

Sistemas biodegradáveis contendo acetato de prednisolona para administração orbitária

Biodegradable systems containing prednisolone acetate for orbital administration

Ricardo Martins Duarte Byrro¹
Denise Miyashita²
Verônica Batista de Albuquerque³
Antônio Augusto Velasco e Cruz⁴
Armando da Silva Cunha Júnior⁵

RESUMO

Objetivo: O presente estudo objetivou o desenvolvimento e a avaliação de um sistema biodegradável de liberação de fármacos com característica de liberação prolongada, destinado à administração orbitária de acetato de prednisolona (AP). **Métodos:** O sistema desenvolvido, na forma de microsferas (MEs) de poli-ε-caprolactona (PCL) contendo o AP, foi obtido pelo método de evaporação de solvente. As MEs foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), calorimetria diferencial exploratória (DSC), avaliação do teor de encapsulação e pelo perfil de liberação in vitro. O perfil de liberação in vivo foi avaliado em coelhos após administração peribulbar de uma suspensão aquosa das MEs. A biocompatibilidade local do sistema foi verificada por meio de análise histopatológica da região de implantação. **Resultados:** Após obtenção das MEs, a análise morfológica por MEV mostrou a viabilidade do método de obtenção do sistema. O teor de AP encapsulado foi de $43 \pm 7\%$ e pode ser considerado bastante satisfatório. A caracterização do sistema por DSC, além de confirmar a sua estabilidade, não indicou a existência de interação entre o fármaco e o polímero. O estudo de liberação in vitro indicou que o sistema apresenta perfil de liberação prolongada. O estudo in vivo confirmou o perfil de liberação prolongado do AP a partir das MEs, sugerindo, também, a viabilidade do sistema devido à ausência de toxicidade local. **Conclusão:** O conjunto dos resultados obtidos neste trabalho é relevante e credencia o sistema desenvolvido como uma possível alternativa ao tratamento de orbitopatias inflamatórias.

Descritores: Sistemas de liberação de medicamentos; Implantes de medicamentos/administração & dosagem; Implantes absorvíveis; Doenças da órbita/quimioterapia; Preparações de ação retardada; Polímeros; Portadores de fármacos; Prednisolona/administração & dosagem

INTRODUÇÃO

A utilização de corticóides via sistêmica, seja na forma oral, injetável ou intramuscular têm sido a primeira opção no tratamento de doenças inflamatórias da órbita, tais como, orbitopatia de Graves, inflamação orbitária inespecífica, dacrioadenites, granulomatose de Wegener. Entretanto, sabe-se que tais doenças requerem um uso prolongado dessa classe de medicamentos, o que provoca efeitos colaterais que dificultam tanto sua aplicação, como a adesão do paciente ao tratamento proposto⁽¹⁻²⁾.

Uma das principais alternativas para o tratamento de doenças que necessitam da administração de medicamentos por longos períodos consis-

Trabalho realizado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brasil e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP - Ribeirão Preto (SP) - Brasil.

¹ Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brasil.

² Pós-graduanda (Doutorado) do Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP - Ribeirão Preto (SP) - Brasil.

³ Mestre em Medicina Veterinária pela Faculdade de Odontologia e Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista - UNESP - Araçatuba (SP) - Brasil.

⁴ Professor Titular do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - Ribeirão Preto (SP) - Brasil.

⁵ Doutor em Ciências Farmacêuticas, Professor de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brasil.

Endereço para correspondência: Armando da Silva Cunha Júnior. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6.627 - Belo Horizonte (MG) CEP 31270-901
E-mail: armando@pq.cnpq.br

Recebido para publicação em 01.10.2008

Última versão recebida em 26.05.2009

Aprovação em 26.06.2009

te no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (SLF)⁽³⁾. Microesferas (MEs) são SLF, formadas pela combinação polímero-fármaco, onde o fármaco se encontra homogeneamente disperso na matriz polimérica. Esses sistemas possuem algumas vantagens sobre os sistemas implantáveis, pois, devido ao seu tamanho, podem ser injetados diretamente no local desejado, atuando como um reservatório do fármaco e promovendo a sua lenta liberação⁽³⁻⁴⁾.

A utilização da poli-ε-caprolactona (PCL) na preparação de SLF tem sido bastante explorada nos últimos anos. Estudos de eficácia e biocompatibilidade da PCL resultaram na sua aprovação pela "Food and Drug Administration" para utilização farmacêutica⁽⁵⁾.

A prednisolona, assim como os outros corticóides, diminui ou impede a resposta tissular ao processo inflamatório, por intermédio da redução do desenvolvimento dos sintomas da inflamação⁽⁶⁾. Apesar dos vários estudos já realizados com a prednisolona, a sua utilização para tratamento de afecções orbitária e veiculada em SLF ainda não foi investigada.

OBJETIVO

O presente estudo apresentou como objetivo o desenvolvimento e a avaliação de microesferas de poli-ε-caprolactona contendo acetato de prednisolona, destinadas à administração orbitária.

MÉTODOS

Foram usados no presente estudo os materiais: AP (Galen, Brasil), acetonitrila grau CLAE (Merck, Alemanha), PCL (MW ~14.000; Sigma-Aldrich Co, EUA), Álcool Polivinílico (MW 72000, Sigma-Aldrich Co, EUA). Água ultrapura obtida por Milli-Q. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

• Obtenção de MEs de PCL contendo AP

As MEs contendo AP foram obtidas a partir da adaptação do método da emulsão simples óleo em água (O/A), seguido da evaporação do solvente⁽⁷⁾. Para o preparo, 90 mg de PCL e 10 mg de AP foram dissolvidos em 10,0 mL de diclorometano (fase orgânica), à temperatura ambiente. A fase orgânica obtida foi vertida, sob agitação (Agitador EUROSTAR - IKA®, Labortechnik, Alemanha), em 100,0 mL de solução de álcool polivinílico 2,0% v/v. Após a completa adição da fase orgânica, a agitação foi mantida por mais seis horas, à temperatura ambiente. As MEs obtidas foram centrifugadas por 20 min, a 23.000 x g, a 4°C (Centrífuga HIMAC - CR21®, Hitachi, Japão), lavadas por três vezes com água destilada e novamente centrifugadas por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as MEs ressuspensas em água, liofilizadas (Liofilizador E-C MODULYO®, Apparatus Inc., EUA) e armazenadas sob refrigeração.

• Caracterização das MEs biodegradáveis obtidas

Determinação do teor de AP por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O método empregado, adaptado da USP2007⁽⁸⁾, apresentou as seguintes condições cromatográficas: fase móvel constituída de água e acetonitrila, na proporção 55:45, fluxo da fase móvel de 1,2 mL/minuto em modo isocrático (Cromatógrafo líquido WATERS®), comprimento de onda de detecção no UV de 240 nm, volume de injeção de 20 µL e coluna mantida à temperatura ambiente (coluna Shim-pack® LC18 25 cm x 4,6 mm com partículas de 5 µm, SHIMADZU). Após a obtenção das curvas analíticas, os dados estatísticos e de regressão linear foram calculados utilizando o software Microcal Origin® versão 3.54.

Avaliação da morfologia das MEs obtidas

A morfologia das MEs imediatamente após o preparo e de MEs retiradas do estudo de liberação in vitro após intervalos de 1, 2 e 3 meses de incubação, foi avaliada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Microscópio marca JEOL, Modelo 6360LV). A visualização foi realizada em aumentos que variaram de 2000 x a 15000 x e as imagens obtidas foram processadas utilizando os programas adobe Photoshop (6.0) e Adobe Illustrator (9.01) (Adobe Systems Incorporated, 2000, EUA).

Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A DSC é uma técnica que permite a identificação das temperaturas de transição vítrea (Tg), de fusão © e de recristalização (Tc) de polímeros, possibilitando a verificação de possíveis alterações na estrutura do material em função do processamento realizado.

Amostras de MEs contendo AP, PCL pura e liofilizada, mistura liofilizada de PCL e AP (9:1) e AP puro foram analisadas, na razão de 10°C/min, no calorímetro modelo DSC50 (Shimadzu), operando em atmosfera dinâmica de nitrogênio.

Teor de encapsulação

O teor de encapsulação pode ser definido como a quantidade real de fármaco que é carregada nas MEs e é determinado após a extração da substância encapsulada. O método de extração empregado foi uma adaptação do procedimento descrito por Kompella e al.⁽⁹⁾

Estudo de liberação in vitro

O estudo de liberação in vitro foi realizado em 2 mL de PBS 0,1 M; pH 7,4 empregando-se uma incubadora TE-424 (TECNAL, Brasil) com agitação e temperatura mantidas constantes em 30 rpm (±1) e 37°C (±0,2°C), respectivamente.

Foram pesadas, em sextuplicata, aproximadamente 10 mg de MEs, que foram colocadas em frascos especiais contendo dois compartimentos separados por um filtro lacrado, de modo que a única maneira dos compartimentos se comunicarem seria pela retirada do lacre. As MEs foram colocadas no comparti-

mento superior em contato com 2 mL de PBS durante o tempo de incubação. No momento da troca do meio, os frascos eram retirados da incubadora e, após a remoção do lacre do filtro, centrifugados a 3600 rpm por 10 minutos. Durante a centrifugação, o meio passava para o compartimento inferior do frasco e era recolhido para análise do teor de AP por CLAE. As MEs continuavam no compartimento superior, retidas pelo filtro, e o frasco era novamente lacrado e reabastecido com mais 2 mL de meio.

Estudo in vivo preliminar

No procedimento experimental, planejado em conformidade com os padrões estabelecidos pelo "Statement for the use of animals in ophthalmic and visual research da ARVO"⁽¹⁰⁾ e aprovado pelo CEEA da Universidade Estadual Paulista, campus de Araçatuba, (protocolo 002066/2007), foram empregados 12 coelhos do sexo feminino, raça Nova Zelândia, com peso médio de 2.000 a 2.500 g.

Para administração orbitária de MEs contendo AP, os coelhos foram sedados com acepromazina intramuscular (IM) 0,2%, 1 mg/kg de peso, e anestesiados com cloridrato de ketamina 30 mg/kg IM. Após anestesia, foi realizado a injeção peribulbar inferior via transconjuntival, na órbita direita, com agulha 25 x 0,7 mm, de 2 mL de uma suspensão aquosa de 65 mg de MEs, correspondendo a 2,8 mg de AP. Logo após o procedimento, 1 gota do antibiótico moxifloxacino 0,5% (Vigamox[®], Alcon Labs do Brasil) foi instilada. Após 7, 14 e 28 dias do procedimento, 4 animais foram submetidos à punção vítrea bilateral, retirada de fragmentos de músculo reto inferior e gordura orbitária na porção ínfero-medial e, finalmente, exenteração do bulbo direito via transpalpebral. O procedimento de coleta dos materiais e exenteração foi realizado de acordo com o padrão anestésico adequado. As amostras recolhidas foram mantidas congeladas a temperatura de -80°C, até a análise do teor de AP.

Para a avaliação de biocompatibilidade, o bulbo exenterado foi mantido em formol tamponado a 10% e processado na forma convencional de coloração com hematoxilina-eosina.

Estudo preliminar de liberação in vivo

Para a avaliação da quantidade de AP liberada das MEs, as diferentes amostras foram descongeladas e a quantidade de fármaco presente em cada material foi determinado por CLAE. Para as amostras de tecido muscular e adiposo, um procedimento extração, adaptado e validado do trabalho descrito por Rönquist-Nii et al.⁽¹¹⁾, foi realizado antes da análise por CLAE.

RESULTADOS

A MEV realizada logo após a obtenção das MEs mostrou claramente o formato esférico das partículas formadas, permitindo ainda uma boa indicação de tamanho e distribuição. A MEV também possibilitou observar que a superfície das microssferas obtidas era bastante lisa e homogênea (Figura 1).

A avaliação do teor de encapsulação do AP nas MEs demonstrou que foi possível encapsular o fármaco em uma taxa de $43 \pm 7\%$. Essa taxa de eficiência indica um teor de 4,6% (p/p), frente a um valor teórico de 10%.

Na figura 2 são apresentadas imagens de MEV das MEs incubadas em tampão PBS. A análise destas imagens indica um crescente aumento na irregularidade e porosidade da superfície das partículas, em função do tempo de incubação.

A DSC foi utilizada para se obter informações sobre a estabilidade do polímero e do fármaco e também sobre a possibilidade de interação entre eles. Nesse sentido, foram avaliadas amostras de MEs contendo AP, MEs sem o fármaco (MEs branco), polímero (PCL) e fármaco (AP). A análise dos termogramas obtidos (Figura 3) indica a presença de picos característicos dos pontos de fusão (PF) do polímero e do fármaco. Os valores dos PF são mostrados detalhadamente na tabela 1. Nota-se que o PF do polímero permaneceu praticamente a mesma em todas as análises. Entretanto, no caso do fármaco uma redução de 9°C no PF foi observada após a formação das MEs de AP.

O perfil de liberação in vitro do AP está representado na figura 4, onde se pode observar que a taxa de liberação acumulada foi de 7,2% durante um período de incubação de 12 semanas. Observa-se, ainda, que o perfil de liberação foi lento e crescente durante todo o período de incubação, sendo que houve uma liberação bem maior nas primeiras duas semanas, onde a taxa atingiu mais de 50% do total de fármaco liberado durante todo o período do estudo. Após esse intervalo, a liberação do fármaco, embora crescente, apresentou-se bem mais lenta e bastante uniforme, com um aumento aproximado de 0,3% por semana.

Na avaliação do perfil de liberação in vivo (Figura 5), concentrações de AP no vítreo, no músculo reto inferior e no tecido adiposo da órbita foram detectadas durante o período do ensaio. Nota-se que a uma maior diferença de concentração do fármaco nos diferentes tecidos ocorre principalmente na primeira e na última semana do estudo.

A análise histopatológica dos tecidos da órbita não evidenciou sinais relevantes de toxicidade (Figura 6), sendo que os cortes histológicos revelam a presença de material amorfo, eosinofílico, parcialmente circundado por discreto infiltrado inflamatório agudo. Não há sinais de processo inflamatório crônico granulomatoso ou fibrose. O discreto infiltrado inflamatório encontra-se restrito à área de injeção do material, sem extensão para o tecido adiposo orbitário.

DISCUSSÃO

As MEs obtidas apresentaram um formato regular e esférico, com pouca variação de tamanho. A avaliação do teor de encapsulação demonstrou uma taxa de $43 \pm 7\%$ de AP nas MEs em relação à quantidade de fármaco adicionada à preparação. Embora a concentração teórica da formulação seja de 10%, raros são os casos em que 100% do fármaco é efetiva-

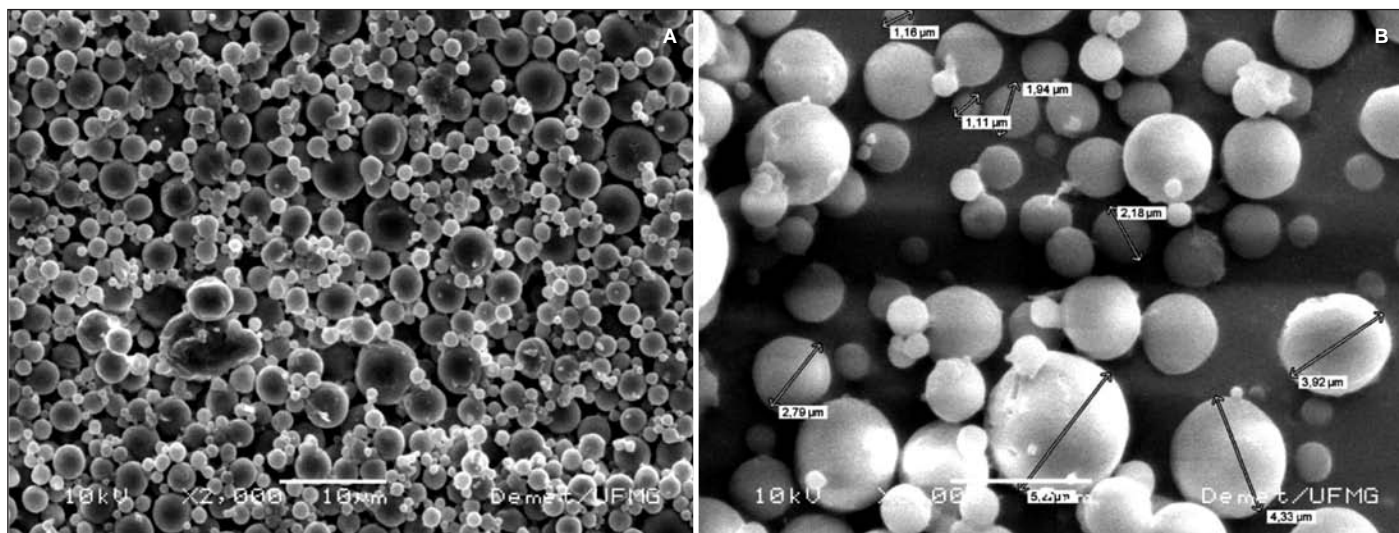


Figura 1 - Imagens de MEV das MEs obtidas: (A) Aumento de 2000 X; (B) Aumento de 5000 X

mente encapsulado durante a formação de microsferas poliméricas e o teor de encapsulação encontrado pode ser considerado bastante satisfatório quando comparado com outros estudos^(4,7).

A morfologia da superfície de sistemas poliméricos tem um papel importante no seu processo de degradação e de liberação dos fármacos nele presentes, pois a presença de poros ou canais na matriz pode permitir uma difusão do fármaco possivelmente não controlada pela velocidade de degradação do polímero⁽¹²⁾. A quase ausência de poros observada nas MEs incubadas durante um mês sugere que o AP liberado durante este período é decorrente basicamente da difusão do fármaco que ficou adsorvida na superfície das MEs. O aparecimento de poros na superfície das MEs, observados com dois e três meses de incubação (Figura 2), é descrito em vários estudos⁽¹³⁻¹⁶⁾.

O ponto de fusão da PCL encontrado nas análises de DSC (variando entre 55°C e 56°C) difere um pouco do encontrado na literatura⁽¹⁷⁾, que é de 60°C. Sobre este resultado, pode-se sugerir a ocorrência de um rearranjo das cadeias do polímero quando ele é solubilizado em diclorometano e depois recristalizado pela evaporação do solvente, durante o processo de produção das MEs. Nesse momento, o arranjo das cadeias tomaria um novo formato, provavelmente mais desorganizado, já que uma menor energia passa a ser requerida para quebrar as ligações entre as cadeias e ocorrer fusão do polímero. Condição semelhante foi observada em outro estudo⁽¹⁸⁾, onde o ponto de fusão de 57,2°C foi encontrado para a PCL, quando o polímero foi submetido a tratamento similar de dissolução em solvente orgânico, seguido de evaporação para a recristalização.

A redução do ponto de fusão do AP (de 9°C), observada nas análises de DSC pode sugerir um provável indício de alteração da rede cristalina do fármaco durante o processo de produção das MEs⁽¹⁹⁾. A análise de DSC indica também que os sistemas foram obtidos com sucesso e que os mesmos são

estáveis à temperatura em que os estudos *in vivo* e *in vitro* foram realizados (37°C).

O perfil de liberação obtido no presente estudo é parecido com outros perfis de sistemas poliméricos relatados em diferentes trabalhos^(5,16,20). Em geral, o perfil de liberação pode ser dividido em três etapas: a primeira consiste de uma alta taxa de liberação do fármaco, conhecida como “burst” inicial, possivelmente devido à presença do fármaco na superfície do sistema⁽²⁰⁾. A segunda acontece devido à difusão do fármaco da matriz para o meio externo, antes mesmo do processo de erosão da matriz polimérica ter início, e está relacionada com o coeficiente de difusão, saturação do meio de incubação e com a concentração de fármaco no sistema^(16,21). A terceira fase corresponde a um repentino “burst” devido ao intumescimento e desintegração da matriz propriamente dita^(16,22). No presente estudo, a primeira e a segunda etapa de liberação foram observadas. A terceira não foi observada certamente devido ao curto período de tempo do estudo. Entretanto, os resultados obtidos permitem sugerir que o sistema polimérico desenvolvido apresenta perfil característico de um sistema de liberação prolongada, pois o mesmo não liberou todo o fármaco presente de uma única vez, tendo proporcionado sua lenta liberação ao longo do período de duração do ensaio. Contudo, é importante comentar que o estudo de liberação *in vitro* só se completa com a degradação do polímero e a liberação total do fármaco, ainda que o tempo exigido para isso seja elevado^(5,17). Em uma análise preliminar, considerando a taxa de encapsulação de 43% e a liberação acumulada de 7,2% em 12 semanas, o sistema desenvolvido também poderia levar aproximadamente 3 anos para se esgotar.

O estudo *in vivo* permitiu a obtenção de informações importantes sobre o comportamento do sistema quando em contato com o meio biológico. Embora no estudo *in vitro* tenham sido empregadas condições que se aproximam das fisiológicas, é de se esperar que o comportamento seja diferente no

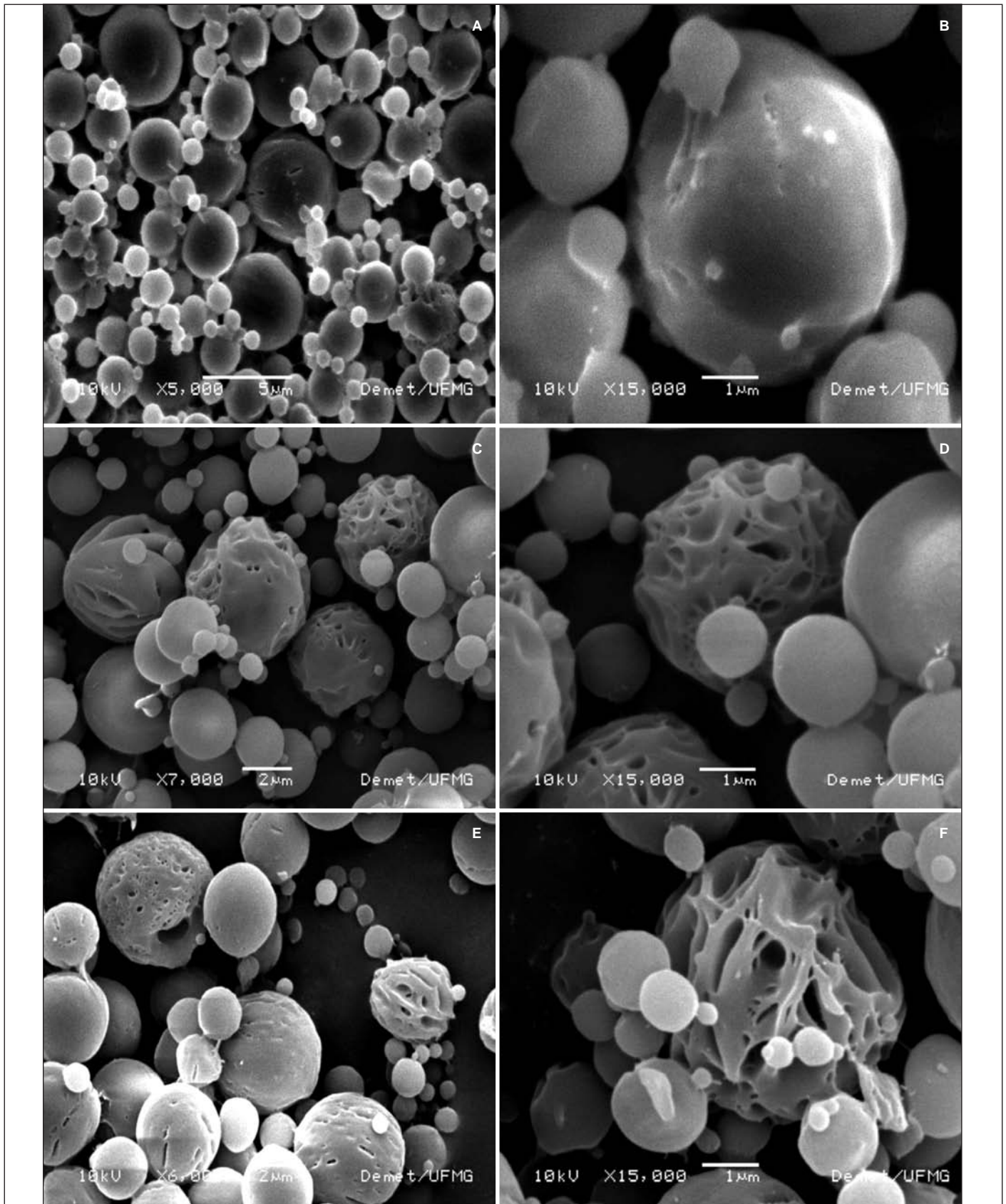


Figura 2 - Imagens de MEV das MEs incubadas com PBS em diferentes tempos: (A) e (B) 1 mês (aumentos de 5000 X e 15000 X respectivamente); (C) e (D) 2 meses (aumentos de 7000 X e 15000 X respectivamente); (E) e (F) 3 meses (aumentos de 6000 X e 15000 X respectivamente)

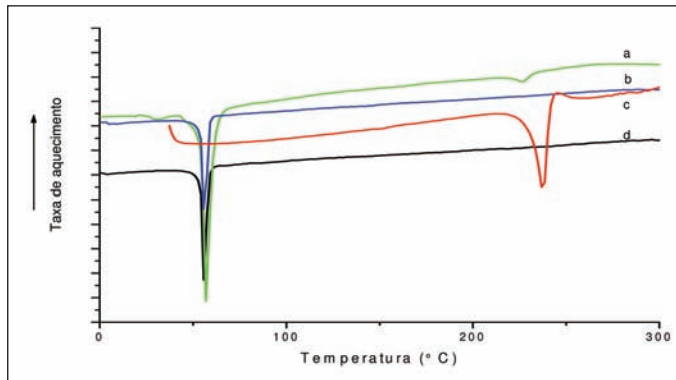


Figura 3 - Termogramas de DSC: (a) MEs contendo fármaco; (b) do polímero; (c) do fármaco; (d) das MEs sem fármaco

Tabela 1. Ponto de fusão da PCL e do AP nas amostras estudadas na DSC

Amostras	Ponto de fusão (C°)	
	Polímero (PCL)	Fármaco (AP)
Fármaco (AP)	-	236
Polímero (PCL)	55	-
MEs sem fármaco	55	-
MEs contendo fármaco (AP)	56	226

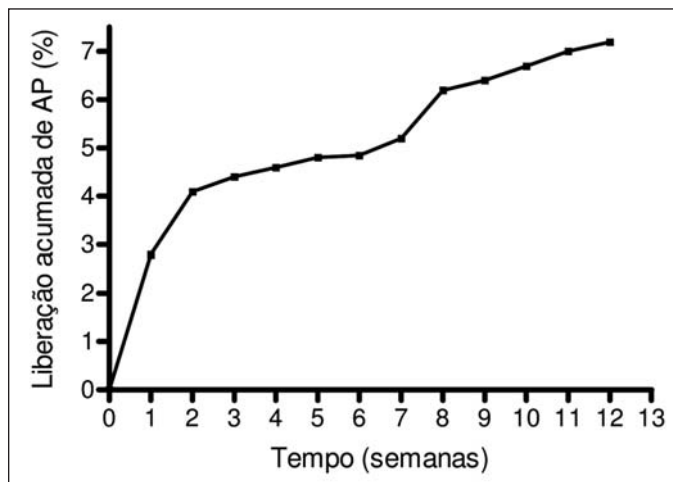


Figura 4 - Liberação acumulada do AP a partir das MEs. (Os valores são representados como média \pm desvio padrão, n=6).

estudo in vivo, já que a presença de processos metabólicos exerce uma importante influência no mecanismo de liberação do fármaco⁽²²⁻²³⁾. A partir do estudo realizado, pode-se observar que o AP foi liberado dos sistemas administrados aos animais e que concentrações significativas do fármaco foram encontradas nos principais tecidos envolvidos nas orbitopatias inflamatórias. Nota-se que a concentração de AP no tecido muscular é bem superior na primeira semana em relação às outras amostras. No entanto, a concentração do fármaco decresce nas semanas seguintes à medida que o AP tende a se acumular

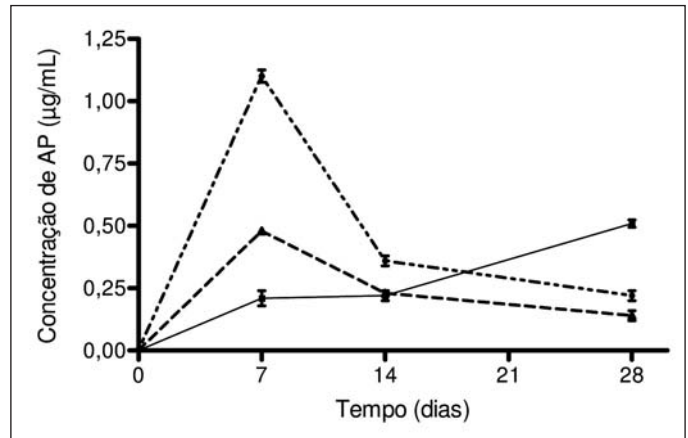


Figura 5 - Concentração de AP nos tecidos adiposo da órbita (■), músculo reto inferior (●) e vítreo (▲) após a administração de suspensão aquosa de MEs contendo AP (Os valores são representados com média \pm desvio padrão, n=4)

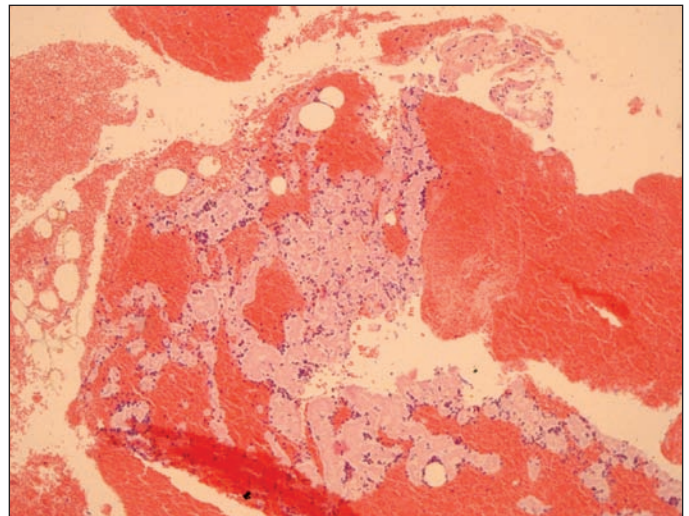


Figura 6 - Corte histológico de exenteração ocular, sem evidências de toxicidade

no tecido adiposo, muito provavelmente em decorrência de sua característica lipofílica⁽¹⁾.

A análise histológica não evidenciou sinais de toxicidade, sugerindo que o sistema desenvolvido é biocompatível com a região orbitária. Este resultado já era esperado em função da presença do AP e das conhecidas características de biocompatibilidade do polímero utilizado no preparo das MEs⁽¹⁷⁾.

CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados obtidos neste trabalho é relevante e credencia o sistema desenvolvido como uma possível alternativa ao tratamento de orbitopatias inflamatórias. No entanto, mais estudos são necessários antes que uma etapa de avaliação clínica possa ser postulada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/MEC) pelo apoio a este trabalho na forma de bolsa de Mestrado a Ricardo Martins Duarte Byrro.

ABSTRACT

Purpose: The present study aimed to evaluate an injectable extended-release formulation of prednisolone acetate (PA) for orbital administration. **Methods:** Microspheres (MEs) of poly- ϵ -caprolactone (PCL) containing PA were developed by the method of solvent evaporation. The MEs obtained were characterized by scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC), encapsulation efficiency and *in vitro* release profile. The *in vivo* release profile was evaluated in rabbits after periocular injection of an aqueous suspension of MEs. The local biocompatibility of the system was verified by histopathologic analysis of the deployment region. **Results:** After MEs preparation, morphological analysis by SEM showed the feasibility of the employed method. The content of PA encapsulated was $43 \pm 7\%$ and can be considered as satisfactory. The system characterization by DSC technique, in addition to confirm the system stability, did not indicate the existence of interaction between the drug and the polymer. The *in vitro* release study showed the prolonged-release features of the developed system. Preliminary *in vivo* study showed the absence of local toxicity and confirmed the prolonged release profile of PA from MEs, suggesting the viability of the developed system for the treatment of orbital inflammatory diseases. **Conclusion:** The results obtained in this work are relevant and accredit the system developed as a possible alternative to the treatment of inflammatory orbitopathy.

Keywords: Drug delivery systems; Drug implants/administration & dosage; Absorbable implants; Orbital diseases/drug therapy; Delayed-action preparations; Polymers; Drug carriers; Prednisolone/administration & dosage

REFERÊNCIAS

1. McGhee CN, Dean S, Danesh-Meyer H. Locally administered ocular corticosteroids: benefits and risks. *Drug Saf.* 2002;25(1):33-55.

2. Sherif Z, Pleyer U. Corticosteroids in ophthalmology: past-present-future. *Ophthalmologica.* 2002;216(5):305-15.
3. Fialho SL, Rego MGB, Cardillo JA, Siqueira RC, Jorge R, Cunha Júnior AS. Implantes biodegradáveis destinados à administração intraocular. *Arq Bras Oftalmol.* 2003;66(6):891-6.
4. Moshfeghi AA, Peyman GA. Micro- and nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(14):2047-52.
5. Fialho SL, Behar-Cohen F, Silva-Cunha A. Dexamethasone-loaded poly (ϵ -caprolactone) intravitreal implants: a pilot study. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;68(3):637-46.
6. Barnes PJ, Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci.* 1993;14(12):436-41. Comment in: *Trends Pharmacol Sci.* 1994;15(5):138-9.
7. McGinity JW, O'Donnell PB. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;28(1):25-42.
8. The United States Pharmacopeia: the National Formulary by authority of the United States Pharmacopeial Convention, Inc., Meeting at Washington, D.C., March 9-13, 2005; prepared by the Council of Experts and published by the Board of Trustees. 30th ed. Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention; c2006. (NF 25).
9. Kompella UB, Bandi N, Ayalasonmayajula SP. Subconjunctival nano- and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(3):1192-201.
10. The Association for Research in Vision and Ophthalmology - ARVO [Internet]. Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research [cited 2009 Jun 12]. Available from: <http://www.arvo.org/eweb/dynamicpage.aspx?site=arvo2&webcode=AnimalsResearch>.
11. Rönquist-Nii Y, Edlund PO. Determination of corticosteroids in tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;37(2):341-50.
12. Saliba JB, Faraco AAG, Yoshida MI, Vasconcelos WL, Silva-Cunha A, Mansur HS. Development and characterization of an intraocular biodegradable polymer system containing cyclosporine-A for the treatment of posterior uveitis. *Materials Res.* 2008;11(2):207-11.
13. Arifin DY, Lee LY, Wang CH. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(12-13):1274-325.
14. Herrero-Vanrell R, Refojo MF. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;52(1):5-16.
15. Shive MS, Anderson JM. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;28(1):5-24.
16. Kunou N, Ogura Y, Hashizoe M, Honda Y, Hyon SH, Ika Y. Controlled intraocular delivery of ganciclovir with use of biodegradable scleral implant in rabbits. *J Control Release.* 1995;37(1-2):143-50.
17. Merkli A, Tabatabay C, Gurny R, Heller J. Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. *Prog Polym Sci.* 1998;23(3):563-80.
18. Rosa DS, Lopes DR, Calil MR. Thermal properties and enzymatic degradation of blends of poly (ϵ -caprolactone) with starches. *Polymer Test.* 2005;24(6):756-61.
19. Freiberg S, Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm.* 2004;282(1-2):1-18.
20. Yasukawa T, Kimura H, Tabata Y, Ogura Y. Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;52(1):25-36.
21. Rohrs BR. Dissolution method development for poorly soluble compounds. *Dissolution Technol.* 2001;8(3):1-5.
22. Sun H, Mei L, Song C, Cui X, Wang P. The *in vivo* degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials.* 2006;27(9):1735-40.
23. Calil MR, Gaboardi F, Bardi MA, Rezende ML, Rosa DS. Enzymatic degradation of poly (ϵ -caprolactone) and cellulose acetate blends by lipase and α -amylase. *Polymer Test.* 2007;26(2):257-61.