiónico que permite uma interação com a carga negativa da mucina e das células da córnea a pH fisiológico (Cao *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos demonstraram não só um aumento da biodisponibilidade do fármaco como também uma maior eficácia deste para o fim a que se destina (Cao *et al.*, 2007).

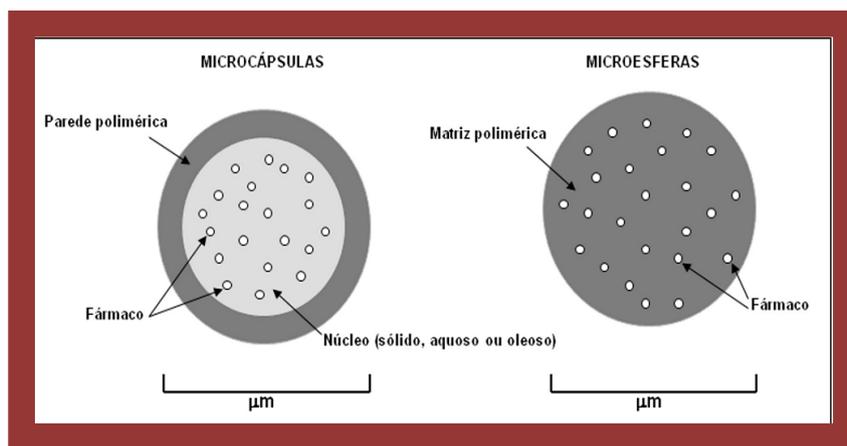
A utilidade das soluções de quitosano vão para além da libertação controlada de fármacos, este polímero mostrou-se bastante útil aquando utilizado com lagrima artificial na patologia do olho seco (Sa, 2003; de la Fuente *et al.*, 2010). Constitui uma boa opção como viscosante neste tipo de produtos e demonstra uma excelente tolerância após aplicação tópica, propriedades bioadesivas, hidrofiliabilidade e boa disseminação ao longo de toda a córnea (Ludwig, 2005).

Estes estudos vieram demonstrar que as vantagens da utilização do quitosano advêm do facto de este permitir uma manipulação fácil, administração reprodutível e aumento do tempo de retenção dos fármacos, bem como proporcionar um maior conforto para o utilizador quando comparado com hidrogéis convencionais (Sa, 2003).

O quitosano apresenta ainda propriedades antibacterianas o que contribui para prevenir/combater algumas infeções secundárias associadas a doenças e patologias a nível ocular (Felt *et al.*, 2001; Sa, 2003).

### 5.3.2 Micropartículas

Uma outra forma de apresentação do quitosano e seus derivados que tem suscitado interesse para o tratamento de doenças oculares são as micropartículas (microesferas, microcápsulas e outras) (Figura 11) (Saltão & Veiga, 2001).



**Figura 11: Representação de micropartículas (microcápsula e microesfera) (Adaptado de Melo *et al.*, 2012).**

Um estudo realizado por Campos *et al.*, em que foi testada em coelhos a utilização de microesferas contendo ciclosporina, verificou-se um aumento da distribuição e exposição do fármaco a nível do tecido ocular externo sem pôr em causa o tecido ocular interno (Campos *et al.*, 2001; Ludwig, 2005).

Quando comparada a utilização de uma solução aquosa com a de microesferas de quitosano, pôde concluir-se que estas conseguem produzir uma concentração mais elevada de fármaco na córnea, conjuntiva e mesmo a nível sanguíneo, levando a uma maior retenção do fármaco e consequente biodisponibilidade do mesmo (Campos *et al.*, 2001; Ludwig, 2005).

Dependendo do tamanho das partículas estas podem penetrar no epitélio ocular por via intracelular ou por via transcelular, bem como os diferentes epitélios apresentam diferentes afinidades o que pode explicar a maior retenção de nanopartículas de quitosano na conjuntiva quando comparado com a córnea (Ludwig, 2005).

Muitos dos derivados de quitosano sintetizados tiveram entre outros objetivos aumentar a penetração de fármacos e peptídeos através da mucosa conseguindo uma

melhor penetração não só através das células epiteliais mas também por via intracelular (Ludwig, 2005).

A microencapsulação de fármacos também permite adaptar o sistema de liberação controlada de fármacos às necessidades pretendidas. Através da modificação da dose do fármaco encapsulado e das características do material de encapsulação, que afetam a cinética de liberação, é possível a aproximação a um perfil de liberação prolongada desejado (Sinha *et al.*, 2004).

Estas estruturas permitem ainda a proteção do fármaco da degradação por parte de agentes externos (Sinha *et al.*, 2004).

Sabe-se que a biodisponibilidade do aciclovir aquando administrado pelos sistemas convencionais é bastante baixa, sendo a sua aplicação feita de 4 em 4 horas o que constitui uma barreira à adesão à terapêutica (Tabela 4). Genta *et al.* (Tabela 6) estudaram o potencial de um sistema de liberação prolongada constituído por microesferas de quitosano carregadas com aciclovir para aumentar a biodisponibilidade do fármaco. As esferas foram preparadas por uma técnica de emulsificação (Genta *et al.*, 1997).

**Tabela 4: Descrição do comportamento farmacocinético do aciclovir no humor aquoso após administração única de microesferas de quitosano contendo aciclovir e uma suspensão comercial de aciclovir no olho de coelho (Adaptado de Genta *et al.*, 1997).**

|  | Microesferas | Suspensão |
|--|--------------|-----------|
| Primeiro tempo em que o fármaco foi detetado (min)   | 15           | 30        |
| Período de tempo durante o qual o fármaco foi detetável (min)                                | 240          | 120       |
| Concentração máxima do fármaco ( $\mu\text{g/ml}$ )  | 0,862        | 0,350     |
| Tempo em que se atingiu a concentração máxima de fármaco (min)                               | 240          | 120       |
| Área sob a curva de concentração de fármaco no tempo de 0 a 240 min ( $\mu\text{g/ml.min}$ ) | 172,19       | 39,37     |

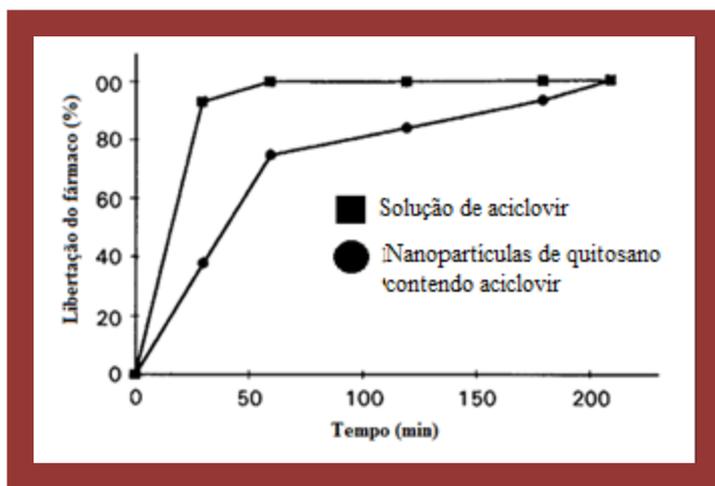
**Tabela 5: Comparação das concentrações de aciclovir no humor aquoso após aplicações isoladas tanto do sistema em estudo como do sistema comparativo (suspensão do fármaco) (Genta *et al.*, 1997).**

| Tempo (min) | Microesferas (µg/ml) | Suspensão (µg/ml) |
|-------------|----------------------|-------------------|
| 15          | 0.7067±0.30          | -                 |
| 30          | 0.2288±0.10          | 0.130±0.04        |
| 60          | 0.8422±0.20          | 0.110±0.05        |
| 120         | 0.7430±0.12          | 0.350±0.03        |
| 240         | 0.8620±0.25          | -                 |
| 360         | -                    | -                 |

Os dados da tabela acima (Tabela 5) demonstram que a aplicação do aciclovir em microesferas de quitosano leva à deteção de uma concentração significativa de fármaco no humor aquoso 15 min após a sua administração, enquanto que quando administrado através da suspensão comercial do fármaco, este só é detetado 30 min após a sua aplicação. Para além disso é possível ainda verificar que o tempo de permanência de níveis eficazes de fármaco no humor aquoso é de 240 min aquando o fármaco é veiculado em microesferas de quitosano, enquanto que diminui para apenas 120 min aquando administrado por via da suspensão comercial (Genta *et al.*, 1997).

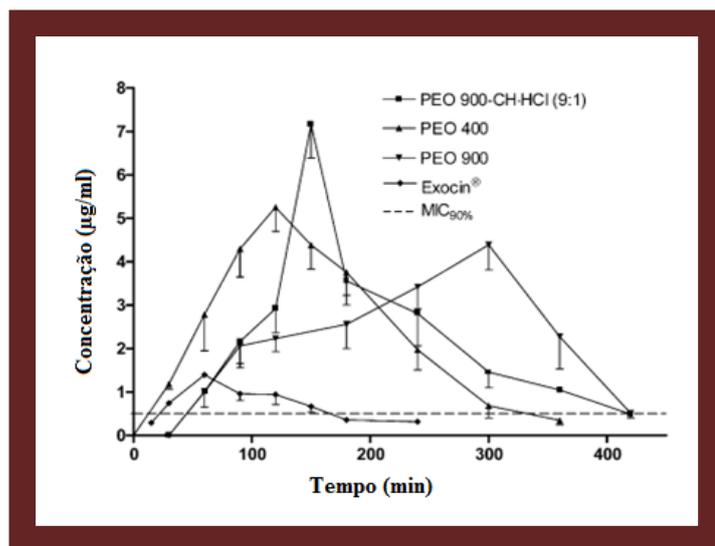
Em resumo, Genta *et al.* demonstraram que a inclusão de fármacos (aciclovir) em microesferas de quitosano aumentou a biodisponibilidade desse mesmo fármaco, conduzindo a melhores resultados que o sistema comparativo constituído por uma suspensão do fármaco. Tal foi atribuído ao carácter mucoadesivo do quitosano (Genta *et al.*, 1997; Sa, 2003).

Ao longo deste estudo demonstrou-se ainda que a eficácia do sistema em estudo se devia não só ao carácter mucoadesivo do quitosano mas também à capacidade que este polímero tem para controlar a libertação dos fármacos. Na (Figura 12) demonstra-se que as microesferas de quitosano conduzem a um maior tempo de libertação do fármaco, permitindo obtenção de maiores concentrações de aciclovir a nível ocular (Genta *et al.*, 1997).



**Figura 12:** Perfis de libertação *in vitro* de uma solução comercial de aciclovir e de aciclovir veiculado por meio de nanopartículas de quitosano (Adaptado de Genta *et al.*, 1997).

Num estudo de Di Colo *et al.* (Tabela 6) em que se procedeu à encapsulação de microesferas de quitosano em PEO (poli(óxido de etileno)) contendo ofloxacina, observou-se um aumento da biodisponibilidade do fármaco tanto nas microcápsulas de quitosano incorporadas em PEO como no fármaco veiculado pelo gel PEO, quando comparado com a solução comercial. No entanto, não se obteve qualquer vantagem a nível da libertação controlada do fármaco aquando da incorporação das microesferas em PEO. Observou-se um aumento significativo do T<sub>max</sub> (Intervalo de tempo necessário para que se atinja a concentração máxima do fármaco no humor aquoso) do fármaco utilizado no humor aquoso, numa perspetiva concentração vs tempo, nas formulações que continham quitosano, atribuindo-se tal resultado ao efeito que o quitosano induziu na melhoria da permeabilidade da córnea (Colo, Zambito, Burgalassi, Serafini, & Saettone, 2002; Lucia, 2014).



**Figura 13:** Perfis de concentração de ofloxacina no humor aquoso de coelho após administração tópica do fármaco nas mesmas concentrações mas por diferentes veículos (Adaptado de Colo *et al.*, 2002).

Calderon *et al.* (Tabela 6) comparou o desempenho de microesferas e nanopartículas de quitosano reticuladas com tripolifosfato (TTP), contendo aciclovir. As microsferas de quitosano apresentam vantagens relativamente às nanopartículas do mesmo polímero originando um melhor perfil de difusão bem como maior eficácia de dispersão do fármaco na matriz. Dado que o conteúdo de fármaco presente é maior nas micropartículas do que nas nanopartículas e uma vez que ambas demonstraram um perfil de libertação ao nível dos 75%, as micropartículas tornam-se mais vantajosas. (Calderón *et al.*, 2013).

No entanto quando os perfis de libertação controlada do aciclovir foram normalizados em percentagem, não se observam diferenças significativas para os dois casos (Calderón *et al.*, 2013).

Calderon constatou também que as nanopartículas originam danos *in vivo*, ao nível dos tecidos oculares, provocando irritação local, pelo que não são a melhor escolha para a veiculação do fármaco em questão (Calderón *et al.*, 2013).

**Tabela 6: Análise de estudos realizados por Genta *et al.*, Colo *et al.* e Calderón *et al.* sobre sistemas de microencapsulação à base de quitosano (Adaptado de Genta *et al.*, 1997; Colo *et al.*, 2002; Calderón *et al.*, 2013).**

| <b>Autor</b>                        | <b>Sistema em estudo</b>   | <b>Sistemas comparativos</b>   | <b>Fármaco</b>    | <b>Conclusão</b>  |
|-------------------------------------|--|--|-------------------|---|
| <b>Genta <i>et al.</i>, 1997</b>    | <b>Microesferas de quitosano contendo fármaco</b>  | <b>Suspensão de fármaco</b>  | <b>Aciclovir</b>  | <b>Aumento da biodisponibilidade e da AUC do fármaco pelas microesferas de quitosano contendo aciclovir</b>   |
| <b>Colo <i>et al.</i>, 2002</b>     | <b>Microesferas de quitosano incorporadas em poli(óxido de etileno) (PEO)</b>            | <b>Gel de Pli(óxido de etileno) com fármaco</b><br><br><b>Solução comercial de fármaco</b> | <b>Ofloxacina</b> | <b>Aumento da biodisponibilidade do fármaco tanto no caso das microcápsulas de quitosano incorporadas em PEO como no gel de PEO face à solução comercial.</b><br><br><b>Aumento do valor do T<sub>max</sub> aquando da utilização do quitosano.</b> |
| <b>Calderón <i>et al.</i>, 2013</b> | <b>Microesferas de quitosano reticuladas com tripolifosfato (TTP) contendo aciclovir</b> | <b>Nanopaculas de quitosano reticuladas com TTP contendo aciclovir</b>                     | <b>Aciclovir</b>  | <b>As microesferas de quitosano apresentaram um melhor perfil de difusão em 24 horas.</b><br><br><b>A incorporação de aciclovir em microsferas de quitosano revelou maior eficiência relativamente à dispersão do fármaco na matriz</b>             |

Existem também estudos direcionados para a utilização de micropartículas de quitosano para veiculação de proteínas à retina. Na (Tabela 7) refere-se, a título de exemplo, e de uma forma esquemática, um desses estudos.

**Tabela 7: Análise de estudos realizados por Wassner *et al.* sobre sistemas de microencapsulação à base de quitosano (Adaptado de Wassmer, Rafat, Gin, Baker, & Tsilfidis, 2013).**

| <b>Autor</b>                       | <b>Sistema em estudo</b>  | <b>Proteína</b>  | <b>Conclusão</b>   |
|------------------------------------|---|--|--|
| <b>Wassmer <i>et al.</i>, 2013</b> | <b>Micropartículas de quitosano contendo proteínas, para sistemas injetáveis (MPCS)</b> | <b>BSA (albumina de soro bovino)<br/><br/>TAT-EGFP (Péptido ativador da transcrição marcado com proteína verde fluorescente)</b> | <b>Maior eficácia das micropartículas de quitosano na veiculação das proteínas.<br/><br/>Altas concentrações de quitosano podem induzir efeitos tóxicos.</b> |

Segundo Wassmer *et al.*, (Tabela 7) as micropartículas à base de quitosano são uma forma viável de conseguir uma libertação controlada de proteínas a nível da retina quando utilizadas num sistema injetável. Este sistema revelou uma eficácia superior quando comparado com as micropartículas constituídas por polietilenoglicol-ácido poliláctico (PEG-PLA) em termos de capacidade de carregamento do fármaco e de perfil de libertação controlada das proteínas. Este estudo revelou no entanto que concentrações elevadas de quitosano podem ser tóxicas, pelo que há que ter bastante atenção neste sentido (Wassmer *et al.*, 2013).

Durante o seu estudo, Wassmer *et al.* mediram a função da retina por electroretinograma (ERG), de modo a perceber de que modo reagia a retina à injeção das micropartículas à base de quitosano em diferentes concentrações. Os resultados foram recolhidos ao fim de 2, 4, 6 e 8 semanas tendo sido medidas dois tipos de ondas, umas associadas à ativação de fotorreceptores e outras que indicam a saúde global da retina. (Wassmer *et al.*, 2013).

Observou-se que concentrações elevadas de MPCS podem ser prejudiciais para a retina, evidenciando-se uma relação entre as altas concentrações de MPCS administradas e a diminuição do sinal do ERG. Concluiu-se também que à medida que as MPCS se vão degradando há uma recuperação da função da retina (Wassmer *et al.*, 2013).

A quantidade de estudos realizados sobre o uso de micropartículas de quitosano com fim a aplicação oftálmica é bastante reduzido, comparado com o caso das soluções. Tal é justificado pelo facto de na maior parte dos casos se produzirem partículas com

um tamanho relativamente grande, que têm uma aceitabilidade e tolerância limitada, dado interferirem com a visão (Sa, 2003).

A utilização do quitosano tem então sido direcionada para os sistemas coloidais (menos de 1  $\mu\text{m}$ ) que irão ser explorados de seguida (Sa, 2003).

### 5.3.3 Sistemas coloidais

Nos últimos anos a investigação tem evoluído no sentido de estudar novos sistemas de liberação controlada de fármacos a nível ocular, tais como os sistemas coloidais nos quais estão inseridos as nanocápsulas e nanopartículas, lipossomas, ciclodextrinas, dendrímeros entre outros (Sa, 2003; Sahoo *et al.*, 2008).

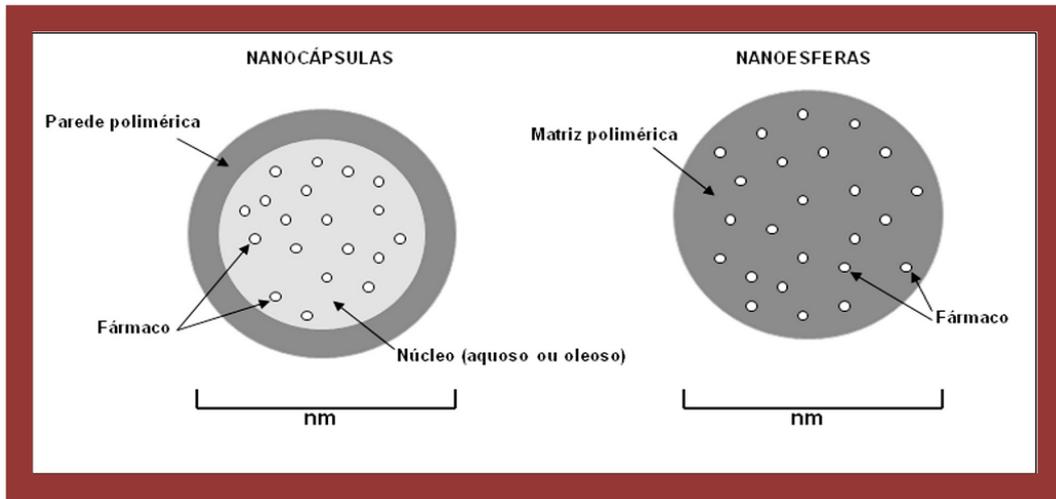
A utilização de sistemas coloidais tem como principal objetivo aumentar o tempo de retenção dos fármacos aplicados topicamente a nível ocular (Sa, 2003).

Numa perspetiva de melhoramento das propriedades dessas formulações surgiu uma segunda geração de sistemas coloidais de liberação controlada de fármacos a nível ocular, baseada no revestimento destes sistemas por polímeros mucoadesivos (Sa, 2003).

A utilização do quitosano como revestimento de nanopartículas tem por objetivo associar as vantagens inerentes a este tipo de estruturas com as propriedades de mucoadesão e de aumento da permeabilidade apresentadas pelo quitosano (Sa, 2003).

Este revestimento confere aos sistemas uma grande versatilidade, podendo veicular tanto composto hidrofílicos como hidrofóbicos, ao variar a composição do núcleo e a técnica de produção. Proporciona ainda a incorporação de fármacos lipofílicos (Sa, 2003).

Estes sistemas podem incluir um núcleo sólido (nanopartícula) constituído por um polímero biodegradável ou um núcleo oleoso ou aquoso (Figura 14) (Sa, 2003; de la Fuente *et al.*, 2010).



**Figura 14: Representação de nanopartículas (nanocápsula e nanoesfera) (Adaptado de Melo *et al.*, 2012).**

Vários estudos foram feitos no sentido de comprovar a eficácia destes sistemas ao nível da sua valência de libertação controlada de fármacos em aplicação ocular (Sa, 2003; Diebold, Jarrín, *et al.*, 2007; de la Fuente *et al.*, 2010).

A (tabela 8) refere-se de uma forma sistematizada a alguns deles, envolvendo nanopartículas e nanocápsulas.

**Tabela 8: Análise do estudo realizado por Calvo *et al.*, Campo *et al.*, Motwani *et al.* e Nagarwal *et al* sobre sistemas coloidais á base de quitosano (Adaptado de Calvo, Vila-Jato, & Alonso, 1997; Campos *et al.*, 2001; Motwani *et al.*, 2008; Nagarwal, Singh, Kant, Maiti, & Pandit, 2011).**

| Autor                 | Calvo <i>et al.</i> , 1997  | Campos <i>et al.</i> , 2001   | Motwani <i>et al.</i> , 2007  | Nagarwal <i>et al.</i> , 2011  |
|-----------------------|---|---|---|--|
| Sistema em estudo     | Nanopartículas de poli-ε-caprolactona (PECL) revestidas por quitosano                               | Nanocápsulas de quitosano carregadas com ciclosporina   | Nanopartículas de alginato de sódio e quitosano   | Nanopartículas de quitosano  |
| Sistemas comparativos | Nanopartículas de PECL<br>Nanopartículas de PECL revestidas por poli-L-lisina (PLL)                 | Suspensão de ciclosporina numa solução de quitosano<br>Suspensão de ciclosporina em água  | Formulação comercial do fármaco   | Solução de 5-fluouracilo   |
| Fármaco               | Indometacina  | Ciclosporina  | Gatifloxacina   | 5-fluouracilo (5-FU)   |
| Conclusão             | Nanopartículas de PECL revestidas por quitosano conferiram uma maior biodisponibilidade do fármaco. | Aumento da concentração de ciclosporina na córnea (≈ 2-10 vezes) quando veiculada pelo sistema em estudo face aos sistemas comparativos.<br>Diminuição da concentração de ciclosporina ao nível intra-ocular e sistémico quando veiculada pelas nanocápsulas de quitosano.. | Libertação controlada da gatifloxacina por parte das nanopartículas de alginato de sódio e quitosano de forma sustentada em 24 horas. | Quando comparada com a solução de 5-fluouracilo as nanopartículas de quitosano conduzem a uma maior concentração do fármaco no humor aquoso, não exibindo qualquer tipo de inflamação ou toxicidade. |

O estudo de Calvo *et al.* (Tabela 8) tinha por objetivo averiguar o potencial que a PECL apresenta na libertação controlada de fármacos e as vantagens de um revestimento catiónico, que como é sabido apresenta grandes vantagens a nível da aplicação ocular (Calvo *et al.*, 1997).

Observou-se que aos 30 e aos 60 min após a aplicação as concentrações de indometacina na córnea e no humor aquoso eram 4 a 6 vezes superiores no caso das nanopartículas revestidas por quitosano relativamente às obtidas pela solução comercial do fármaco (Calvo *et al.*, 1997; Dodane & Vilivalam, 1998; Diebold, Jaarín, *et al.*, 2007).

A biodisponibilidade ocular da indometacina foi medida sob parâmetros farmacocinéticos como: área sobre a curva (AUC), Concentração máxima de indometacina (C<sub>max</sub>) e o momento em que se atinge o C<sub>max</sub> (T<sub>max</sub>). Foi visto que houve um aumento da biodisponibilidade da indometacina quando veicula em nanocápsulas revestidas por quitosano, sendo esta biodisponibilidade refletida através do aumento em oito vezes o valor da AUC e de sete vezes o valor do C<sub>max</sub> quando a indometacina é veiculada em nanocápsulas CS-revestidas (Calvo *et al.*, 1997).

Assim sendo, Calvo *et al.* concluíram que não é apenas o carácter catiónico por si só que leva ao aumento da biodisponibilidade e a melhores resultados, mas sim todo o conjunto de características que o quitosano apresenta, tendo em conta que ambos os revestimentos (PLL e CS) conferem uma carga positiva às nanopartículas (Calvo *et al.*, 1997; Dodane & Vilivalam, 1998; Sa, 2003).

Mais recentemente outros autores dirigiram as suas investigações para esta mesma temática, investigando a eficácia do quitosano no revestimento de nanopartículas com vista à libertação controlada de fármacos (Campos *et al.*, 2001; Sa, 2003; Diebold, Jaarín, *et al.*, 2007).

Com a finalidade de compreender melhor o efeito do revestimento das nanopartículas com um polímero como o quitosano, Campos *et al.*, (Tabela 8) dirigiram um estudo sobre a veiculação da ciclosporina utilizando este tipo de sistema. Determinaram a concentração da ciclosporina em várias zonas do globo ocular por forma a compararem os vários sistemas utilizados no estudo (Campos *et al.*, 2001).

Na córnea (Figura 15) e na conjuntiva (figura 16) observou-se que, utilizando nanocápsulas de quitosano carregadas com ciclosporina ocorre um aumento significativo na concentração do fármaco que é 2 a 6 vezes superior à observada após aplicação da suspensão de ciclosporina. É de notar que todas as formulações, tanto na

cornea como na conjuntiva, atingiram o seu máximo 2 horas após sa administração. No entanto apenas as nanocápsulas de quitosano carregadas com ciclosporina mantiveram níveis terapêuticos com o decorrer do tempo, tendo os outros sistemas atingido níveis sub-terapêuticos mais precocemente. Os autores referem que tal se deve à interação entre as cargas positivas do quitosano e as cargas negativas da mucina (Campos *et al.*, 2001).

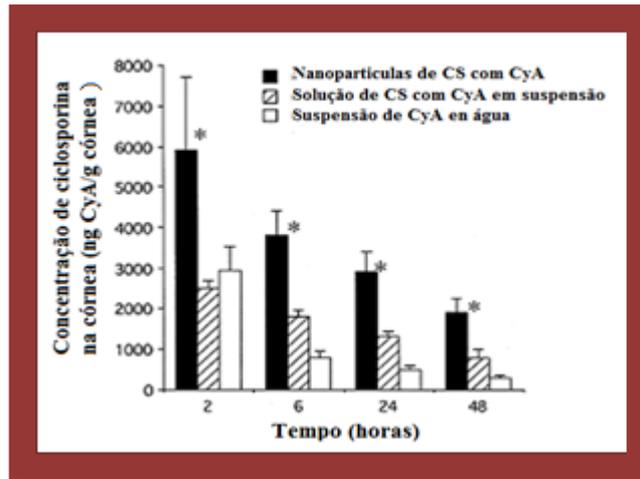


Figura 15: Concentração de ciclosporina na córnea após aplicação tópica em olho de coelho do fármaco veiculado por nanopartículas de quitosano, solução de quitosano e suspensão do fármaco em água (Adaptado de Campos *et al.*, 2001).

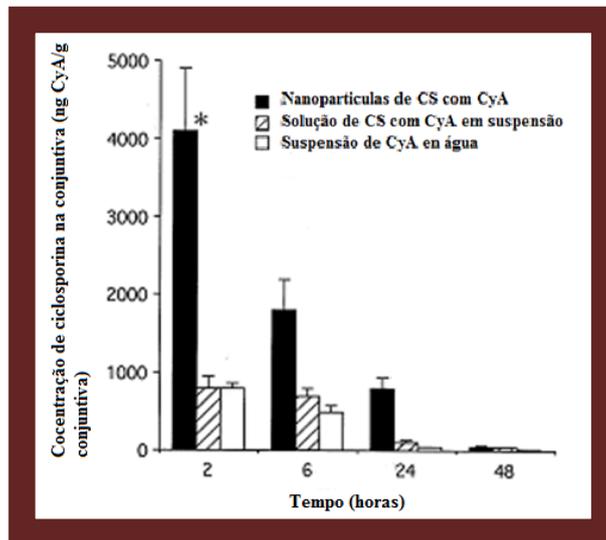
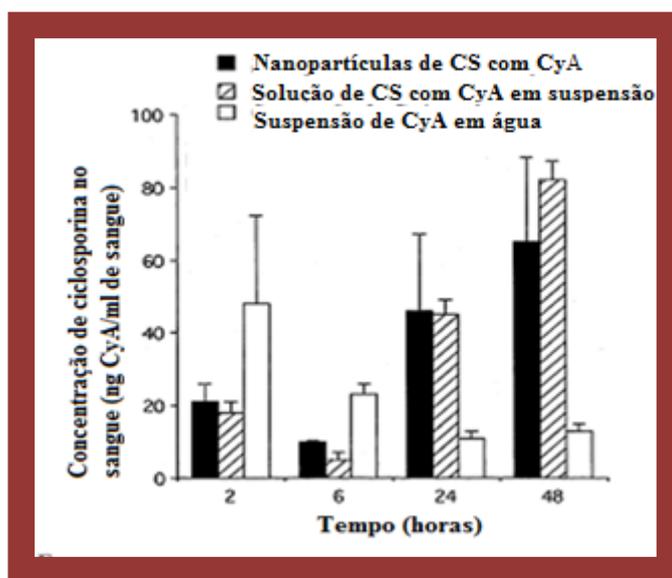


Figura 16: Concentração de ciclosporina na conjuntiva após aplicação tópica em olho de coelho do fármaco veiculado por nanopartículas de quitosano, solução de quitosano e suspensão do fármaco em água (Adaptado de Campos *et al.*, 2001).

É de ressaltar ainda que os níveis de ciclosporina atingidos na córnea são significativamente superiores aos que se atingem na conjuntiva. Segundo estes autores, tal pode estar relacionado com um de dois motivos:

- 1- Absorção das nanocápsulas de quitosano carregadas com ciclosporina pelas células apresentadoras de antígeno (macrófagos e células de langerhans)
- 2- Difusão da ciclosporina para o sangue e vasos linfáticos subjacentes (Campos *et al.*, 2001).

Tais suposições podem ser esclarecidas pela observação da (Figura 17) que nos apresenta concentração sanguínea de indometacina para as três formulações utilizadas. Os níveis observados demonstraram-se abaixo dos níveis tóxicos (300 ng/ml). Assim conclui-se que a libertação prolongada do fármaco foi feita de forma correcta sem acarretar complicações sistémicas ou danificação dos tecidos oculares internos (Campos *et al.*, 2001).



**Figura 17:** Concentração de ciclosporina na córnea após aplicação tópica em olho de coelho do fármaco veiculado por nanopartículas de quitosano, solução de quitosano e suspensão do fármaco em água (Adaptado de Campos *et al.*, 2001).

Campos *et al.* concluíram que as nanocápsulas de quitosano apresentam inúmeras vantagens, sendo de ressaltar que o sistema alvo do estudo permite uma libertação controlada do fármaco a nível ocular sem qualquer consequência para os tecidos vivos no local e sem que haja absorção sistémica e consequentes efeitos

secundários indesejáveis (Dodane & Vilivalam, 1998; Sa, 2003; Campos *et al.*, 2001; Diebold, Jaarín, *et al.*, 2007).

Motwani *et al.* al (Tabela 8) promoveram o estudo da veiculação da gatifloxacina a partir de nanopartículas de alginato de sódio e quitosano e concluíram que as mesmas constituem uma alternativa às gotas oculares comerciais (Motwani *et al.*, 2007).

Nagarwal C. *et al.* (Tabela 8) compararam a veiculação do fármaco 5-fluouracilo contido em nanopartículas de quitosano e numa solução aquosa. Verificaram que as nanopartículas de quitosano levam a uma maior biodisponibilidade do fármaco e relacionaram esse resultado com as propriedades mucoadesivas apresentadas pelo quitosano, que levam a um aumento do tempo de contacto entre o fármaco e a córnea (Nagarwal *et al.*, 2011).

Este estudo demonstra que em condições *in vivo* as nanopartículas de quitosano contendo 5-FU permitiram atingir uma maior concentração do fármaco no humor aquoso em comparação com a solução comercial do fármaco (Figura 18) (Nagarwal *et al.*, 2011).

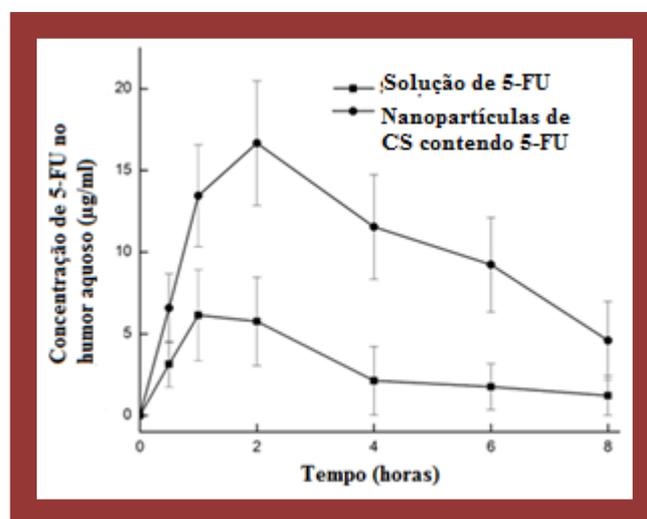


Figura 18: Estudo *in vivo* comparativo da veiculação do 5-Fu em nanopartículas de quitosano e numa solução comercial de 5-FU (Adaptado de Nagarwal *et al.*, 2011).

Foi possível registrar diferentes parâmetros cinéticos que dão conta das diferenças entre os dois sistemas. (Tabela 9) (Nagarwal *et al.*, 2011).

**Tabela 9: Comparação de parâmetros farmacocinéticos atingidos na veiculação de 5-FU por nanopartículas de quitosano e por uma solução comercial do fármaco (Adaptado de Nagarwal *et al.*, 2011).**

|                            | Nanopartículas de quitosano contendo 5-FU               | Solução comercial de 5-FU                              |
|----------------------------|---|--|
| AUC (Área sobre a curva)   | 23.85 ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}$ ) | 84.5 ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}$ ) |
| Cmax (Concentração máxima) | 16.67 mg/ml   | 6.14 mg/ml   |
| Tmax (Tempo máximo)        | 2 h   | 1 h  |

Um outro facto que demonstra a vantagem da veiculação do fármaco por estes sistemas foi a inexistência de qualquer concentração de 5-FU a nível sistémico (Nagarwal *et al.*, 2011).

Face aos resultados obtidos, os autores concluíram que esta é uma abordagem promissora para conseguir uma maior eficácia da terapêutica com 5-FU em células tumorais da superfície ocular (Nagarwal *et al.*, 2011).

Para além das nanoscápsulas e das nanopartículas também os lipossomas associados ao quitosano têm sido alvo de interesse para a veiculação de fármacos a nível ocular (Diebold, Jaarín, *et al.*, 2007).

Os lipossomas são vesículas esféricas formados por um núcleo aquoso revestido por uma dupla camada lipídica. Relativamente à sua estrutura são classificados em unilamelares (UV) ou multilamelares (MLV); relativamente ao tamanho podem ser: vesículas unilamelares pequenos (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas unilamelares gigantes (GUV) (Figura 19). O tamanho dos lipossomas pode ir desde a gama dos 20 nm até a 1  $\mu\text{m}$  (Tabela 10), no entanto para aplicações oftálmicas, apenas tem interesse a utilização de lipossomas com tamanho inferior a 100-300 nm para não perturbar a visão (Mishra, Bagui, Tamboli, & Mitra, 2011).

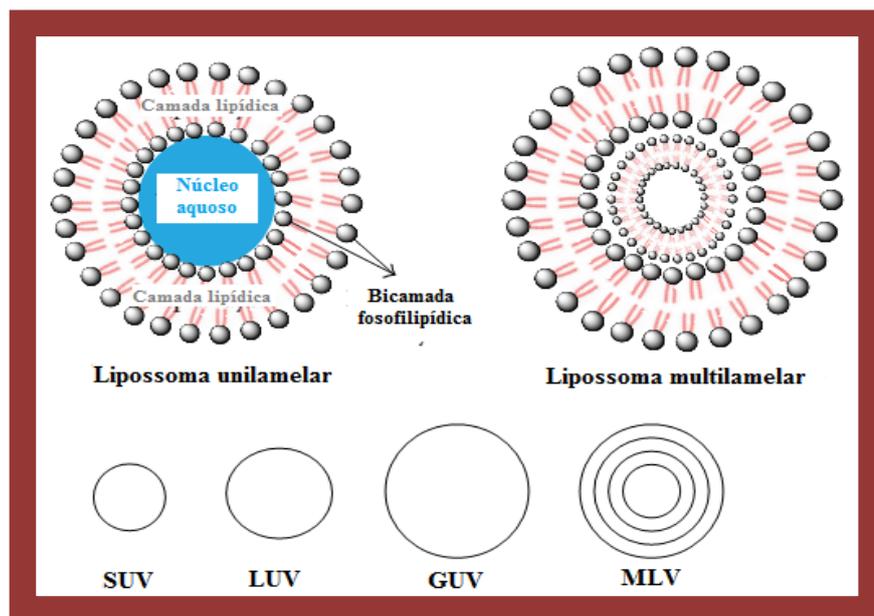


Figura 19: Representação estrutural dos lipossomas e seus diferentes tipos (Adaptado de Mishra, Bagui, Tamboli, & Mitra, 2011).

Tabela 10: Tamanho dos diferentes tipos de lipossomas (Adaptado de Mishra *et al.*, 2011).

| Tipo de lipossoma | Tamanho        |
|-------------------|----------------|
| SUV               | 20 nm a 200 nm |
| LUV               | 200nm a 1µm    |
| MLV               | >0.5 µm        |
| GUV               | >1 µm          |

Apesar dos lipossomas *per si* apresentarem um grande potencial para a liberação de fármacos a nível ocular, foram feitos diversos estudos com o objetivo de entender de que forma o revestimento destas estruturas com o quitosano poderia potenciar as suas características. A (Tabela 11) refere-se a um desses estudos (Diebold, Jaarín, *et al.*, 2007).

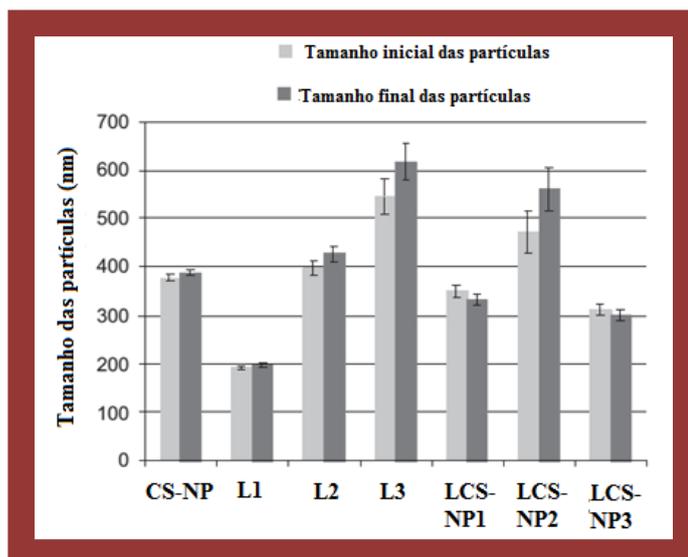
**Tabela 11: Análise do estudo feito por Diebold, Jarrín *et al.* sobre sistemas coloidais à base de quitosano (Adaptado de Diebold, Jarrín, *et al.*, 2007).**

| Autor                                 | Sistema em estudo  | Sistemas comparativos       | Conclusão   |
|---------------------------------------|--|-----------------------------|---|
| Diebold, Jarrín, <i>et al.</i> , 2007 | Nanopartículas de quitosano veiculadas em lipossomas (LCS-NP)) | Nanopartículas de quitosano | LCS-NP apresentaram boa tolerância por parte das células do globo ocular e aceitabilidade superior às nanopartículas de quitosano. Boa resposta por parte do sistema LCS-NP para a liberação controlada de fármacos a nível ocular. |

Diebold *et al.* exploraram um nanossistema que combina o potencial das nanopartículas de quitosano, que têm uma carga positiva, com o de vesículas lipídicas (com carga negativa), que revestem estas partículas e formam o complexo LCS-NP (Diebold, Jarrín, *et al.*, 2007).

Apesar dos sistemas à base de lípidos serem muitas vezes instáveis, a sua biocompatibilidade é regra geral superior à de alguns sistemas à base de polímeros que são considerados muito mais estáveis. No estudo de Diebold *et al.*, os autores procuraram combinar a biocompatibilidade dos sistemas à base de lípidos e a estabilidade dos sistemas à base de polímeros de forma a conjugar as potencialidades dos dois sistemas (Diebold, Jarrín, *et al.*, 2007).

Determinou-se por espectroscopia de correlação de fotões a variação do tamanho das partículas ao longo de 2 horas em fluido lacrimal simulado para averiguar a estabilidade física das partículas (Figura 20) (Diebold, Jarrín, *et al.*, 2007).



**Figura 20:** Estabilidade física de nanopartículas de diferentes tamanhos num fluido lacrimal simulado (CS-NP-nanopartículas de quitosano; L-lipossomas; LCS-NP- nanopartículas de quitosano veiculadas em lipossomas) (Adaptado de Diebold, Jarrín, *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos demonstram que todas as nanopartículas conseguem manter uma elevada estabilidade em contacto com o fluido lacrimal simulado (Diebold, Jarrín, *et al.*, 2007).

O estudo *in vitro* do comportamento celular demonstrou uma boa aceitabilidade por parte das células da conjuntiva relativamente ao sistema LCS-NP, que se mantiveram altamente viáveis. Estudos *in vivo* demonstraram também uma boa penetração dos fármacos ao nível do globo ocular, sem causar qualquer tipo de toxicidade ou alterações morfológicas (Diebold, Jarrín, *et al.*, 2007).

Também as ciclodextrinas têm sido alvo de estudos que têm como finalidade conseguir alcançar uma libertação controlada dos fármacos a nível ocular. A ciclodextrinas (CDs) (Figura 21) são oligossacáridos cíclicos que se caracterizam por apresentarem uma superfície exterior hidrofílica que contém uma cavidade hidrofóbica (interior) com cadeias laterais hidrofóbicas (Bernkop-schnürch & Dünnhaupt, 2012).

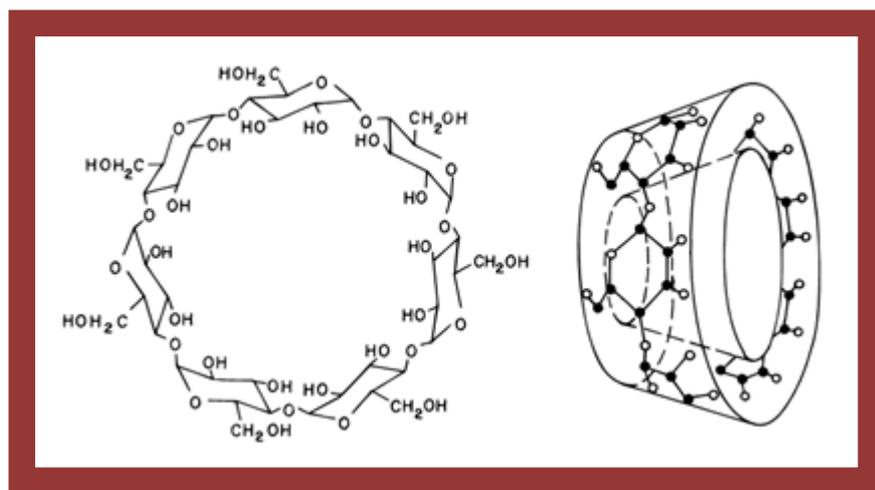


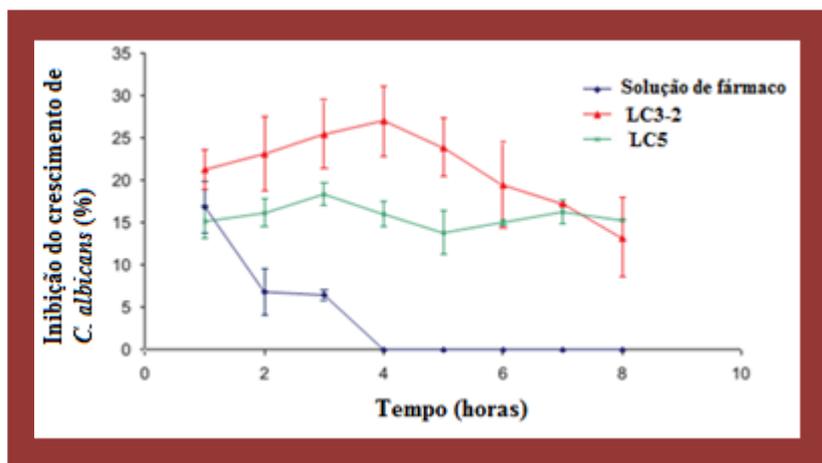
Figura 21: Estrutura de uma  $\beta$ -ciclodextrina (Adaptado de Loftsson & Brewster, 1996).

Num estudo de Mahmoud A. *et al.* utilizou-se um derivado de ciclodextrina que dá pelo nome de  $\beta$  ciclodextrina de sulfobutil éter (CS/ SBE - $\beta$ - CD). Esta derivação da ciclodextrina (composto polianiónico) permite não só uma maior solubilidade em água de fármacos insolúveis em meio aquoso como também a formação de complexos com nanopartículas de quitosano. A (Tabela 12) refere-se a esse estudo (Mahmoud, El-feky, Kamel, & Awad, 2011).

Tabela 12: Análise do estudo realizado por Mauhmoud *et al.* sobre sistemas coloidais à base de quitosano (Adaptado de Mahmoud *et al.*, 2011).

| Autor                        | Sistema em estudo   | Sistemas comparativos        | Farmaco             | Conclusão  |
|------------------------------|---|------------------------------|---------------------|--|
| Mahmoud <i>et al.</i> , 2011 | Nanopartículas de quitosano reticuladas com $\beta$ ciclodextrina de sulfobutil éter (CS/ SBE - $\beta$ - CD) | Solução comercial de fármaco | Nitrato de econazol | Nanopartículas de quitosano reticuladas em (SBE—CD) demonstraram uma boa libertação controlada do fármaco sendo veículo promissor para fármacos de caracter hidrófobo na superfície ocular.. |

Mahmaud *et al.* realizaram o estudo comparativo das nanopartículas em CS/ SBE - $\beta$ - CD com a solução de nitrato de econazol de forma a avaliar o efeito antifúngico que cada um dos sistemas apresentava (Figura 22) (Mahmoud *et al.*, 2011)



**Figura 22:** Inibição do crescimento de *C. albicans* (%) pela solução comercial de nitrato de econazol e dois tipos de nanopartículas de CS/ SBE - $\beta$ - CD contendo o fármaco (Adaptado de Mahmoud *et al.*, 2011).

Os autores concluíram que o nitrato de econazol apresentava um melhor resultado terapêutico quando reticulado em nanopartículas CS/ SBE - $\beta$ - CD do que em solução (Mahmoud *et al.*, 2011).

Foram testados diferentes tipos de partículas: As nanopartículas LC3-2 e LC5 a que se refere a figura, apresentam concentrações de fármaco muito semelhantes. No entanto LC5 apresenta uma capacidade mucoadesiva superior. Ao comparar os dois compostos pode perceber-se que a maior capacidade mucoadesiva de LC5 permite uma liberação mais controlada do fármaco mantendo uma liberação constante ao longo do tempo (Mahmoud *et al.*, 2011).

O estudo de Mahmaud *et al.* concluiu que que as nanopartículas de quitosano reticuladas em CS/ SBE - $\beta$ - CD são bastante promissoras na veiculação de fármacos hidrófobos na estrutura ocular. O sistema em estudo permite uma maior biodisponibilidade do fármaco face à solução comercial do mesmo, aliando a vantagem da liberação poder ser feita de uma forma controlada (Mahmoud *et al.*, 2011).

As vantagens apresentadas por este modelo têm por base a conjugação do derivado de ciclodextrina, que permite a veiculação de fármacos hidrófobos, com as nanopartículas de quitosano, que permitem uma maior adesão do sistema à superfície ocular devido às ligações que o quitosano estabelece com a mucina, o que vai prolongar o tempo de contacto do fármaco com a superfície ocular (Mahmoud *et al.*, 2011).

Tendo por base todos os estudos referidos sobre os sistemas coloidais pode depreender-se que apresentam este tipo de sistemas constituem uma alternativa

promissora para a libertação controlada de fármacos a nível ocular. A utilização de quitosano nestes sistemas potencia em larga medida a eficácia dos sistemas já existentes, tornando-os mais promissores para aplicações terapêuticas oculares (Calvo *et al.*, 1997; Campos *et al.*, 2001; Diebold, Jarrín, *et al.*, 2007; Motwani *et al.*, 2007; Mahmoud *et al.*, 2011; Nagarwal *et al.*, 2011).

### 5.3.4 Revestimentos e implantes

Os polímeros biodegradáveis, como é o caso do quitosano, podem ser utilizados na forma de revestimentos ou filmes, com vista à melhoria dos perfis de libertação de fármaco a nível ocular, a partir de outros dispositivos (por exemplo lentes de contacto) (L. B. Rodrigues *et al.*, 2009).

O quitosano pode também ser utilizado na formulação de implantes sólidos ou injetáveis (L. B. Rodrigues *et al.*, 2009).

Tal como anteriormente, o principal objetivo da criação destes sistemas de libertação controlada é aumentar a biodisponibilidade do fármaco bem como permitir um maior tempo de contacto deste com os tecidos da conjuntiva. Na (tabela 10) referem-se estudos que ilustram este tipo de sistemas e visam perceber se a utilização do quitosano a este nível é vantajosa. (Byrro *et al.*, 2012; L. B. Rodrigues *et al.*, 2009).

**Tabela 13: Análise dos estudos realizados por Byrro *et al.* e L.B. Rodrigues *et al.* e Fulgêncio, Saliba, Fialho, e Júnior, 2013 sobre sistemas de revestimento à base de quitosano (Adaptado de L. B. Rodrigues *et al.*, 2009; Byrro *et al.*, 2012; Fulgêncio *et al.*, 2013).**

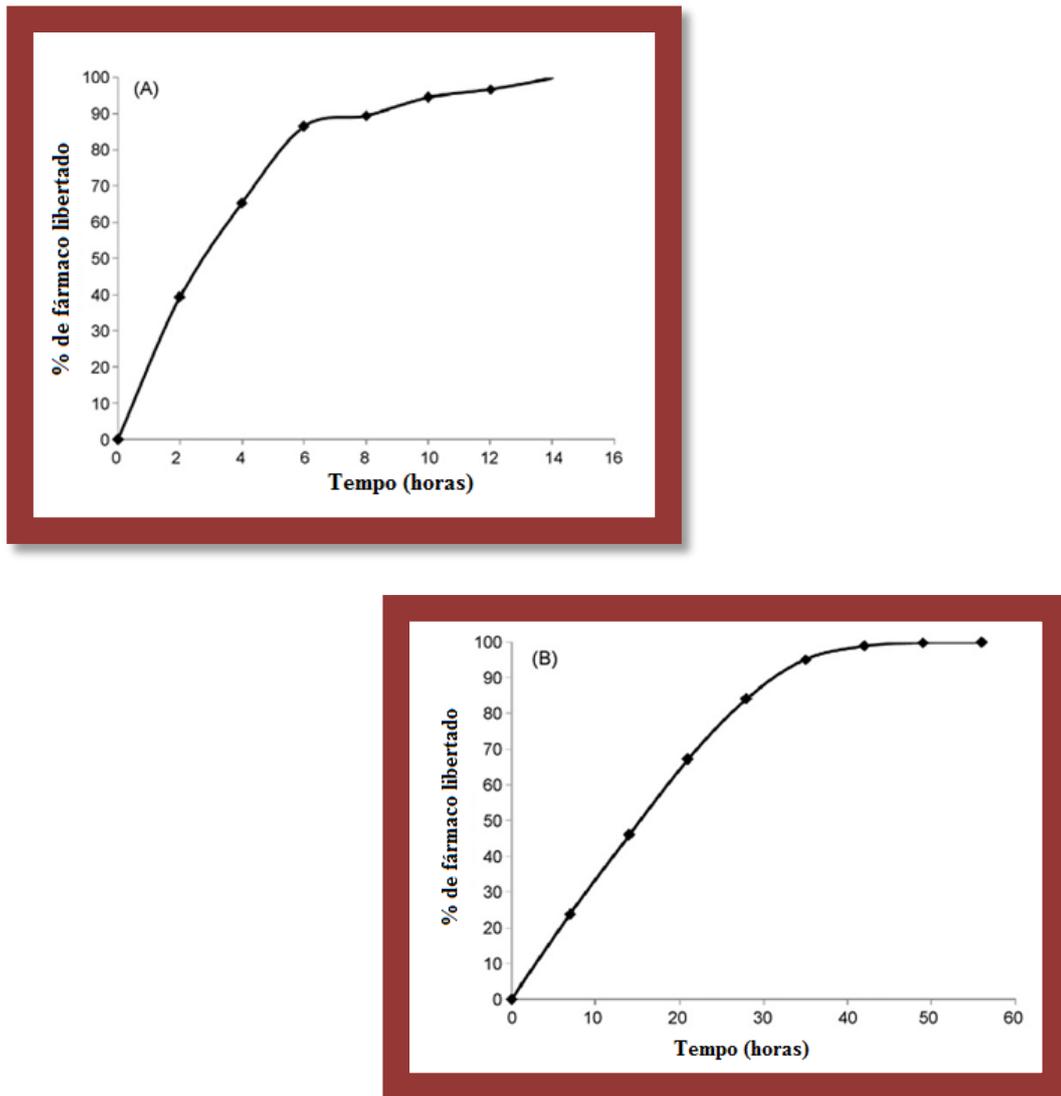
| Autor                                | Sistema em estudo  | Sistemas comparativos        | Fármaco      | Conclusão   |
|--------------------------------------|--|------------------------------|--------------|---|
| L. B. Rodrigues <i>et al.</i> , 2009 | Filmes de quitosano contendo fármaco (camada única e camada dupla) | Solução comercial de fármaco | Dexametasona | Tanto os filmes de quitosano de camada única como os de camada dupla apresentaram um bom perfil de libertação do fármaco.<br>Os sistemas em estudo apresentam uma maior biodisponibilidade do que a solução comercial do fármaco. |

|                                      |  |                                     |                       |   |
|--------------------------------------|--|-------------------------------------|-----------------------|---|
| <b>Byrro <i>et al.</i>, 2012</b>     | <b>Implantes de quitosano contendo fármaco</b> | <b>Solução comercial de fármaco</b> | <b>Ofloxacina</b>     | <b>Os implantes de quitosano permitiram modelar a liberação controlada de ofloxacina bem como aumentar a sua biodisponibilidade a nível ocular.</b> |
| <b>Fulgêncio <i>et al.</i>, 2013</b> | <b>Película de quitosano contendo fármaco</b>  |                                     | <b>Ciclosporina A</b> | <b>Aumento de 60% na produção de lágrima.<br/>Ausência de toxicidade.<br/>A película permaneceu ligada à mucosa conjuntival de todos os modelos</b> |

L. B. Rodrigues *et al.* (Tabela 13) produziram revestimentos de quitosano contendo dexametasona e averiguaram de que forma a sua produção em camada única ou em camada dupla afetava a liberação do fármaco. Utilizando diferentes técnicas concluíram existir uma interação entre os grupos hidroxilo e amina do quitosano e entre os grupos hidroxilo da dexametasona (L. B. Rodrigues *et al.*, 2009).

Os resultados mostraram que filme de quitosano em monocamada assegura uma liberação de dexametasona durante algumas horas (89,6% em 8 horas) (Figura 23A) enquanto que o filme de quitosano em camada dupla revela uma liberação mais controlada do fármaco (84% em quatro semanas) (Figura 23B). Perante estes resultados, os autores concluíram que a adição de uma segunda camada ao filme de quitosano prolongava a liberação do fármaco por mais tempo.(L. B. Rodrigues *et al.*, 2009).

Assim, demonstra-se que o filme de quitosano é uma forma promissora de veicular a dexametasona a nível ocular (L. B. Rodrigues *et al.*, 2009).



**Figura 23: Perfis de libertação *in vitro* obtidos a partir d veiculação do fármaco em filmes de camada dupla contendo dexametasona: (A) fármaco veiculado em filme de monocamada; (B) fármaco veiculado em filme de dupla camada (Adaptado de L. B. Rodrigues *et al.*, 2009).**

A ofloxacina é um potente antibiótico que pertence à família das fluoroquinolonas e que se destaca pelo seu amplo espectro de ação, elevada potencia, bem como a baixa resistência a bactérias. É usualmente utilizado em oftalmologia essencialmente em cenário pré ou pós-operatório (Byrro *et al.*, 2012).

Byrro R. *et al.* (Tabela 13) compararam dois sistemas de veiculação da ofloxacina, uma solução comercial e um implante de quitosano contendo o fármaco (Figura 24) (Byrro *et al.*, 2012).

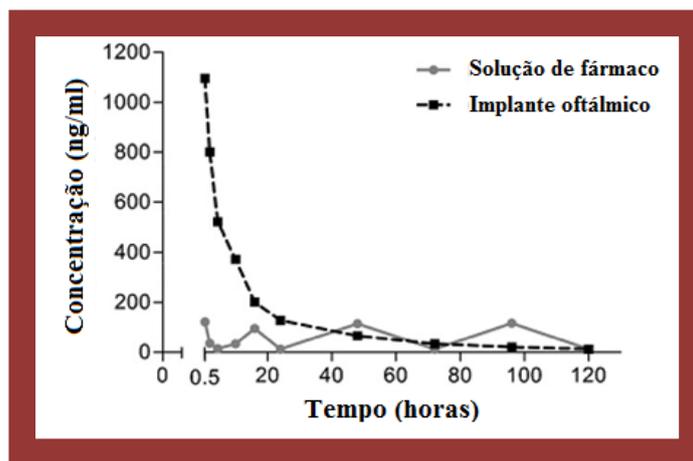


Figura 24: Concentração média de ofloxacina na lágrima em função do tempo, após administração do fármaco por meio da sua solução comercial e veiculado por um implante oftálmico à base de quitosano (Adaptado de Byrro *et al.*, 2012).

Após a análise do desempenho *in vivo* dos dois sistemas pôde depreender-se que o implante de quitosano permite a liberação controlada da ofloxacina assim como apresenta valores bastante mais promissores ao nível da biodisponibilidade do fármaco quando comparado com a solução comercial (L. B. Rodrigues *et al.*, 2009; Byrro *et al.*, 2012).

Num outro trabalho, Fulgêncio *et al.* (Tabela 13) dirigiram um estudo piloto para formulação de um sistema de liberação controlada sob a forma de película à base de quitosano contendo ciclosporina A (CyA) (Figura25) para o tratamento da queratoconjuntivite e aumento da produção de lágrima (Fulgêncio *et al.*, 2013).

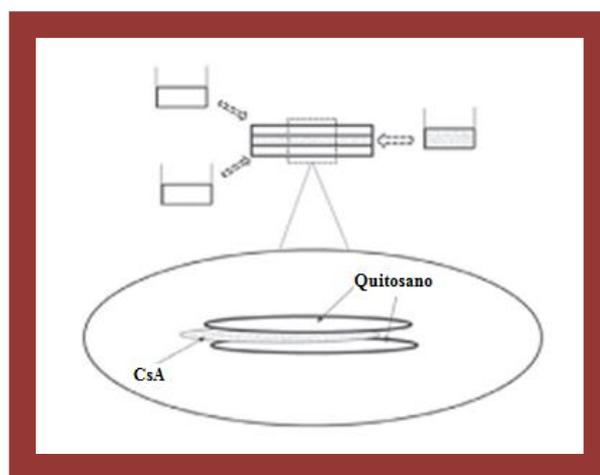


Figura 25: Preparação da película de quitosano, tipo “sandwich”, contendo ciclosporina A (Adaptado de Fulgêncio *et al.*, 2013).

O estudo *in vivo* (com coelhos) consistiu na medição do efeito na produção de lágrima, exame oftálmico e exame histológico. A nível histológico não houve qualquer alteração celular dos tecidos em contacto com a película de quitosano contendo Ciclosporina A (Fulgêncio *et al.*, 2013).

A produção de lágrima medida após implementação da película de quitosano apresentou um valor médio de  $16,02 \pm 0,38$  mm/min, sendo que o valor apresentado antes da aplicação da película era de  $9,88 \pm 0,37$  mm/min, o que se traduz num aumento de 60% na produção de lágrima (Fulgêncio *et al.*, 2013).

Os exames oftálmicos detetaram hiperemia da conjuntiva, permanecendo 48h e resolvendo-se espontaneamente durante o decorrer do estudo. Não houve qualquer sinal de toxicidade, sendo de ressaltar que a película permaneceu ligada à mucosa conjuntival de todas as cobaias (Fulgêncio *et al.*, 2013).

Os autores concluíram que a película de quitosano contendo ciclosporina A é bastante promissora, uma vez que não só permite a diminuição da frequência de administração do fármaco como pode promover uma maior efetividade da terapêutica. No entanto Fulgêncio *et al.* referem ser necessários mais estudos de forma a provar o aumento da biodisponibilidade do fármaco e traçar o perfil de libertação controlada conseguida pela película de quitosano (Fulgêncio *et al.*, 2013).



## 6. Análise do mercado

Atualmente apenas existe uma formulação patenteada e prevista para entrar no mercado e que tem por base o polímero de quitosano, Lacrimera®. Esta formulação apresenta-se sob a forma de colírio, contendo o conjugado quitosano N-acetilcisteína, e utiliza-se no tratamento da xerofthalmia (GARHÖFER & SCHMETTERER, 2011; Bonengel & Bernkop-Schnürch, 2014; Intellectual Property in Australia, n.d.).

Este produto estará disponível no mercado Europeu e tem como objectivo a proteção da superfície ocular devido ao aumento do tempo de permanência em contacto com o olho tendo-lhe sido atribuída uma classe 5 (preparações farmacêuticas limitadas à oftalmologia) e 10 (onde se encontra o olho como finalidade terapêutica)(GARHÖFER & SCHMETTERER, 2011; Intellectual Property in Australia, n.d.).

Uma pesquisa bastante exaustiva revelou a existência de um outro produto de origem chinesa à base de quitosano, sob a forma de gotas oftálmicas, que tem por finalidade o tratamento do olho seco e cansado (Figura 26). No entanto, não foi possível encontrar informação mais detalhada sobre o produto.

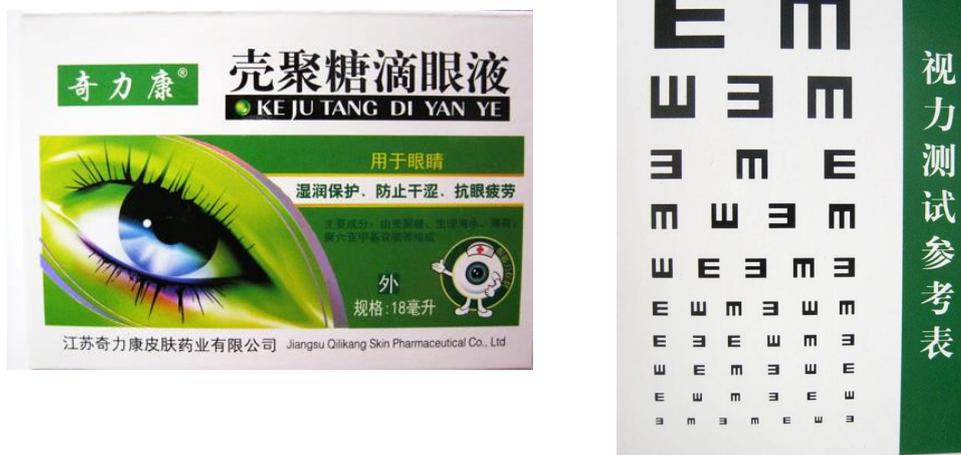


Figura 26: Solução à base de quitosano para olhos secos e cansados (Adaptado de “aliexpress,”n.d.).

Como se pode observar pela (Figura 4), no capítulo 4, o quitosano e seus derivados têm sido cada vez mais alvo de estudos e o interesse neste polímero tem vindo a crescer bastante nos últimos anos. No entanto o número de produtos à base desta matéria-prima com vista à terapia ocular, que existe no mercado é bastante escasso (Cheung et al., 2015).

Tal poderá estar relacionado com o facto dos estudos que têm sido realizados para aplicações oftalmológicas serem bastante recentes e com a necessidade de realizar mais estudos *in vivo* (fase 2 e fase 3) para avaliar a eficácia e desempenho desses produtos. Recorde-se que o tempo que medeia entre os primeiros estudos para o desenvolvimento de um produto farmacêutico e a sua entrada no mercado é em média no mínimo 6 anos (U.S. Food and Drug Administration, 2015).

## **7. Conclusão**

São várias as barreiras apresentadas pelo globo ocular à penetração de fármacos, contribuindo em muito para a ineficiência das formulações convencionais de aplicação ocular de fármacos.

As formas de tratamento convencional consistem na administração tópica dos fármacos através de colírios. Este tipo de tratamento acarreta diversos problemas. Entre eles, destacam-se a baixa biodisponibilidade que deriva das várias barreiras não só físicas como químicas que o globo ocular apresenta, eliminação rápida do fármaco não só ao nível da aplicação como através da drenagem naso-lacrimal, necessidade de aplicação frequente, bem como possíveis efeitos secundários ao nível sistémico.

Como resposta a estes problemas procurou-se desenvolver sistemas que permitam aumentar a biodisponibilidade do fármaco a nível ocular bem como aumentar a eficácia da terapêutica. Assim, surgem os sistemas de libertação controlada de fármacos que podem assumir diversas formas e formulações.

Estes sistemas fornecem inúmeras vantagens em relação aos sistemas convencionais, vantagens essas que se prendem com o aumento da biodisponibilidade dos fármacos a nível ocular, um maior tempo de contacto do fármaco com os tecidos alvo, proteção do fármaco contra agentes de degradação tais como enzimas, uma vez que estes sistemas permitem uma libertação lenta do fármaco num local alvo. Além disso a cinética de libertação pode ser modificada e controlada consoante o resultado pretendido.

Existem no mercado várias formulações que permitem a libertação controlada de fármacos a nível ocular. Apesar da sua eficácia, a sua aceitação por parte da população nem sempre é a melhor, devido ao elevado custo que esta terapêutica acarreta.

No desenvolvimento deste tipo de sistemas têm sido seguidas diferentes abordagens. Uma delas, que tem revelado resultados promissores, tem a ver com a utilização do quitosano. Diversos investigadores têm explorado as potencialidades deste polímero para diversas aplicações na área biomédica/farmacêutica.

Alguns desses estudos focam-se na terapia ocular e apresentam resultados bastante bons e auspiciosos.

Ao longo desta monografia descreveu-se a utilização do quitosano em vários sistemas de libertação prolongada para terapia ocular como é o caso de soluções, sistemas de microencapsulação, sistemas coloidais e sistemas de revestimento.

Todos os estudos apresentados concluem que o quitosano é vantajoso quando comparado com os mesmos sistemas sem a presença do polímero ou com soluções dos fármacos.

Apesar disso, o número de produtos com quitosano existentes no arsenal terapêutico oftalmológico ainda é muito escasso. Tal poderá dever-se ao facto do grande interesse neste polímero para aplicações oculares ser muito recente e de ainda ser necessário realizar estudos correspondentes a fases mais avançadas do desenvolvimento dos sistemas. A utilização do quitosano em sistemas de libertação controlada de fármacos para terapia ocular deverá constituir um avanço a nível tecnológico que irá proporcionar uma melhoria na qualidade de vida dos doentes por meio do aumento da qualidade da terapêutica.

## 8. Bibliografia

- Alex, K., Bartolomei, A., Feldman, B. H., & Edell, E. (2014). Bacterial Keratitis. Acedido em: [http://eyewiki.aao.org/Bacterial\\_Keratitis](http://eyewiki.aao.org/Bacterial_Keratitis)
- Alex, K., Feldman, B. H., & Alcaraz-Micheli, L. (2014). Fungal Keratitis. Acedido em: [http://eyewiki.aao.org/Fungal\\_Keratitis](http://eyewiki.aao.org/Fungal_Keratitis)
- Alex, K., Feldman, B. H., Nijm, L., Doss, M., & Bunya, V. (2015). Herpes Simplex Virus Keratitis. Acedido em: [http://eyewiki.aao.org/Herpes\\_Simplex\\_Virus\\_Keratitis](http://eyewiki.aao.org/Herpes_Simplex_Virus_Keratitis)
- Aliexpress. (n.d.). Acedido em: <http://www.aliexpress.com/item/Eye-drops-chitosan-eye-drops-eye-fatigue-18ml-ultra-cool-solution-anti-dry-moisture/32321105624.html>
- Amo, E. M., & Urtili, A. (2008). Current and future ophthalmic drug delivery systems A shift to the posterior segment, *13*(Fevereiro). <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.11.002>
- Angare, D., Giri, T., Tripathi, D. K., Amit, A., & Ajazuddin. (2012). Unexplored areas and new findings in lipid emulsion servins as a potential drug carrier for lipophilic drugs: a review. *Academic Journal*, *7*(1), 1–24. <http://doi.org/10.3923/tmr.2012.1.24>
- Baranowski, P. B., Gajda, M., & Pluta, J. (2014). Ophthalmic Drug Dosage Forms : Characterisation and Research Methods, *2014*. <http://doi.org/10.1155/2014/861904>
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal Oh Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *57*, 19–34. [http://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00161-9](http://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00161-9)
- Bernkop-schnürch, A., & Dünnhaupt, S. (2012). Chitosan-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *81*, 463–469. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.04.007>
- Bhagat, N., Grigorian, R. A., Tutela, A., & Zarbin, M. A. (2009). Diabetic Macular Edema : Pathogenesis and Treatment, *54*(1). <http://doi.org/10.1016/j.survophthal.2008.10.001>
- Bhattarai, N., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled , localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *62*(1), 83–99. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019>
- Bilkhu, P. S., Wolffsohn, J. S., & Naroo, S. A. (2012). Contact Lens & Anterior Eye A review of non-pharmacological and pharmacological management of seasonal and perennial allergic conjunctivitis. *Contact Lens and Anterior Eye*, *35*(1), 9–16.

<http://doi.org/10.1016/j.clae.2011.08.009>

- Bonengel, S., & Bernkop-Schnürch, A. (2014). Thiomers — From bench to market. *Journal of Controlled Release*, *195*, 120–129. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.047>
- Byrro, R. M. D., Fulgêncio, G. de O., Cunha, A. da Silva, César, I. C., Chellini, P. R., & Pianetti, G. A. (2012). Determination of ofloxacin in tear by HPLC – ESI-MS / MS method: Comparison of ophthalmic drug release between a new mucoadhesive chitosan films and a conventional eye drop formulation in rabbit model. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *70*, 544–548. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.05.003>
- Calderón, L., Harris, R., Cordoba-diaz, M., Elorza, M., Elorza, B., Lenoir, J., ... Cordoba-diaz, D. (2013). Nano and microparticulate chitosan-based systems for antiviral topical delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *48*, 216–222. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.11.002>
- Calvo, P., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers, *153*, 41–50.
- Campos, A. M. De, Sa, A., & Alonso, J. (2001). Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A, *224*, 159–168.
- Cao, Y., Zhang, C., Shen, W., & Cheng, Z. (2007). Poly (N -isopropylacrylamide) – chitosan as thermosensitive in situ gel-forming system for ocular drug delivery, *120*, 186–194. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.05.009>
- Cheng, Y., Hung, K., Tsai, T., Lee, C., & Ku, R. (2014). Sustained delivery of latanoprost by thermosensitive chitosan – gelatin-based hydrogel for controlling ocular hypertension. *Acta Biomaterialia*, *10*(10), 4360–4366. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.031>
- Cheung, R. C. F., Ng, T. B., Wong, J. H., & Chan, W. Y. (2015). *Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications*. <http://doi.org/10.3390/md13085156>
- Chigbu, D. I. (2009). Contact Lens & Anterior Eye The management of allergic eye diseases in primary eye care, *32*, 260–272. <http://doi.org/10.1016/j.clae.2009.08.002>
- Cholkar, K., Patel, S. P., Vadlapudi, A. D., & Mitra, A. K. (2013). Novel Strategies for Anterior Segment Ocular Drug Delivery. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, *29*(2). <http://doi.org/10.1089/jop.2012.0200>
- Coimbra, P. M. (2010). *Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural*.

- Colo, G. Di, Zambito, Y., Burgalassi, S., Nardini, I., & Saettone, M. F. (2004). Effect of chitosan and of N -carboxymethylchitosan on intraocular penetration of topically applied ofloxacin, *273*, 37–44. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.12.018>
- Colo, G. Di, Zambito, Y., Burgalassi, S., Serafini, A., & Saettone, M. F. (2002). Effect of chitosan on in v itro release and ocular deli v ery of ofloxacin from erodible inserts based on poly ( ethylene oxide ), *248*, 115–122.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *36*(8), 981–1014. <http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>
- de la Fuente, M., Raviña, M., Paolicelli, P., Sanchez, A., Seijo, B., & Alonso, M. J. (2010). Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *62*(1), 100–117. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.026>
- Diebold, Y., Jaarín, M., Sáez, V., Carvalho, E. L. S., Orea, M., Calong, M., ... Alonso, M. J. (2007). Ocular drug delivery by liposome – chitosan nanoparticle complexes ( LCS-NP ), (APRIL). <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.028>
- Diebold, Y., Jarrín, M., Sáez, V., Carvalho, E. L. S., Orea, M., Calong, M., ... Alonso, M. J. (2007). Ocular drug delivery by liposome – chitosan nanoparticle complexes ( LCS-NP ), *28*, 1553–1564. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.028>
- Dodane, V., & Vilivalam, V. D. (1998). Pharmaceutical applications of chitosan, *1*(6).
- Felt, O., Gurny, R., Buri, P., & Baeyens, V. (2001). Delivery of Antibiotics to the Eye Using a Positively Charged Polysaccharide as Vehicle, *3*(4), 1–7.
- Fulgêncio, G. de oliveira, Saliba, J. B., Fialho, S. L., & Júnior, A. da S. C. (2013). Cyclosporine-loaded delivery system for the treatment of keratoconjunctivitis sicca: a pilot study, *72*(4), 232–236.
- GARHÖFER, G., & SCHMETTERER, L. (2011). Chitosan-N-Acetylcysteine Eye Drops (Prolonged resident time on the ocular surface was shown in preclinical studies, and no safety problems were seen in early clinical results.). Acedido em: [http://crstodayeurope.com/pdfs/CRSTE1111\\_feature\\_pflugfelder\\_2.pdf](http://crstodayeurope.com/pdfs/CRSTE1111_feature_pflugfelder_2.pdf)
- Gaudana, R., Ananthula, H. K., Parenky, A., & Mitra, A. K. (2010). Ocular Drug Delivery, *12*(3), 348–360. <http://doi.org/10.1208/s12248-010-9183-3>
- Genta, I., Conti, B., PERugini, P., Pavanetto, F., Spadaro, A., & Puglisi, G. (1997). Bioadhesive Microspheres for Ophthalmic Administration of Acyclovir, *1*(1992), 737–742.
- Gupta, P. K., Patel, N. V., Patel, S. D., & Patel, K. J. (2014). Cytomegalovirus retinitis in acquired immunodeficiency syndrome patients: A problem worth giving attention to. *Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS*, *35*(1), 21–24.

<http://doi.org/10.4103/0253-7184.132411>

- Hamidi, M., Azadi, A., & Ra, P. (2008). Hydrogel nanoparticles in drug delivery, *60*, 1638–1649. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.002>
- Iester, M. (2008). Brinzolamide ophthalmic suspension : a review of its pharmacology and use in the treatment of open angle glaucoma and ocular hypertension, *2(3)*, 517–523.
- INFARMED. (2013). *Prontuário Terapêutico*. (I. / M. INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde & D. Saúde, Eds.).
- Intellectual Property in Australia. (n.d.). TRADEMARK DETAILS-LACRIMERA - 1597485. Acedido em: <http://www.ipaustralia.com.au/applicant/croma-pharmagesellschaft-mbh/trademarks/1597485/>
- James, H. P., John, R., Alex, A., & Anoop, K. R. (2014). Smart polymers for the controlled delivery of drugs – a concise overview, *4(2)*, 120–127. <http://doi.org/10.1016/j.apsb.2014.02.005>
- Johnson, M. W. (2009). Etiology and Treatment of Macular Edema, *147(1)*, 11–21. <http://doi.org/10.1016/j.ajo.2008.07.024>
- Kanski, J. J. (2004). Distúrbios das palpebras. In *Oftalmologia Clínica: Uma abordagem sistemática* (4<sup>o</sup> edição). Rio de Janeiro: Rio Med.
- Kaur, I., Pal, & Smitha. (2002). Penetration Enhancers and Ocular Bioadhesives : Two New Avenues for Ophthalmic Drug Delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *4(791911965)*, 353 — 369. <http://doi.org/10.1081/DDC-120002997>
- Kempen, J. H., Jabs, D. A., Wilson, L. A., Dunn, J. P., West, S. K., & Tonascia, J. A. (2003). Risk of Vision Loss in Patients With Cytomegalovirus Retinitis and the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Arch Ophthalmol*, *121*, 466–476.
- Kumar, A., Malviya, R., & Sharma, P. K. (2011). Recent Trends in Ocular Drug Delivery : A Short Review. *European Journal of Applied Sciences*, *3(3)*, 86–92.
- Kumar, M. N. V. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications q, *46*, 1–27.
- Kushwaha, S. K. S., Saxena, P., & Rai, A. K. (2012). Stimuli sensitive hydrogels for ophthalmic drug delivery : A review, *2(2)*. <http://doi.org/10.4103/2230-973X.100036>
- Liang, H., Mao, Z., Riancho, L., Faure, M. O., Warnet, J. M., Lambert, G., & Baudouin, C. (2008). Reduction of quaternary ammonium-induced ocular surface toxicity by emulsions : an in vivo study in rabbits. *Molecular Vision*, (January), 204–216.
- Loftsson, T., & Brewster, M. E. (1996). Applications of Cyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, (November). <http://doi.org/10.1021/js950534b>
- Lucia, R. (2014). *Uso Racional de Medicamentos Roberto DeLucia* (Vol. II). Acedido

em: <http://www.uc.pt/bcsuc/Documentos/farmacologia2>

- Ludwig, A. (2005). The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), 1595–1639. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.005>
- Lyra, M. A. M., Soares-Sobrinho, J. L., Brasileiro, M. T., Roca, M. F., Barraza, J. A., Viana, O. de S., & Rolim-Neto, P. J. (2007). Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(5).
- Mahmoud, A. A., El-feky, G. S., Kamel, R., & Awad, G. E. A. (2011). Chitosan / sulfobutylether- Beta -cyclodextrin nanoparticles as a potential approach for ocular drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 413(1-2), 229–236. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.031>
- Melo, S., Cunha, S., & Fialho, S. L. (2012). Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos, 33(4), 469–477.
- Mishra, G. P., Bagui, M., Tamboli, V., & Mitra, A. K. (2011). Recent Applications of Liposomes in Ophthalmic Drug Delivery, 2011. <http://doi.org/10.1155/2011/863734>
- Motwani, S. K., Chopra, S., Ahmad, F. J., Iqbal, Z., Talegaonkar, S., Khar, R. K., ... Delhi-, N. (2007). Gatifloxacin Nanoparticles for Ophthalmic Delivery Preparation of Nanoparticles Characterisation of Nanoparticles, 2, 310–312.
- Motwani, S. K., Chopra, S., Talegaonkar, S., Kohli, K., Ahmad, F. J., & Khar, R. K. (2008). Chitosan – sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery : Formulation , optimisation and in vitro characterisation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68, 513–525. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.09.009>
- Muñoz-Fernández, S., & Martín-Mola, E. (2006). Uveitis, 20(3), 487–505. <http://doi.org/10.1016/j.berh.2006.03.008>
- Nagarwal, R. C., Singh, P. N., Kant, S., Maiti, P., & Pandit, J. K. (2011). Chitosan Nanoparticles of 5-Fluorouracil for Ophthalmic Delivery : Characterization , in-Vitro and in-Vivo Study, 59(2), 272–278.
- Opitz, D. L., & Harthan, J. S. (2012). Ophthalmology and Eye Diseases Review of Azithromycin Ophthalmic 1 % Solution ( AzaSite ® ) for the Treatment of Ocular Infections, 4, 1–14. <http://doi.org/10.4137/OED.S7791>
- Patel, A. (2013). Ocular drug delivery systems: An overview. *World Journal of Pharmacology*, 2(2), 47. <http://doi.org/10.5497/wjp.v2.i2.47>
- Rathinam, S. R., & Babu, M. (2013). Algorithmic approach in the diagnosis of uveitis. *Indian Journal of Ophthalmology*, 61(6), 255–262. <http://doi.org/10.4103/0301->

4738.114092

- Rodrigues, C. E. M., Gadelha, C. S., Nobre, C. A., Callado, M. R. M., Vieira, R. M. R. de A., & Vieira, W. P. (2009). *Retinite por citomegalovirus ( CMV ) após terapia imunossupressora para vasculite leucocitoclástica* (Vol. 49).
- Rodrigues, L. B., Leite, H. F., Yoshida, M. I., Saliba, J. B., Cunha, A. S., & Faraco, A. A. G. (2009). In vitro release and characterization of chitosan films as dexamethasone carrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 368, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.047>
- Rupenthal, I. D., Green, C. R., & Alany, R. G. (2011). Comparison of ion-activated in situ gelling systems for ocular drug delivery . Part 1: Physicochemical characterisation and in vitro release. *International Journal of Pharmaceutics*, 411(1-2), 69–77. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.042>
- S. K., R., & K. R., N. (2009). An insight into ophthalmic drug delivery systempdf. *International Journal Oh Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 1(1), 1–5.
- Sa, A. (2003). The potential of chitosan in ocular drug delivery, 1451–1463. <http://doi.org/10.1211/0022357022476>
- Sahoo, S. K., Dilnawaz, F., & Krishnakumar, S. (2008). Nanotechnology in ocular drug delivery, 13(February). <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.10.021>
- Saltão, R., & Veiga, F. (2001). Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, (November).
- Senaratne, T., & Gilbert, C. (2005). Viral conjunctivitis. *Community Eye Health Journal*, 18(53), 73–75.
- Severino, P., Vasconcelos, F. da C., & Figueiredo, E. S. de. (2007). Uso tópico de quitosana em oftalmologia, 88(4), 155–158.
- Sharma, S. (2002). Keratitis, 21(4).
- Sheikh, A., & Hurwitz, B. (2009). Antibiotics versus placebo for acute bacterial conjunctivitis ( Review ), (2).
- Sinha, V. R., Singla, A. K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., & Dhawan, S. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 274, 1–33. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.12.026>
- Tamilvanan, S. (2004). Progress in Lipid Research Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems, 43, 489–533. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.09.001>
- Tamilvanan, S., Venkateshan, N., & Ludwig, A. (2008). The potential of lipid- and polymer-based drug delivery carriers for eradicating biofilm consortia on device-

- related nosocomial infections. *Journal of Controlled Release*, 128, 2–22. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.01.006>
- Tangri, P., & Khurana, S. (2011). Basics of Ocular Drug Delivery Systems. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2(4), 1541–1552.
- Tranos, P. G., Fracs, G., Wickremasinghe, S. S., Stangos, N. T., Topouzis, F., Tsinopoulos, I., & Pavesio, C. E. (2004). Macular Edema, 49(5). <http://doi.org/10.1016/j.survophthal.2004.06.002>
- U.S. Food and Drug Administration. (2015). The Drug Development Process. Retrieved from <http://www.fda.gov/ForPatients/Approvals/Drugs/default.htm>
- University of Maryland Medical Center. (2012). Glaucoma.
- Wassmer, S., Rafat, M., Gin, W., Baker, A. N., & Tsilfidis, C. (2013). Chitosan microparticles for delivery of proteins to the retina. *Acta Biomaterialia*, 9(8), 7855–7864. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.025>
- Wu, J., Su, Z., & Ma, G. (2006). A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan / glycerophosphate. *International Journal of Pharmaceutics*, 315, 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.01.045>