

FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Cláudia Basto Pereira

Síntese de Implantes Biodegradáveis para Aplicação Intraocular

*Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra
para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Mestre em Engenharia Biomédica*

Orientador(es):

Doutor Jorge Fernando Jordão Coelho

Doutor Arménio Coimbra Serra

Coimbra, 2014

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com:



CIEPQPF - Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos
Produtos da Floresta



CNC - Centro de Neurociências e Biologia Celular

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que contribuíram de formas diferentes, mas não menos importantes para a concretização deste projeto.

Destaco os meus agradecimentos:

ao professor Jorge Coelho por ter sugerido este projeto, e ter dado o impulso inicial;

ao professor Arménio Serra por ter coordenado e orientado todo o trabalho desenvolvido, evidenciando sempre uma atitude de responsabilidade e de incentivo, bem como, de esclarecimento de dúvidas e de conceitos fundamentais para o processo de concretização;

ao Grupo de Investigação de Polímeros, no qual destaco a prestação da Inês Fabela e da Cátia Costa, que se mostraram cordiais e disponíveis, permitindo a minha integração e melhorias ao nível do meu desempenho;

à Mariana Monteiro e ao Carlos Moreira pela paciência e solidariedade nos momentos cruciais;

ao Pedro, à Ticha e à Jé por me terem acompanhado nos bons e nos mais críticos momentos no 2ºV;

aos amigos da terrinha, pois fi-los acreditar que é possível terminar um curso superior em Coimbra;

e, por fim, aos meus pais e restantes familiares pelo apoio incondicional dado ao longo de todo o meu percurso académico.

A todos, muito obrigada!

ABSTRACT

The main objective of this project is the development of techniques for polymer processing and immobilizing drugs to prepare a new controlled drug delivery system (CDDS) for intraocular application.

For the synthesis of biodegradable polymer implants were used polymers as poly- ϵ -caprolactone (PCL) and Lutrol F127, both promising polymers in medicine area when applied in CDDS. The development of a biodegradable CDDS has been crucial to assist in the treatment of the glaucoma's disease (leading cause of irreversible blindness and visual disability throughout the world).

So, biodegradable disk films were developed for CDDS. They were characterized according to their thermal, mechanical, physical and morphological properties and then they were prepared with encapsulating drug to subsequent studies about its release over about 20 days.

The films used in release studies were subjected to different variables like: different drugs (acetazolamide or dorzolamide), different locations where they were placed during the study, different film types (type 1 or type 2 according to its diameter and thickness), using (or not) a coating and replacement (or not) of the medium used for each reading.

Results from these studies revealed that both drugs shows a similar behavior over time, the lowest percentage of drug release is found in type 2 films, the use of the coating controls the release of the drug and, finally, placing the films in a shaker with the replacement of the medium reveals the most appropriate procedures to develop the studies, due to a closer relationship with the characteristics of the human body.

RESUMO

O principal objetivo deste projeto consiste em desenvolver técnicas de processamento de polímeros e de imobilização de fármacos para a preparação de um novo sistema de libertação controlada de fármaco (SLCF) para posterior aplicação intraocular.

Para a síntese de implantes biodegradáveis foram utilizados polímeros como a poli- ϵ -caprolactona (PCL) e o Lutrol F127, ambos promissores na área da medicina quando aplicados em SLCF. O desenvolvimento de SLCF biodegradáveis tem sido crucial para auxiliar o tratamento da doença do glaucoma (principal causa de cegueira irreversível e deficiência visual em todo o mundo).

Como tal, filmes biodegradáveis para SLCF foram desenvolvidos em forma de disco, caracterizados térmica, mecânica, física e morfológicamente, bem como processados com encapsulamento de fármaco para posteriores estudos acerca da sua libertação ao longo de cerca de 20 dias.

Os filmes utilizados nos estudos de libertação foram sujeitos a um conjunto de variáveis como diferentes fármacos (acetazolamida ou dorzolamida), diferentes locais onde estes foram colocados durante o estudo, diferentes tipos de filme (tipo 1 ou tipo 2, consoante o seu diâmetro e a sua espessura), utilização (ou não) de um revestimento e reposição (ou não) do meio utilizado a cada leitura.

Os resultados destes estudos revelaram que ambos os fármacos mostram um comportamento idêntico ao longo do tempo, que uma menor percentagem de libertação de fármaco se verifica para filmes tipo 2, que a utilização de um revestimento controla de certa forma a libertação do fármaco e que, por fim, a colocação dos filmes no shaker aliada à reposição do meio revelam-se como sendo os procedimentos mais adequados para desenvolver os estudos, devido a uma maior proximidade com as características do corpo humano.

ÍNDICE

Agradecimentos	i
Abstract.....	iii
Resumo	v
Lista de Acrónimos.....	xi
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xv
Índice de Gráficos.....	xvii
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Principais Objetivos.....	3
1.2. Sistemas de Libertação de Fármaco	3
1.2.1 Sistema de Libertação Controlada de Fármaco (SLCF) vs. Sistema Padrão de Libertação de Fármaco (SPLF).....	3
1.2.2. Controlo na Libertação de Fármaco	4
1.2.3. Espectrofotometria na Libertação de Fármaco.....	5
1.3. Polímeros	7
Poli-ε-caprolactona.....	8
Poli(oxietileno-b-oxipropileno-b-oxietileno)	9
Mistura de Polímeros: PCL e Lutrol F127	10
1.3.1. Caraterização de Polímeros	11
Análise Mecânica e Térmica de Polímeros	11
Análise Física e Morfológica da Superfície de Polímeros	13
Análise Estrutural e Química de Polímeros.....	13
1.4. Glaucoma.....	14
1.4.1. Libertação de Fármaco no Olho	15
1.4.2. Implantes Intraoculares	16
1.4.3. Fármacos.....	18
Capítulo 2 – Métodos Experimentais	19
2.1. Materiais	21
2.2. Procedimentos	21
2.2.1. Preparação de Filmes de PCL e Lutrol F127.....	21

2.2.2. Revestimento de Filmes de PCL e Lutrol F127	23
2.2.3. Preparação de Amostras Poliméricas para Caracterização.....	23
2.2.4. Curva de Calibração	24
2.2.5. Preparação de Filmes para o Estudo da Libertação de Fármaco	26
2.2.6. Libertação de Fármaco	27
2.2.7. Preparação de Lutrol F127 de Maior Peso Molecular	27
Capítulo 3 – Resultados e Discussão	29
3.1. Formação de Filmes de PCL e Lutrol F127	31
3.2. Caracterização de Amostras Poliméricas	32
Análise Mecânica e Térmica das Amostras.....	33
Análise Física e Morfológica da Superfície das Amostras.....	35
3.3. Libertação de Fármaco	38
Ensaio 1	39
Ensaio 2	40
Ensaio 3	41
Ensaio 4	41
Ensaio 5	42
Ensaio 6	43
Ensaio 7	44
Ensaio 8	44
Ensaio 9	45
Ensaio 10	46
Ensaio 11	47
Ensaio 12	47
3.4. Análise Estrutural e Química do Lutrol F127	51
Capítulo 4 – Conclusões e Perspetivas Futuras	53
4.1. Conclusões.....	55
4.2. Perspetivas Futuras	56
Referências Bibliográficas.....	57
Anexos	61
A – Evolução dos Filmes de PCL e Lutrol F127.....	63

B – Resultados da Análise de Perda de Massa dos Filmes Nr. 43 e 44 do Anexo A – Tabela A.1	70
C – Resultados da Análise do AC do Filme Nr 37 do Anexo A – Tabela A.1	70
D – Resultados da Análise de SEM do Filme Nr. 37 do Anexo A – Tabela A.1	71
E – Estudo do Comportamento do Fármaco Acetazolamida em meio de PBS.....	72
F – Resultados Obtidos nos Ensaios 11 e 12 do Estudo da Libertação de Fármaco	72
G – Resultados Obtidos para a Leitura da Absorvância de Filmes Brancos	73
H – Estrutura Química do Diisocianato-hexametileno (HDI)	74

LISTA DE ACRÓNIMOS

AC – Ângulo de Contacto

ATR - Reflexão Total Atenuada

DMF – Dimetilformamida

DMTA – Análise Dinâmica Mecânica e Térmica

DSC – Calorimetria Diferencial de Varrimento

E' – Módulo de Elasticidade

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

HDI – Diisocianato hexametileno

Lutrol F127 – Poli(oxietileno-b-oxipropileno-b-oxietileno)

PBS – Tampão Fosfato Salino

PCL – Poli- ϵ -caprolactona

PEO – Polioxietileno

PIO – Pressão Intraocular

PLA – Poli (ácido láctico)

PLGA – Poli (ácido láctico-co-glicólico)

PM – Perda de Massa

PPO – Polipropileno

SEM – Microscopia Eletrónica de Varrimento

SLCF - Sistema de Libertação Controlada de Fármaco

SLFP – Sistema de Libertação de Fármaco Padrão

SnOct₂ – Octoato Estanoso

Tan δ – Dissipação de Energia Mecânica

T_f – Temperatura de Fusão

T_g – Temperatura de Transição Vítrea

THF – Tetrahidrofurano

UV – Radiação Ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Comparação entre um SLCF e um SPLF, adaptada de ^[2,3]	3
Figura 1.2 – Representação esquemática da intensidade de luz incidente (I_0) numa cuvette (C) e intensidade de luz transmitida (I) ao longo do percurso (l), adaptada de ^[8]	6
Figura 1.3 – Curva de calibração: relação linear entre a absorvância e a concentração, adaptada de ^[8]	7
Figura 1.4-a) – Monómero, adaptada de ^[10]	7
Figura 1.4-b) – Polímero, adaptada de ^[10]	7
Figura 1.5 – Monómero ϵ -caprolactona ^[13,14]	8
Figura 1.6 – Poli- ϵ -caprolactona ^[13,14]	8
Figura 1.7 – Lutrol F127: PEO-PPO-PEO com $x=101$ e $y=56$, adaptada de ^[22,23]	9
Figura 1.8 – Mistura dos polímeros PCL e Lutrol F127, adaptada de ^[13,14,22,23]	10
Figura 1.9 – Curva de <i>DSC</i> típica para uma amostra polimérica, adaptada de ^[24]	12
Figura 1.10 - Curvas de <i>DMTA</i> típicas para uma amostra polimérica, adaptada de ^[26] . ..	12
Figura 1.11-a) – A um <i>AC</i> entre 0 e 90° corresponde uma superfície parcialmente molhável, adaptada de ^[27]	13
Figura 1.11-b) – A um <i>AC</i> maior ou igual a 90° corresponde uma superfície não molhável, adaptada de ^[27]	13
Figura 1.11-c) – A um <i>AC</i> igual a 0° corresponde uma superfície totalmente molhável, adaptada de ^[27]	13
Figura 1.11-d) – A um <i>AC</i> igual a 180° corresponde uma superfície totalmente não molhável, adaptada de ^[27]	13
Figura 1.12 – Intervalos típicos de absorção de radiação infravermelha dos diferentes grupos funcionais de polímeros, adaptada de ^[24,25,28]	14
Figura 1.13 – Seção transversal do olho humano, adaptado de ^[34]	15
Figura 1.14 – Potenciais locais para a implantação de sistemas de libertação de fármaco, adaptada de ^[3]	17
Figura 1.15-a) – Acetazolamida, adaptada de ^[46]	18
Figura 1.15-b) – Dorzolamida, adaptada de ^[47]	18
Figura 3.1 – Pequena evolução/sequência de filmes de PCL e Lutrol F127 obtidos ao longo do tempo.	31
Figura 3.2-a) – Imagem <i>SEM</i> da superfície superior de um filme tipo 1 com fármaco incorporado.	36

Figura 3.2-b) – Imagem <i>SEM</i> da superfície inferior de um filme tipo 1 com fármaco incorporado.	36
Figura 3.3-a) – Imagem <i>SEM</i> da superfície superior de um filme tipo 2 com fármaco incorporado.	37
Figura 3.3-b) – Imagem <i>SEM</i> da superfície inferior de um filme tipo 2 com fármaco incorporado.	37
Figura 3.4-a) – Imagem <i>SEM</i> da superfície superior de um filme tipo 1 depois do estudo de libertação de fármaco.	37
Figura 3.4-b) – Imagem <i>SEM</i> da superfície superior de um filme tipo 2 depois do estudo de libertação do fármaco.	37
Figura 3.5-a) – Imagem <i>SEM</i> da superfície superior de um filme tipo 1 com revestimento bopsil depois do estudo de libertação de fármaco.	38
Figura 3.5-b) – Imagem <i>SEM</i> da superfície superior de um filme tipo 2 com revestimento bopsil depois do estudo de libertação do fármaco.	38
Figura 3.6 – Revestimento bopsil desagregado do filme ao qual foi aplicado: filme, revestimento inferior, revestimento superior (sequencialmente da esquerda para a direita).	42
Figura D.1-a) – Imagem <i>SEM</i> da superfície superior do filme Nr. 37 do Anexo A – Tabela A.1.	71
Figura D.1-b) – Imagem <i>SEM</i> da superfície inferior do filme Nr. 37 do Anexo A – Tabela A.1.	71
Figura H.1 – Diisocianato-hexametileno, adaptada de ^[51]	74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Exemplos de sistemas de libertação de fármaco estudados em modelos pré-clínicos para o tratamento do glaucoma, adaptada de ^[35]	17
Tabela 2.1 – Variáveis tidas em conta durante os estudos da libertação de fármacos. ...	26
Tabela 3.1 - Filmes de PCL e Lutrol F127 com diferentes percentagens dos polímeros na sua composição e solventes utilizados.....	31
Tabela 3.2 – <i>PM</i> das amostras de PCL e Lutrol F127.	32
Tabela 3.3 – Comparação de resultados relativamente às T_g e T_f obtidas para as amostras de Lutrol F127, PCL e mistura dos dois polímeros.	35
Tabela 3.4 - Medições do ângulo de contacto da amostra de PCL e Lutrol F127.	35
Tabela A.1 – Evolução dos filmes de PCL e Lutrol F127 e das suas condições de preparação e respetiva foto.	63
Tabela B.1 – <i>PM</i> das amostras de PCL e Lutrol F27	70
Tabela C.1 – Medições do ângulo de contacto da amostra de PCL e Lutrol F127	70
Tabela F.1 – Valores discriminados dos resultados obtidos no Ensaio 11 (fármaco – dorzolamida, local – shaker, filme tipo 1, com revestimento e sem reposição de PBS). ..	72
Tabela F.2 – Valores discriminados dos resultados obtidos no Ensaio 11 (fármaco – dorzolamida, local – shaker, filme tipo 2, com revestimento e sem reposição de PBS). ..	73
Tabela G.1 – Valores de absorvância (em %) ao longo do tempo do filme branco de cada ensaio.	73

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 2.1 – Curva de calibração da acetazolamida.	25
Gráfico 2.2 – Curva de calibração da dorzolamida.	25
Gráfico 3.1 – Curvas <i>DSC</i> dos polímeros PCL e Lutrol F127 e da mistura dos dois.	33
Gráfico 3.2 – Módulo de elasticidade (E') dos polímeros PCL e Lutrol F127 e da mistura dos dois, em modo de frequência de 1 Hz.	33
Gráfico 3.3 – Dissipação de energia mecânica ($\text{Tan } \delta$) para as amostra dos polímeros PCL e Lutrol F127 e para a mistura dos dois em modo de frequência de 1 Hz.	34
Gráfico 3.4 – Liberação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 1 (fármaco – acetazolamida, local – estufa, filme tipo 1, sem revestimento e sem reposição de PBS).	39
Gráfico 3.5 – Liberação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 2 (fármaco – acetazolamida, local – estufa, filme tipo 2, sem revestimento e sem reposição de PBS).	40
Gráfico 3.6 – Liberação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 3 (fármaco – acetazolamida, local – estufa, filme tipo 1, com revestimento e sem reposição de PBS).	41
Gráfico 3.7 – Liberação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 4 (fármaco – acetazolamida, local – estufa, filme tipo 2, com revestimento e sem reposição de PBS).	41
Gráfico 3.8 – Liberação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 5 (fármaco – acetazolamida, local – shaker, filme tipo 1, sem revestimento e sem reposição de PBS).	42
Gráfico 3.9 – Liberação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 6 (fármaco – acetazolamida, local – shaker, filme tipo 2, sem revestimento e sem reposição de PBS).	43
Gráfico 3.10 – Liberação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 7 (fármaco – acetazolamida, local – shaker, filme tipo 1, com revestimento e sem reposição de PBS).	44
Gráfico 3.11 – Liberação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 8 (fármaco – acetazolamida, local – shaker, filme tipo 2, com revestimento e sem reposição de PBS).	44

Gráfico 3.12 – Liberação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 9 (fármaco – acetazolamida, local – shaker, filme tipo 1, com revestimento e com reposição de PBS).	45
Gráfico 3.13 – Liberação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 10 (fármaco – acetazolamida, local – shaker, filme tipo 2, com revestimento e com reposição de PBS).	46
Gráfico 3.14 - Liberação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 11 (fármaco – dorzolamida, local – shaker, filme tipo 1, com revestimento e sem reposição de PBS).	47
Gráfico 3.15 - Liberação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 12 (fármaco – dorzolamida, local – shaker, filme tipo 2, com revestimento e sem reposição de PBS).	47
Gráfico 3.16 – Espectro FTIR dos polímeros Lutrol F127 e Lutrol F127 com HDI.	52
Gráfico E.1 – Comportamento da acetazolamida obtido através da sua absorvância ao longo do tempo.	72

Capítulo 1

Introdução

1.1.Principais Objetivos

Os principais objetivos deste projeto consistem em:

- desenvolver técnicas de processamento de polímeros;
- desenvolver técnicas de imobilização de fármacos;
- preparar um novo sistema de libertação controlada de fármaco (SLCF);
- complementar o tratamento da doença do glaucoma, com a aplicação intraocular do SLCF.

1.2. Sistemas de Libertação de Fármaco

1.2.1. Sistema de Libertação Controlada de Fármaco (SLCF) vs. Sistema Padrão de Libertação de Fármaco (SPLF)

Um SLCF é um dispositivo que permite a introdução de uma substância terapêutica no corpo e que melhora a sua eficácia e segurança com um controlo da taxa e do tempo, consoante o local de libertação de fármaco no corpo. Neste caso, a administração do fármaco consiste na sua libertação do dispositivo para corpo e no seu consequente transporte para o local de ação, caso o dispositivo não seja implantado no local de ação do fármaco^[1, 2]. Os SLCF podem ser considerados um melhoramento dos SPLF, na medida em que os últimos apresentam uma concentração de fármaco que atinge um nível máximo e que, de seguida, diminui para um valor baixo, necessitando que uma nova dose tenha de ser administrada frequentemente, traduzindo-se numa menor eficiência. Assim, os SLCF tentam eliminar a variação da concentração do fármaco ao longo do tempo, produzindo um perfil farmacológico mais eficiente. Com um SLCF, a concentração de fármaco será mantida constante e de forma mais prolongada num intervalo de tempo^[2], como se pode confirmar na Figura 1.1:

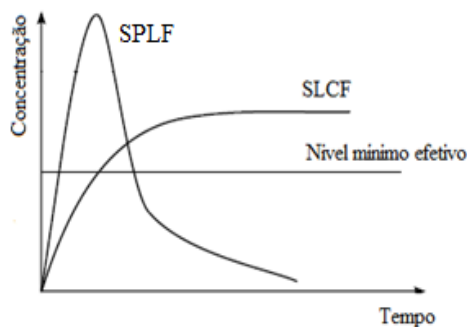


Figura 1.1 – Comparação entre um SLCF e um SPLF, adaptada de^[2, 3].

Assim, é de esperar que um SLCF apresente vantagens comparativamente a um SPLF, tais como, o prolongamento da ação do fármaco, as menores flutuações de fármaco ao nível do sangue e dos tecidos e a utilização de menores quantidades de fármaco.

No entanto, um SLCF também acarreta certas desvantagens como, por exemplo, o possível atraso no início da ação do fármaco, o risco de *burst* (libertação inicial muito extensa de fármaco), a dificuldade em ajustar a dose em alguns casos e ainda o facto de não ser um dispositivo adequado para todos os fármacos. No geral, ambos os sistemas de libertação apresentam uma grande desvantagem comum que prende-se com o facto de, uma vez implantados, a dose não poder ser ajustada e a descontinuação da terapia requerer outro procedimento cirúrgico para remover o implante, ou no caso de uma libertação crónica serem necessárias implantações repetidas^[1,2].

As diferentes limitações dos fármacos terapêuticos atualmente disponíveis têm levado a esforços para que se desenvolvam métodos alternativos de administração de modo a aumentar a sua especificidade, em particular para o caso do tratamento de doenças localizadas em órgãos específicos. Uma abordagem tida em conta para este fim é o uso de suportes poliméricos biodegradáveis para fármacos que são libertados no local da lesão durante períodos prolongados com distribuição sistémica mínima^[1].

1.2.2. Controlo na Libertação de Fármaco

O processo de libertação de fármaco pode ser conseguido através de vários mecanismos como, por exemplo, difusão, dissolução, *swelling*, osmose, degradação ou autorregulação, em que resumidamente:

- a libertação do fármaco pode ser controlada por difusão através da matriz do polímero, pois o fármaco, insolúvel e imobilizado na matriz, liberta-se quando esta entra em contato com o solvente;

- nos sistemas osmóticos, o fármaco contido numa membrana semipermeável possibilita a difusão de água através da membrana, mas não a difusão da droga, tendo em conta que a membrana contém um pequeno orifício que apenas permite a difusão do fármaco quando a pressão hidrostática do sistema é alterada;

- devido à degradação do polímero e/ou à sua dissolução, a libertação de fármaco também pode ocorrer, pois a desintegração da matriz polimérica (quer por mecanismos físicos ou químicos) vai provocar a libertação da droga incorporada;

- nos sistemas autorregulados, certos estímulos regulam a liberação de drogas (tais como temperatura, pH, ultra sons ou campos eletromagnéticos), ajustando a concentração de fármaco e do seu perfil cinético com as necessidades fisiológicas^[1, 2].

Normalmente, nos sistemas de liberação poliméricos para implantação em locais específicos, o fármaco é encapsulado num invólucro polimérico (membrana) ou numa matriz na qual o fármaco é disperso uniformemente e que serve para controlar a taxa de difusão. A maioria dos sistemas biodegradáveis é do tipo matriz polimérica, em que o fármaco é libertado através de uma combinação de difusão, erosão e degradação e/ou dissolução. Quando se verifica a combinação desses mecanismos deve distinguir-se entre a degradação da superfície e a degradação do polímero em massa. No primeiro caso, a degradação do polímero é tão rápida quanto a difusão do fármaco, enquanto no segundo, a degradação do polímero é muito mais lenta do que a difusão do fármaco^[1].

Noutra perspetiva, o controlo da liberação de fármacos também pode ser efetuado através de um revestimento na superfície do sistema, ou seja, aplicando uma camada polimérica fina ao implante como sendo um último passo do seu processamento. O revestimento envolve o dispositivo funcionando como uma barreira que protege o implante do ataque ambiental, pois esta atua como uma barreira de difusão adicional para o transporte de fármaco^[2, 4]. O revestimento é, então, considerado como uma estratégia adicional para diminuir/remover o *burst* inicial, sendo os polímeros mais utilizados para o efeito os poliuretanos, os silicones, os acrilatos e os uretanos acrilados^[4].

1.2.3. Espectrofotometria na Liberação de Fármaco

A espectroscopia é uma técnica que mede a interação das moléculas com a radiação eletromagnética. A luz próxima do ultravioleta (UV) e do visível do espectro eletromagnético apresenta uma energia de cerca de 150 a 400 kJ/mol. Essa energia da luz é utilizada para promover eletrões do seu estado fundamental para um estado excitado. Existe então uma correspondência entre diferentes tipos de radiação eletromagnética e uma dada transformação molecular que depende da separação energética entre os dois estados da molécula envolvida^[5, 6].

Um espectrofotómetro é um instrumento que possui um sistema ótico que dispersa a radiação eletromagnética incidente e permite medir a quantidade de radiação transmitida em determinados comprimentos de onda. Os espectrofotómetros de

laboratório contêm normalmente duas fontes de luz: uma lâmpada de deutério, que emite luz na região do UV e uma lâmpada de tungstênio-halogéneo para a região do visível. Depois de passar através de um monocromador, a luz é focada na cuvete (célula de quartzo) e a quantidade de luz que passa através da amostra é detetada por um fotomultiplicador. Em instrumentos de feixe duplo, uma cuvete com tampão é colocada no feixe de referência e a sua absorvância é subtraída à medida feita pela amostra^[5-7].

Quando um feixe de luz passa através de uma substância ou de uma solução, uma parte da luz pode ser absorvida e a restante transmitida através da amostra. O fator de transmitância pode, então, ser calculado pela fração da intensidade da luz que entra na amostra (I_0) e pela que sai da amostra (I) (Figura 1.2) a um comprimento de onda particular^[5-8]:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (\text{Eq. 1.1}).$$

A absorvância (A) de uma amostra é o logaritmo negativo da transmitância, ou seja:

$$A = -\log T \quad (\text{Eq.1. 2}).$$

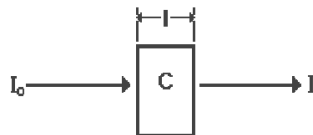


Figura 1.2 – Representação esquemática da intensidade de luz incidente (I_0) numa cuvete (C) e intensidade de luz transmitida (I) ao longo do percurso (l), adaptada de^[8].

Segundo a Lei de *Beer-Lambert*, para uma solução ideal existe uma relação linear entre a concentração e a absorção, desde que o comprimento do percurso seja mantido constante (l), então:

$$A = \varepsilon \times \text{concentração} \times l \quad (\text{Eq. 1.3}),$$

sendo ε o coeficiente de absorção, constante para cada molécula para cada comprimento de onda^[5-8].

Assim, a concentração de uma substância em solução pode ser determinada diretamente a partir da sua absorvância utilizando a Eq. 1.3.

Desde que o coeficiente de absorção e o comprimento do percurso sejam constantes para um conjunto de amostras é possível obter-se um gráfico da absorvância

da amostra e da concentração da substância absorvente, que deve resultar numa linha reta (curva de calibração), Figura 1.3. Assim, na prática, com uma curva de calibração preparada através da representação gráfica da absorção das amostras padrão em função da sua concentração, a absorvância de uma amostra desconhecida pode ser medida e a concentração do componente de absorção quantificada a partir dessa relação linear^[8].

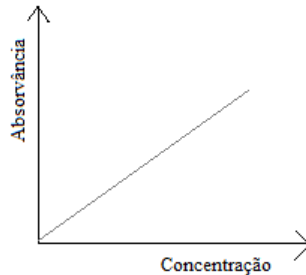


Figura 1.3 – Curva de calibração: relação linear entre a absorvância e a concentração, adaptada de^[8].

1.3. Polímeros

Concretamente na área da medicina, os polímeros têm sido recentemente utilizados em engenharia de tecidos, como sistemas de micro ou nano-partículas, implantes, fibras, entre outros, podendo ainda ser projetados para sistemas de libertação controlada e localizada de uma droga específica.

Um polímero é uma macromolécula com uma estrutura bem definida. É um material composto por uma longa cadeia de moléculas na qual a unidade de repetição, o monómero, é repetida ao longo da cadeia^[9, 10], como se exemplifica nas seguintes Figuras 1.4-a) e 1.4-b):



Figura 1.4- a) – Monómero, adaptada de^[10]. Figura 1.4-b) – Polímero, adaptada de^[10].

Da mesma maneira que os polímeros têm desenvolvido um papel importante em diversas áreas, os biopolímeros também. Apesar de não haver uma definição única de biopolímeros, estes podem ser considerados polímeros produzidos por organismos vivos, polímeros naturalmente encontrados na natureza, polímeros naturais produzidos por fermentação bacteriana ou mesmo polímeros produzidos a partir de fontes

renováveis. Muitos biopolímeros são também polímeros biodegradáveis, de origem natural (vegetal, bacteriana ou animal) ou sintética (fontes fósseis ou fontes renováveis), cuja degradação é feita por ação de microrganismos ou por atividade biológica^[9-11].

Assim, estes polímeros podem vir a proporcionar um aumento na eficácia terapêutica e na farmacocinética de fármacos quando aplicados a novos sistemas de libertação de fármaco. Nesta perspetiva, os polímeros biodegradáveis são de interesse primordial, devido à sua grande vantagem da eliminação de metabolitos, como já referido, e ainda por imitarem a matriz extracelular, uma entidade estrutural complexa que rodeia e suporta as células^[11, 12].

Poli-ε-caprolactona

Entre vários polímeros biodegradáveis sintéticos, a poli-ε-caprolactona (PCL), é um dos polímeros mais promissores quando aplicado em sistemas de libertação de fármacos. A PCL é um polímero alifático, semicristalino e hidrofóbico, cuja unidade de repetição é a ε-caprolactona, constituída por um éster cíclico, um membro da família das lactonas, com um anel de sete átomos e com a fórmula $(\text{CH}_2)_5\text{CO}_2$ ^[13, 14], de acordo com a seguinte Figura 1.5:

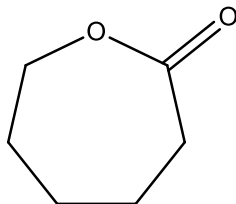


Figura 1.5 – Monómero ε-caprolactona^[13, 14].

Assim, a PCL pode ser obtida facilmente a partir do seu monómero por polimerização em abertura de anel, usando uma variedade de espécies aniónicas, cationicas e catalisadores ou ainda por ativação do monómero, apresentando-se de forma linear^[13-16], como se verifica na Figura 1.6:

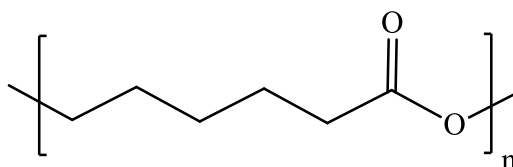


Figura 1.6 – Poli-ε-caprolactona^[13, 14].

Este polímero apresenta características como temperaturas de transição vítrea (T_g) e de fusão (T_f) baixas, facilidade de processamento, elevado alongamento na rutura e

baixo módulo, cujos valores são adequados para a sua aplicação em medicina. A PCL é ainda não-tóxica e, como tal, é compatível com vários tecidos do corpo humano, o que a torna um material ideal para aplicações em engenharia de tecidos^[12, 16-18]. Além de não-tóxica, a PCL é também biocompatível e biodegradável. São características igualmente importantes, uma vez que a sua compatibilidade com uma vasta gama de fármacos permite a distribuição uniforme da droga na matriz e a sua degradação a longo prazo facilita a libertação da droga até vários meses^[19, 20].

É ainda possível adicionar grupos funcionais ou criar misturas de polímeros para tornar o polímero mais hidrofílico, mais resistente e ainda mais biocompatível, permitindo respostas celulares mais favoráveis. Sendo a degradação do homopolímero da PCL muito lenta em comparação com outros poliésteres, este polímero numa mistura apropriada tornar-se-á ainda mais adequado para sistemas de libertação de fármacos a longo prazo^[16].

Poli(oxietileno-b-oxipropileno-b-oxietileno)

O poli(oxietileno-b-oxipropileno-b-oxietileno) é um copolímero em tribloco com grupos funcionais –OH terminais, anfifílico e biodegradável. Este polímero geralmente denominado por pluronico é normalmente utilizado como surfactante (agente ativo superficial) e as suas aplicações podem variar consoante a proporção de polioxietileno (PEO), de polipropileno (PPO) e do peso molecular do copolímero^[13, 14, 21]. Entre os vários pluronicos existentes, o escolhido para o presente projeto foi o Lutrol F127 (Figura 1.7).

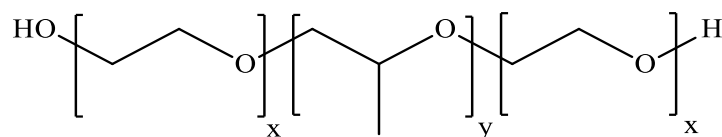


Figura 1.7 – Lutrol F127: PEO-PPO-PEO com x=101 e y=56, adaptada de^[22, 23].

Os surfactantes não-iónicos são promissores quando aplicados em sistemas para libertação de fármacos e o Lutrol F127 não é exceção pela sua capacidade de modulação da libertação. Mais concretamente, a adição do Lutrol F127 irá proporcionar um aumento na capacidade do fármaco permanecer estável numa matriz polimérica, pelo facto de ser um composto simultaneamente hidrofílico (PEO) e hidrofóbico (PPO).

Estudos têm sido feitos que analisam a capacidade que o Lutrol F127 apresenta em libertar um fármaco a partir da sua matriz ao longo do tempo, pois para um dispositivo de libertação ser eficaz, este deve ser capaz de permitir que quantidades apreciáveis de fármaco se difundam para o corpo.

Mistura de Polímeros: PCL e Lutrol F127

Sistemas poliméricos podem conter mais do que um componente, existindo diversas razões para se incorporarem materiais adicionais a polímeros puros, sendo uma delas a alteração de propriedades do polímero original de acordo com os requisitos necessários para a finalidade do produto. Quando dois ou mais polímeros são misturados obtém-se uma mistura denominada de *blend*^[9, 10].

Para descrever uma mistura de polímeros é necessário perceber a interação dos materiais a nível molecular, as condições a que a mistura se forma e o seu comportamento. As misturas de polímeros podem ser miscíveis ou imiscíveis e tal significa que, para misturas miscíveis, as condições de mistura e a química dos componentes permitem que os dois polímeros se misturem completamente a nível molecular e que, para misturas imiscíveis, os dois componentes permanecem em fases separadas com uma estrutura não-homogénea^[9, 10, 24].

As propriedades excelentes da PCL aliadas às características de outros materiais como o Lutrol F127 resultam em materiais inovadores que podem, então, ser aplicados em sistemas de libertação controlada de fármacos (Figura 1.8)^[9, 10].

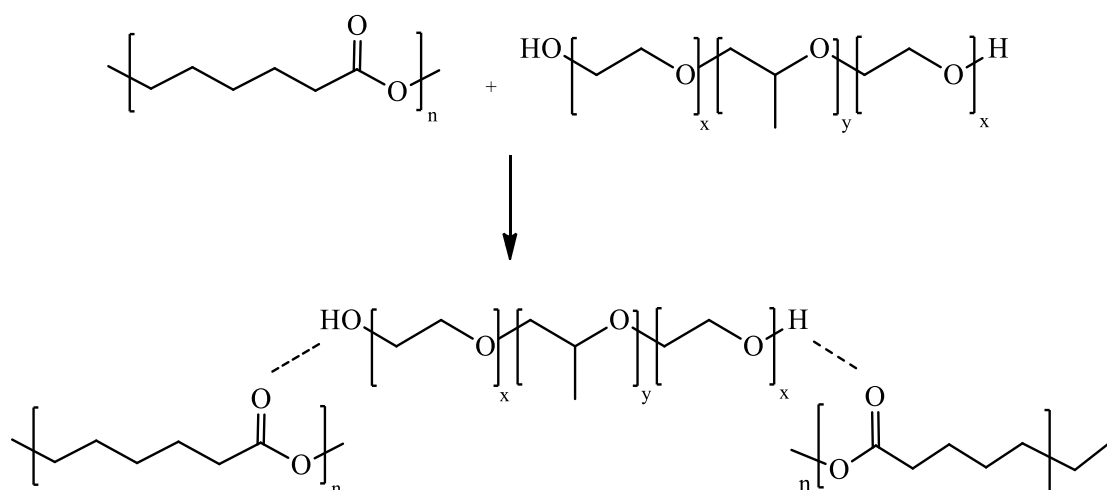


Figura 1.8 – Mistura dos polímeros PCL e Lutrol F127, adaptada de^[13, 14, 22, 23].

1.3.1. Caracterização de Polímeros

Após a síntese dos sistemas poliméricos de PCL e Lutrol F127 foi essencial caracterizá-los dinamicamente e termicamente a partir da Perda de Massa, da Calorimetria Diferencial de Varrimento e da Análise Dinâmica Mecânica e Térmica e ainda caracterizá-los física e morfologicamente, em relação às suas superfícies recorrendo às técnicas de medição de Ângulos de Contacto e à Microscopia Eletrónica de Varrimento. A análise de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier foi também utilizada numa análise estrutural e química efetuada ao Lutrol F127.

Análise Mecânica e Térmica de Polímeros

A Perda de Massa (*PM*) de um polímero está relacionada com a sua degradação ao longo do tempo. Neste caso, essa degradação inicia-se no momento em que a amostra entra em contato com um meio. Ao longo do tempo as propriedades do filme vão-se alterando, com consequente perda de massa^[2, 24]. Esta pode ser calculada da seguinte forma:

$$PM (\%) = \frac{m_i - m_s}{m_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 1.4}),$$

sendo m_i a massa inicial do filme e m_s a massa da amostra seca depois de um certo tempo de imersão.

A Calorimetria Diferencial de Varrimento (*DSC*) é uma análise térmica que descreve o comportamento dum amostra em função da temperatura, tornando possível comparar e avaliar amostras poliméricas. Nesta análise, duas amostras (a amostra polimérica que se pretende analisar e uma amostra de um material de referência) são submetidas a condições de temperatura idênticas, num ambiente que é aquecido ou arrefecido, a uma velocidade controlada. As curvas de *DSC* são traçadas em função do tempo ou da temperatura a uma taxa de aquecimento constante^[24-27].

A Figura 1.9 apresenta uma curva típica obtida para uma amostra de polímero, onde diferentes tipos de eventos térmicos podem ser identificados.

A Análise Dinâmica Mecânica e Térmica (*DMTA*) é uma técnica que possibilita determinar o módulo de elasticidade (E') de um material e as suas características de

amortecimento ou de dissipação de energia mecânica ($\text{Tan } \delta$), em função da frequência e da temperatura. Nesta análise, a amostra é submetida a uma força mecânica sinusoidal (resistência), a qual induz uma extensão correspondente no material (deformação), durante um determinado intervalo de temperatura, dando a informação do seu comportamento viscoelástico^[24-27]. Para além dos parâmetros já mencionados, a análise *DMTA* permite também determinar a T_g e ainda transições secundárias da amostra.

A Figura 1.10 apresenta o comportamento termomecânico típico de um polímero, com ênfase para a determinação da T_g .

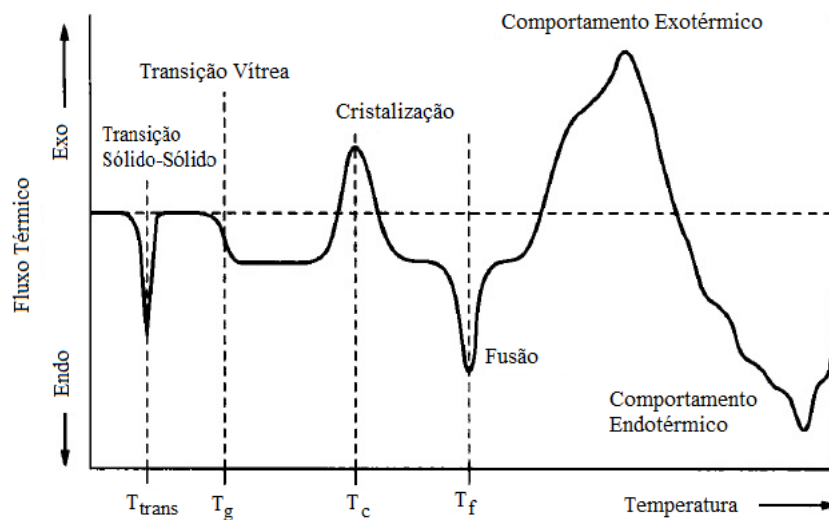


Figura 1.9 – Curva de *DSC* típica para uma amostra polimérica, adaptada de^[24].

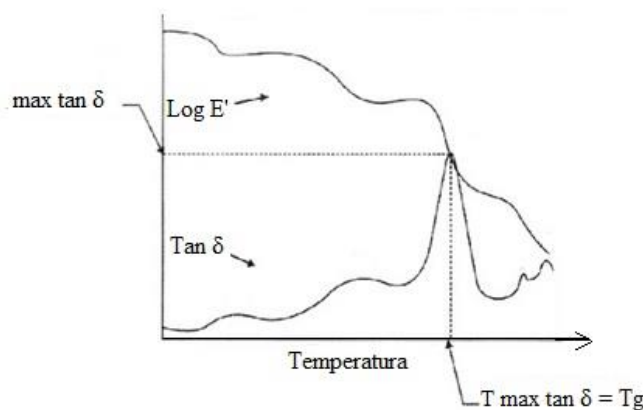


Figura 1.10 – Curvas de *DMTA* típicas para uma amostra polimérica, adaptada de^[26].

Análise Física e Morfológica da Superfície de Polímeros

Para avaliar as superfícies em questão foi utilizado o aparelho medidor de Ângulos de Contacto (AC), em que uma gota de água cai na superfície, caracterizando-a consoante o modo como o volume da gota de água se acomoda ou se espalha na superfície^[24] (Figuras 1.11-a), b), c) e d)).

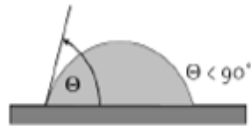


Figura 1.11 -a) – A um AC entre 0 e 90° corresponde uma superfície parcialmente molhável, adaptada de^[27].

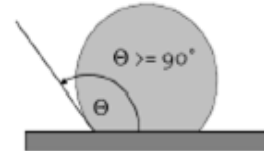


Figura 1.11-b) – A um AC maior ou igual a 90° corresponde uma superfície não molhável, adaptada de^[27].



Figura 1.11-c) – A um AC igual a 0° corresponde uma superfície totalmente molhável, adaptada de^[27].

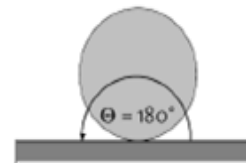


Figura 1.11-d) – A um AC igual a 180° corresponde uma superfície totalmente não molhável, adaptada de^[27].

A Microscopia Eletrónica de Varrimento (*SEM*) é uma técnica que permite analisar a superfície com alta ampliação e profundidade, utilizando um microscópio de eletrões em vez de luz para formar uma imagem, clara e concisa. A combinação de uma ampliação maior, de uma maior profundidade de foco, e de uma maior resolução tornam esta técnica num instrumento bastante útil na análise do domínio particular do polímero (topografia de superfícies, microestruturas, defeitos estruturais, interfaces e particularidades)^[24, 26].

Análise Estrutural e Química de Polímeros

A análise de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) é das técnicas mais utilizadas em Espectroscopia de Infravermelho. Esta permite a identificação e a caracterização dos grupos funcionais presentes na amostra de polímero, baseando-se na vibração dos átomos causada pela sua irradiação por radiação de infravermelhos. Quando a radiação de infravermelhos intercepta a amostra, um espectro onde se analisa a fração da radiação incidente que é absorvida numa gama particular de energia pode ser obtido. Cada grupo funcional tem uma frequência de

vibração específica correspondente a um pico de energia distinto, permitindo a sua identificação no espectro^[24, 25, 28].

A seguinte Figura 1.12 apresenta os intervalos típicos de absorção dos diferentes grupos funcionais.

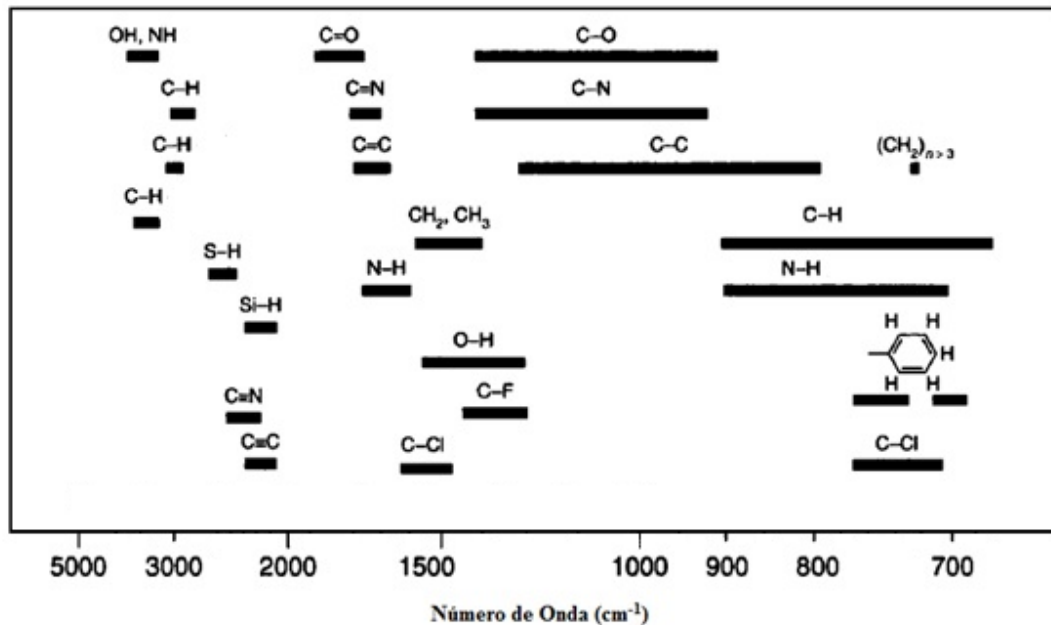


Figura 1.12 – Intervalos típicos de absorção de radiação infravermelha dos diferentes grupos funcionais de polímeros, adaptada de^[24, 25, 28].

1.4. Glaucoma

O glaucoma é a principal causa de cegueira irreversível e deficiência visual em todo o mundo. É conhecido como uma doença multifatorial e neurodegenerativa caracterizada pela degeneração progressiva das células ganglionares da retina que formam o nervo ótico (Figura 1.13). Estima-se que até 2020, cerca de 80 milhões de pessoas em todo o mundo sejam afetadas por esta doença e espera-se que haja um aumento de 50% no número de pessoas afetadas nos próximos 15 anos, devido à expansão da população envelhecida^[29-33].

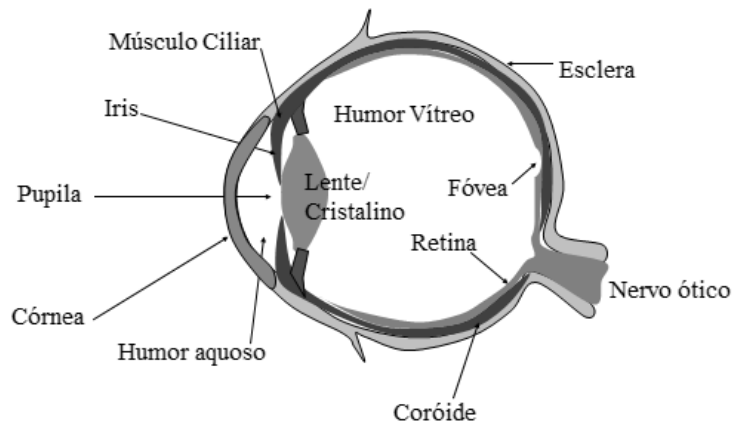


Figura 1.13 – Seção transversal do olho humano, adaptado de^[34].

Intervenções terapêuticas eficazes devem ter em conta a vulnerabilidade subjacente à degeneração das células ganglionares da retina tal como a correção de outros fatores de risco associados, como a pressão intraocular (PIO) elevada.

A PIO elevada é um importante fator de risco associado ao aparecimento e à progressão do glaucoma. No entanto, apenas o tratamento para a manutenção da PIO não será suficiente para controlar a doença, pelo facto de em muitos casos de glaucoma não estar apenas associado o aumento da PIO, de noutros casos o aumento da PIO não resultar em glaucoma e ainda por haver outros casos em que a progressão do glaucoma não pode ser controlada pela regulação da PIO^[35, 36].

Contudo, os ensaios clínicos concebidos para avaliar a eficácia do tratamento do glaucoma centram-se na redução da PIO como prevenção da perda de campo ótico e dano no nervo ótico, que pode ser alcançada através de uma redução na produção do humor aquoso e/ou através dum aumento de fluxo aquoso. A obtenção de resultados terapêuticos está, então, dependente de sistemas de libertação adequados que possam superar barreiras anatómicas e fisiológicas para a libertação de fármaco intraocular, utilizando fármacos que possuam agentes capazes de diminuir a pressão intraocular^[35, 36].

1.4.1. Libertação de Fármaco no Olho

O olho é um órgão pouco acessível a fármacos ou a terapias. Métodos não invasivos de libertação de fármaco no olho passam pela sua administração tópica ou sistémica, utilizadas para atingir tanto o segmento anterior (córnea, câmara anterior, íris, cristalino e corpo ciliar) como posterior (humor vítreo, epitélio pigmentado da retina,

retina e coróide) do olho, cuja administração tópica se mostra mais eficaz no segmento anterior e a sistémica no posterior^[35, 37].

O glaucoma pode ser tratado por administração tópica (gotas, suspensões ou pomadas para olhos), mas a administração sistémica torna-se uma terapia conjunta quando a tópica não é suficiente. Relata-se que menos de 5% do fármaco administrado topicamente entra no olho, devido à fraca permeabilidade e à perda de grande quantidade de fármaco através de diversos mecanismos, como é o exemplo da lacrimação^[3, 35, 37].

Como tal, para otimizar a ação dos SLCF no olho para o tratamento do glaucoma, estes devem ter certas características como, por exemplo, a libertação de fármaco no segmento desejado do olho, a adaptação da libertação de fármaco para a progressão natural da doença, a obtenção de elevada biodisponibilidade de fármaco na região ocular, a administração de fármaco sem interferir com a visão e a garantia de aceitação do paciente, introduzindo sistemas de libertação seguros e não tóxicos^[35].

1.4.2. *Implantes Intraoculares*

Há uma grande variedade de dispositivos implantáveis biocompatíveis que incluem dispositivos não degradáveis e biodegradáveis, como por exemplo, filmes, discos e matrizes poliméricas de diferentes formas e tamanhos, cujo objetivo seja a libertação de fármaco no segmento posterior do olho^[38, 39]. Implantes não degradáveis podem fornecer um controlo mais preciso da libertação de fármaco e períodos de libertação mais longos que os implantes biodegradáveis, no entanto, exigem uma cirurgia adicional para a sua remoção, embora ambos os dispositivos sejam considerados alternativas às injeções intravítreas repetidas, possuindo, então, a capacidade de modular a libertação de fármaco e estender a durabilidade da terapia intraocular^[35, 40].

Alguns exemplos de implantes de libertação controlada utilizados em alguns modelos pré-clínicos de tratamento do glaucoma são apresentados na Tabela 1.1. Embora haja um número relativo de sistemas implantáveis a ser estudado para aplicação intraocular, ainda nenhum foi comercializado para o tratamento da doença do glaucoma.

Tabela 1.1 – Exemplos de sistemas de libertação de fármaco estudados em modelos pré-clínicos para o tratamento do glaucoma, adaptada de^[35].

Tipo de implante	Fármaco libertado	Duração da libertação de fármaco	Método de libertação	Referência
Filme biodegradável de PLGA	Ácido etacrínico	10 dias	Implantado na esclera	[41]
Disco biodegradável de PCL + Lutrol F127	Hidrocloreto de dorzolamida	6 -12 meses	Implantação subconjuntival	[36]
Microesferas de PLGA + PLA	Maleato de timolol	3-4 meses	Injeção subconjuntival	[42]
Lipossomas	Latanoprost	2-3 meses	Injeção subconjuntival	[43]

Estes implantes podem ser colocados em vários locais do olho com a finalidade de proporcionar uma libertação controlada e sustentada do fármaco. Na Figura 1.14 estão identificados os potenciais locais de administração ocular de sistemas de libertação de fármaco, sendo eles, por implantação via intravítreal, supracoroidal, subconjuntival, intraescleral, sub-retinal ou na lente/cristalino e administração tópica.

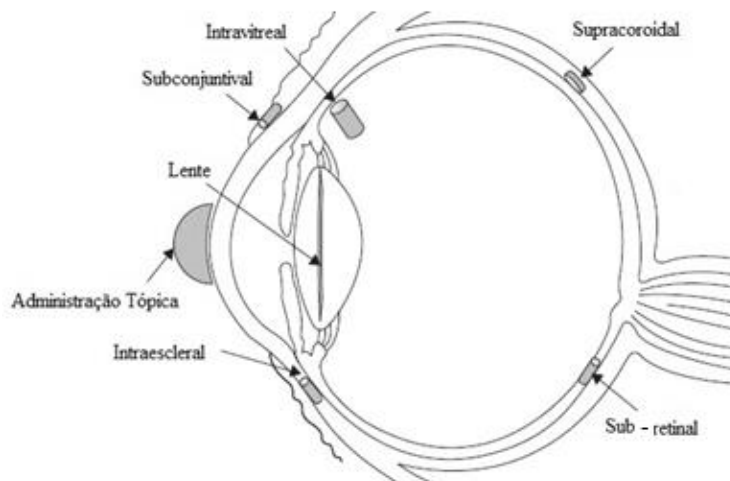


Figura 1.14 – Potenciais locais para a implantação de sistemas de libertação de fármaco, adaptada de^[3].

A libertação de fármaco no olho utilizando implantes intraoculares apresenta a vantagem de não haver perda de fármaco no transporte do mesmo até ao olho, não sendo necessário enfrentar diversas barreiras, o que acontece na administração tópica e sistémica. Apresenta ainda outras vantagens como, por exemplo, um controlo sobre a taxa de libertação, evitando a exposição a doses tóxicas; menores quantidades de

fármaco disponíveis para períodos de tratamento semelhantes aos tradicionais, permitindo uma dosagem menos frequente e a eliminação da necessidade de automedicação do paciente^[2].

1.4.3. Fármacos

Tendo em conta a aplicação dos SLCF, os fármacos com maior interesse serão aqueles que possuem agentes capazes de diminuir a PIO, pois o seu aumento é considerado um fator de risco na lesão do nervo ótico e na perda do campo visual/cegueira provocada por diferentes tipos de glaucoma^[44].

Esses fármacos podem ser agentes inibidores da anidrase carbónica (acetazolamida e dorzolamida), bem como bloqueadores-beta (maleato de timolol) ou análogos de prostaglandina (latanoprost). A inibição da anidrase carbónica nos processos ciliares do olho diminui a secreção do humor aquoso, resultando numa redução da pressão intraocular; os bloqueadores-beta são capazes de diminuir a produção aquosa ligando-se aos recetores-beta (que quando estimulados facilitam a produção aquosa no olho) e o mecanismo de redução da PIO utilizando análogos de prostaglandina envolve o aumento do fluxo uveoscleral, ampliando os espaços intercelulares no corpo ciliar^[2, 44, 45].

Os fármacos, acetazolamida (Figura 1.15-a)) e dorzolamida (Figura 1.15-b)), serão utilizados para estudos de libertação controlada em filmes de PCL e Lutrol F127. No entanto, o fármaco com mais interesse em se utilizar na preparação dos filmes de PCL e Lutrol F127 seria o latanoprost, caso estivesse disponível para tal.

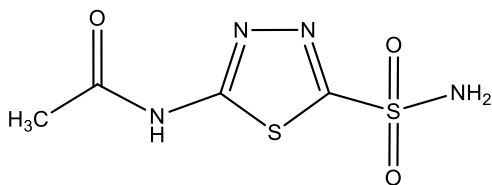


Figura 1.15 -a) – Acetazolamida, adaptada de^[46].

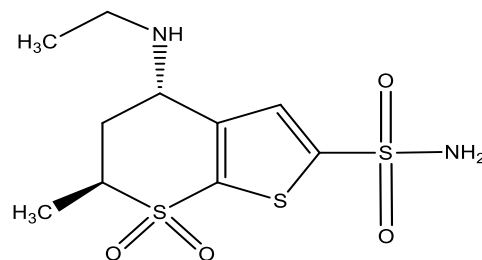


Figura 1.15-b) – Dorzolamida, adaptada de^[47].

Capítulo 2

Métodos Experimentais

2.1. Materiais

Os reagentes utilizados na preparação dos sistemas de libertação de fármaco (filmes de PCL/Lutrol F127) foram a PCL (70000-90000 g/mol por GPC) e o octoato estanoso, SnOct₂, (405,12 g/mol e pureza de 95%) fornecidos pela *Sigma-Aldrich*, a PCL CAPA 6500 (50000 g/mol) fornecida pela *Perstorp*, o Lutrol F127 (9000-14000 g/mol, 70 % de PEO) fornecido pelo *Grupo BASF* e o diisocianato-hexametileno, HDI, (168,20 g/mol e pureza de 98%) fornecido pela *TCI*.

Quando necessário, para o revestimento dos filmes foi utilizado o bopsil, um elastómero de silicone de condensação, fluido, que reticula à temperatura ambiente, formando uma película protetora elástica que adere ao filme, fornecido pela *C2M AUROCHS Industrie*^[48].

Como Solventes foram utilizados a acetona (58,08 g/mol e pureza de 99,9%) fornecida por José Manuel Gomes dos Santos, LDA, o clorofórmio (119,38 g/mol e pureza de 99,98%), o éter dietil (74,12 g/mol e pureza de 99,97%) e o éter de petróleo 40°C – 60°C (86,18 g/mol e pureza de 95%) da *Fisher Chemical*.

O tampão fosfato salino (PBS) em cápsula (pH 7.4, 10 mM fosfato, 137 mM sódio, 2.7 mM potássio) foi usado para preparar o meio de libertação dos fármacos e foi fornecido pela *Sigma-Aldrich*.

Os fármacos escolhidos foram a Acetazolamida ($\geq 99\%$) e a Dorzolamida ($\geq 98\%$ HPLC) ambos na forma de pó e fornecidos pela *Sigma-Aldrich*.

Todos os reagentes, revestimento, solventes e fármacos foram utilizados conforme recebidos sem qualquer alteração ou purificação.

2.2. Procedimentos

2.2.1. Preparação de Filmes de PCL e Lutrol F127

Foram preparados vários filmes de PCL/Lutrol F127 por evaporação de solvente (acetona, clorofórmio ou mistura dos dois), com diferentes percentagens destes polímeros na sua composição, com as seguintes relações entre eles: PCL_50%+Lutrol F127_50%, PCL_66%+Lutrol F127_33%, PCL_75%+Lutrol F127_25%, PCL_100% e Lutrol F27_100%, tendo por base um trabalho de investigação já desenvolvido^[2].

A reprodução exata do procedimento desse trabalho para a preparação de filmes de PCL e de Lutrol F127 não revelou resultados com qualidade satisfatória para a utilização desses filmes como SLCF, pelo que foi necessário alterar o procedimento original, de modo a melhorar a qualidade do material final.

O procedimento foi alterado ao longo do tempo com o objetivo de ser otimizado. Para se otimizar esse procedimento foi necessário estudar a influência das diferentes percentagens de polímero na composição dos filmes, dos diferentes solventes e ainda dos tempos de dissolução dos polímeros nesses solventes. O aspeto final destes filmes encontra-se no Anexo A – Tabela A.1 onde é possível observar-se a evolução tanto do processamento utilizado, bem como dos resultados obtidos em cada filme, considerando diferentes condições de reação para determinar que o método de preparação descrito de seguida é o melhor.

Ao longo do tempo foi constatado que uma otimização na preparação destes filmes seria conseguida ao dissolver a PCL em clorofórmio, utilizando o aparelho de ultrassons (*TRU-SWEEP Ultrasonic Cleaner 275D, CREST*) a 40°C durante 45 minutos, seguindo-se de agitação magnética (cerca de 400 rpm), à temperatura ambiente, durante mais 15 minutos. De seguida, adicionar o Lutrol F127 e colocar a solução novamente no aparelho de ultrassons e em agitação magnética nas mesmas condições já referidas. De considerar que a concentração total de polímero ideal seria de 12% (m/V) e que a relação entre polímeros na sua composição de PCL_50%+Lutrol F127_50%.

Por fim, transferir a solução resultante para uma caixa de petri ou molde de vidro (consoante o tamanho de interesse do filme), variando a quantidade da solução por caixa ou molde de acordo com a espessura desejada para o filme e colocar na hote até ao dia seguinte, para a evaporação do solvente, coberto por papel de filtro. No dia seguinte poderá ser possível que o filme esteja ligeiramente enrolado e, se tal acontecer, a solução será colocar outra peça de vidro por cima da superfície superior, pressionando o filme (agora contra duas superfícies de vidro) e colocar numa estufa a 50°C durante três dias. Mesmo que o filme não fique com uma ligeira ondulação será aconselhável colocar outra peça de vidro por cima e, de seguida, colocar também na estufa a 50°C.

Caso a preparação dos filmes inclua um dos fármacos em questão, a adição deste será feita ao solvente antes da PCL, mantendo-se o restante procedimento. No entanto, a preparação de filmes com fármaco, tendo em conta a sua aplicação, não necessita de ser feita em moldes tão grandes quanto as caixas de petri, sendo utilizados tubos de vidro

com diâmetro 12 mm e 10 mm. Assim, o filme resultante não terá tamanho suficiente para enrolar, não haverá desperdício na utilização do fármaco, nem será necessário cortar um filme maior em filmes mais pequenos, evitando-se a existência de bordos recortados que poderão facilitar de forma indesejada a libertação do fármaco do mesmo.

2.2.2. Revestimento de Filmes de PCL e Lutrol F127

Após a sua preparação, alguns dos filmes com fármaco foram revestidos por uma camada polimérica fina, como sendo um último passo do seu processamento.

Um dos revestimentos foi preparado dissolvendo a PCL (12% m/V) em clorofórmio, utilizando o aparelho de ultrassons a 40°C durante 45 minutos, seguindo-se de agitação em placa (cerca de 400 rpm), à temperatura ambiente, durante mais 15 minutos. O outro revestimento utilizado foi o silicone bopsil na sua forma viscosa (pré-polímero).

Os filmes foram mergulhados nas soluções dos respetivos revestimentos e pousados em suportes individuais de plástico para que não aderissem ao revestimento, cobrindo o filme na totalidade ao secar em contacto com o ar. Depois de seco, o excesso de polímero foi retirado, cortando a película fina o mais próximo possível do filme sem que o mesmo ficasse com falhas ao nível do revestimento. No entanto, o primeiro tipo de revestimento não foi utilizado nos estudos seguintes, pelo facto do filme se dissolver ao ser mergulhado na solução de PCL e clorofórmio e ficar perfurado depois de seco.

2.2.3. Preparação das Amostras Poliméricas para Caracterização

Perda de Massa

A análise da perda de massa com a duração de um mês foi efetuada com a colaboração da Universidade do Porto aos filmes Nr. 40, 43 e 44, de acordo com o Anexo A – Tabela A.1, embora os resultados dos dois últimos apenas se encontrem no Anexo B – Tabela B.1.

DSC

Os testes da análise *DSC* foram feitos utilizando o equipamento Q100 da *TA Instruments*, a partir de -80°C até 180°C com uma taxa de aumento da temperatura de

10°C/min e com um fluxo de azoto constante. O filme utilizado nesta análise o filme Nr. 36 de acordo com o Anexo A – Tabela A.1.

DMTA

Esta análise foi efetuada utilizando o equipamento *Tritec 2000 da Triton Technology* com uma taxa de aquecimento de 5°C/min de -150°C a 150°C em modo multifrequência (1Hz e 10Hz). O filme utilizado nesta análise foi o filme Nr. 36 de acordo com o Anexo A – Tabela A.1.

Ângulo de Contacto

A medição dos ângulos de contato entre os filmes preparados e a água foi feita com o equipamento *OCA 20 da Dataphysics*, cujos testes foram realizados sobre as superfícies das amostras, utilizando o modo estático. Esta análise foi efetuada aos filmes Nr. 36 e 37 de acordo com o Anexo A – Tabela A.1, embora os resultados obtidos para o Nr. 37 apenas estejam disponíveis no Anexo C – Tabela C.1.

SEM

Para a análise *SEM* foi necessário preparar previamente os filmes com um revestimento de ouro, tornando o meio condutor à passagem da corrente de eletrões na amostra. A análise foi feita com uma inclinação entre 30° e 40° e com uma ampliação de 350X, utilizando o equipamento *JSM 5310 da Jeol*. Esta análise foi efetuada ao filme Nr. 37 do Anexo A – Tabela A.1, cujos resultados estão presentes no Anexo D – Figuras D.1-a) e D.1-b), e ainda aos filmes utilizados durante estudo da libertação de fármaco.

FTIR

As análises *FTIR* foram realizadas às amostras de Lutrol F127 e de Lutrol F127 com HDI num espectrofotómetro *FTIR-4200 da Jasco* num número de onda compreendido entre 400 e 4000 cm⁻¹ no modo de reflexão total atenuada (ATR).

2.2.4. Curva de Calibração

Para obter a curva de calibração dos fármacos utilizados foi necessário preparar uma solução mãe, bem como algumas diluições partindo da solução inicial. Como tal,

para cada um dos fármacos, a solução mãe foi preparada com a concentração de 0,1 mg/ml em água/etanol na proporção de 4/1 (V/V) e as diluições nas mesmas condições que a solução mãe.

Foi também necessário preparar uma solução sem fármaco, ou seja, apenas de água/etanol na proporção de 4/1 (V/V). De seguida, a solução sem fármaco foi lida contra as diluições preparadas, uma a uma, por espectroscopia de UV (*Espectrofotómetro Jasco V-550*) a 265 nm para as diluições com acetazolamida e a 254 nm para as diluições com dorzolamida, sendo obtidas as retas (Gráficos 2.1 e 2.2):

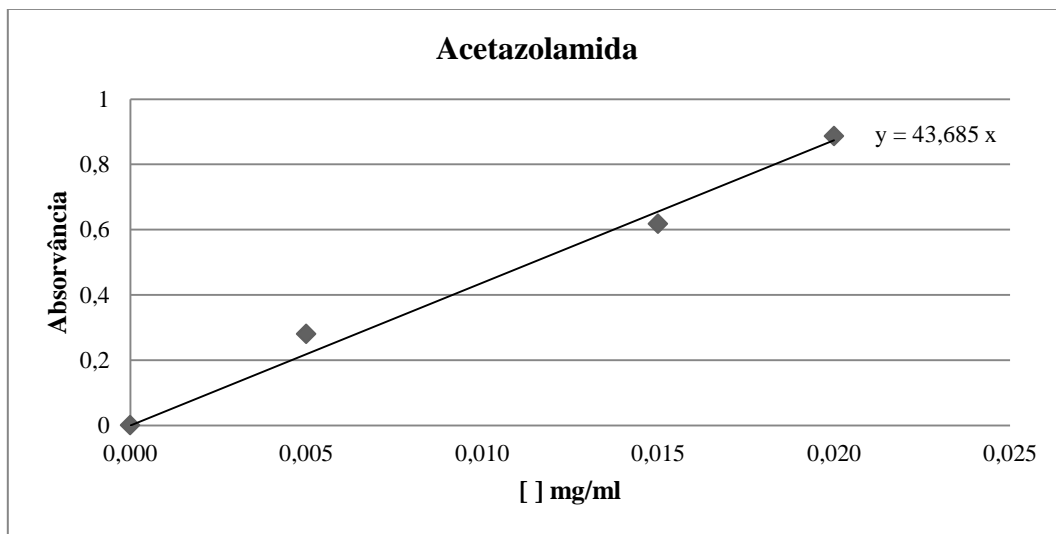


Gráfico 2.1 – Curva de calibração da acetazolamida.

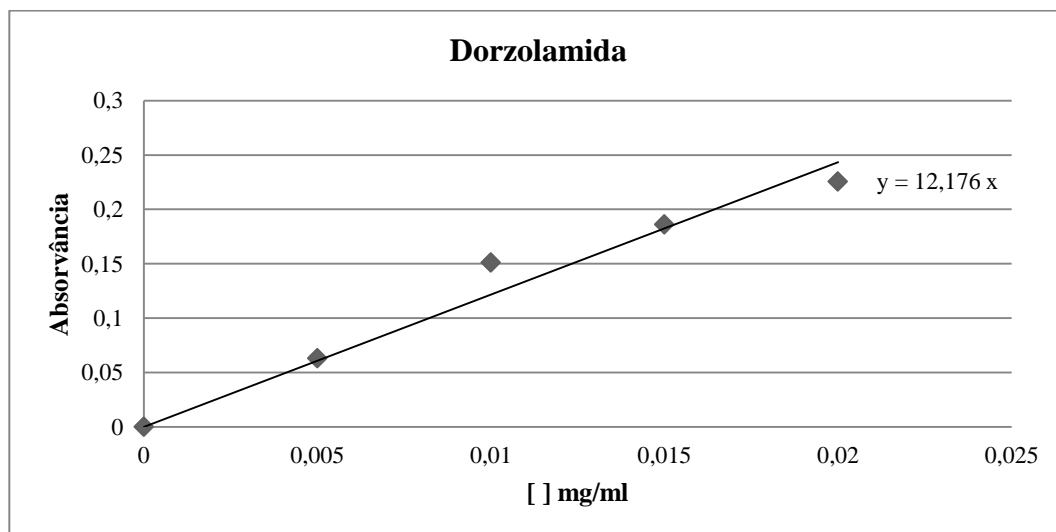


Gráfico 2.2 – Curva de calibração da dorzolamida.

2.2.5. Preparação de Filmes para o Estudo da Liberação de Fármaco

Os filmes para o estudo da liberação dos fármacos foram preparados na forma de discos com um diâmetro de 12 mm e uma espessura de 1,5 mm (filme tipo 1) e diâmetro de 10 mm e espessura de 2,5 mm (filme tipo 2), ou seja, durante a sua preparação foi colocado em cada tubo 1 ml da solução da mistura de polímeros e fármaco.

Foram feitos vários estudos de liberação dos fármacos considerando o local onde os filmes juntamente com o PBS são colocados (shaker a 37°C e 100 rpm ou estufa a 37°C), o fármaco utilizado, o tipo do filme, o seu revestimento e a reposição do meio de PBS a cada leitura da absorvância. Tendo em conta estas variáveis, foram feitos os ensaios da Tabela 2.1:

Tabela 2.1 – Variáveis tidas em conta durante os estudos da liberação de fármacos.

Ensaio	Local	Fármaco	Tipo do filme	Revestimento Bopsil	Reposição de PBS
1	Estufa	Acetazolamida	1	Não	Não
2	Estufa	Acetazolamida	2	Não	Não
3	Estufa	Acetazolamida	1	Sim	Não
4	Estufa	Acetazolamida	2	Sim	Não
5	Shaker	Acetazolamida	1	Não	Não
6	Shaker	Acetazolamida	2	Não	Não
7	Shaker	Acetazolamida	1	Sim	Não
8	Shaker	Acetazolamida	2	Sim	Não
9	Shaker	Acetazolamida	1	Sim	Sim
10	Shaker	Acetazolamida	2	Sim	Sim
11	Shaker	Dorzolamida	1	Sim	Não
12	Shaker	Dorzolamida	2	Sim	Não

Devido às semelhanças estruturais entre os dois fármacos e devido à disponibilidade de ambos (acetazolamida disponível em maior quantidade que a dorzolamida), os estudos de liberação controlada de fármaco foram iniciados com a acetazolamida e, quando os resultados de liberação do primeiro fármaco se revelaram satisfatórios, o segundo fármaco foi utilizado.

2.2.6. Liberação de Fármaco

Sempre que possível, por cada ensaio foi utilizado um filme branco e três filmes com cerca de 1 mg de fármaco em cada filme, cuja única diferença do filme branco relativamente aos restantes é a presença de fármaco, ou seja, tal significa que, os quatro filmes são colocados no mesmo local, os quatro filmes correspondem ao mesmo tipo, os quatro filmes são (ou não) revestidos e os quatro filmes sofrem (ou não) reposição de PBS a cada leitura.

De seguida, cada filme foi colocado em 30 ml de PBS e a totalidade dos filmes foi colocada no local adequado, dando início à contagem do tempo. No geral, a absorvância das amostras foi medida nos dias 1, 2, 3, 7, 10, 14, 17 e 21 seguintes. Ao longo do tempo, a concentração de fármaco foi determinada a partir da curva de calibração de cada um dos fármacos, cuja absorvância foi obtida por espectroscopia de UV a 265 nm para a acetazolamida e a 254 nm para a dorzolamida.

A primeira medida efetuada em cada ensaio foi a de uma solução só do meio de PBS (como branco) contra o meio que contém o filme branco (como amostra). De seguida, a solução que contém o filme branco passa a funcionar como branco e os restantes meios lidos um a um como amostra.

2.2.7. Preparação de Lutrol F127 de Maior Peso Molecular

Para aumentar a estabilidade do Lutrol F127 no implante foram efetuadas algumas tentativas de preparação de Lutrol F127 de maior peso molecular, utilizando HDI como extensor de cadeia para ligar mais cadeias de polímero^[49].

Para tal, foi feita a dissolução de 5g de Lutrol F127 em 80 ml de clorofórmio, cuja solução se adicionou a um balão volumétrico com cerca de 640 µl de HDI juntamente com 325 µl de SnOct₂ e outros 20 ml de clorofórmio. De maneira a que a reação ocorresse, o balão foi colocado em agitação magnética mínima de cerca de 60 rpm de um dia para outro, à temperatura ambiente. No dia seguinte, adicionou-se uma solução de éter/éter de petróleo na proporção de 1/1 (V/V) para que o polímero dissolvido em clorofórmio precipitasse. Tendo em conta o volume total da solução, esta foi colocada no evaporador rotativo (*Rotavapor R-114 da BÜCHI*) até que o seu volume diminuísse para cerca de 50 ml para seguidamente se proceder à filtração e lavagem do polímero com éter de petróleo. Por fim, foi utilizado novamente o evaporador rotativo para a secagem do polímero final.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1. Formação de Filmes de PCL e Lutrol F127

Inicialmente foram preparados vários filmes de PCL e Lutrol F127 por evaporação do solvente com diferentes percentagens destes polímeros na sua composição. Estes filmes foram preparados com as seguintes relações entre polímeros: PCL_50%+Lutrol F127_50%, PCL_66%+Lutrol F127_33%, PCL_75%+Lutrol F127_25%, PCL_100% e Lutrol F127_100%, utilizando acetona, clorofórmio ou mistura dos dois últimos como solventes.

O aspeto final destes filmes encontra-se no Anexo A – Tabela A.1 onde é possível observar-se a evolução tanto do processamento utilizado, bem como dos resultados obtidos em cada filme, considerando diferentes condições de reação para determinar o melhor método de preparação descrito no Capítulo 2.

Na Tabela 3.1 e na Figura 3.1 mostra-se uma pequena sequência de alguns filmes de PCL e de Lutrol F127 obtidos, cujo filme de destaque é o filme Nr. 36 do Anexo A – Tabela A.1 (filme mais à direita), obtido pelo procedimento otimizado descrito anteriormente no Capítulo 2 e o mais utilizado nas seguintes caracterizações.

Tabela 3.1 - Filmes de PCL e Lutrol F127 com diferentes percentagens dos polímeros na sua composição e solventes utilizados.

	PCL/Lutrol F127 (%)	Solvente
Esquerda	75/25	Acetona
	75/25	Clorofórmio
	50/50	Acetona
	50/50	Clorofórmio
	50/50	Acetona + Clorofórmio
Direita	↓ 50/50	Clorofórmio

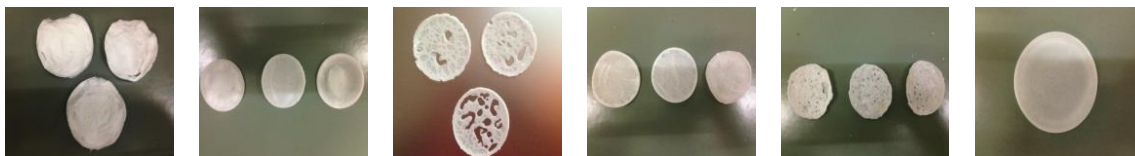


Figura 3.1 – Pequena evolução/sequência de filmes de PCL e Lutrol F127 obtidos ao longo do tempo.

3.2. Caracterização de Amostras Poliméricas

Análise Mecânica e Térmica das Amostras

A análise da perda de massa das amostras efetuada na Universidade do Porto teve em consideração o meio utilizado nos estudos da libertação de fármaco, correspondendo a um tampão fosfato de pH 7.4. Os resultados obtidos ao longo de um mês encontram-se apresentados na seguinte Tabela 3.2:

Tabela 3.2 – PM das amostras de PCL e Lutrol F127.

m_i (mg)	m_s (mg)	PM (%)	Média PM $\pm \sigma$ (%)
394	253	35,79	
326	212	34,97	
343	223	34,99	
321	171	46,73	40,99 \pm 5,74
442	235	46,83	
339	181	46,61	

Os valores apresentados na Tabela 3.2 revelaram que ocorreu degradação do material do filme ao longo do tempo, pois este perdeu aproximadamente 41% da sua massa inicial. Tendo em conta os resultados de outras análises de perda de massa efetuadas a filmes com percentagem superior de PCL na sua composição (Anexo B – Tabela B.1), tornou-se possível averiguar que possivelmente é o Lutrol F127 o polímero que se degrada mais rapidamente. Estes resultados aliados à natureza hidrofílica do Lutrol F127^[22], também podem justificar a elevada percentagem de perda de massa ao longo do tempo.

Outra análise efetuada foi a análise *DSC*, cujo objetivo foi observar o comportamento térmico da mistura de PCL e Lutrol F127, bem como dos mesmos polímeros individualmente, sendo obtidas as curvas respetivas representadas no Gráfico 3.1. Neste gráfico foi possível identificar-se apenas as temperaturas de fusão (T_f) dos materiais. Para a mistura dos polímeros esta foi igual a 63,14°C, para a PCL igual a 61,56°C e para o Lutrol F127 igual a 59,03°C (valores que correspondem ao único mínimo detetável na curva). No entanto, este gráfico não se mostrou conclusivo para a determinação de outros tipos de transições térmicas expectáveis, tal como a T_g .

De modo a complementar a análise *DSC* foi feita a análise *DMTA*, pelo fato de ser uma análise mais específica para a determinação da T_g das amostras, cujos resultados se apresentam nos Gráficos 3.2 e 3.3.

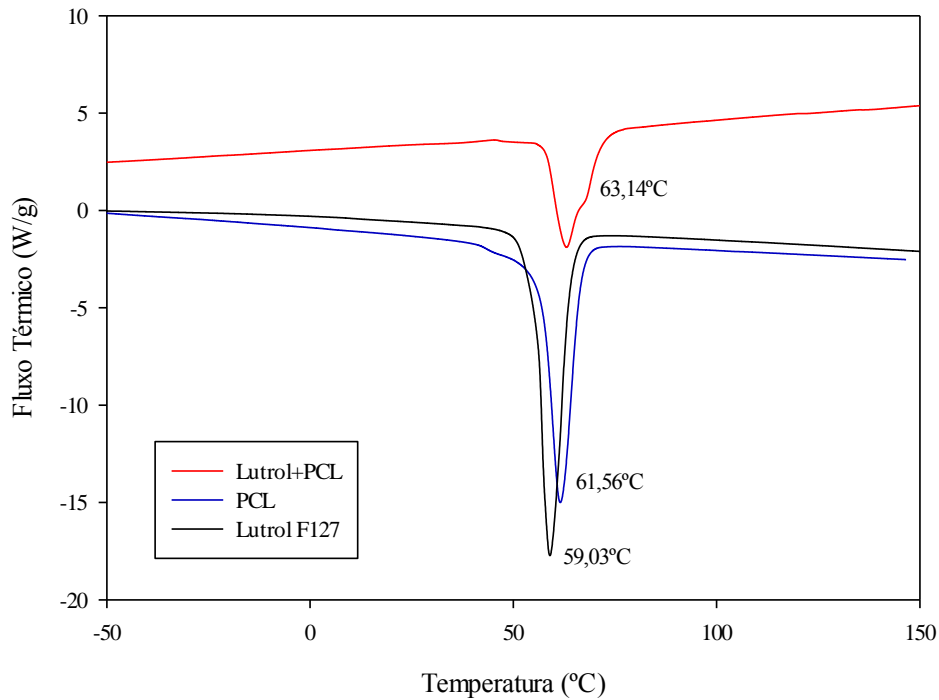


Gráfico3.1 – Curvas *DSC* dos polímeros PCL e Lutrol F127 e da mistura dos dois.

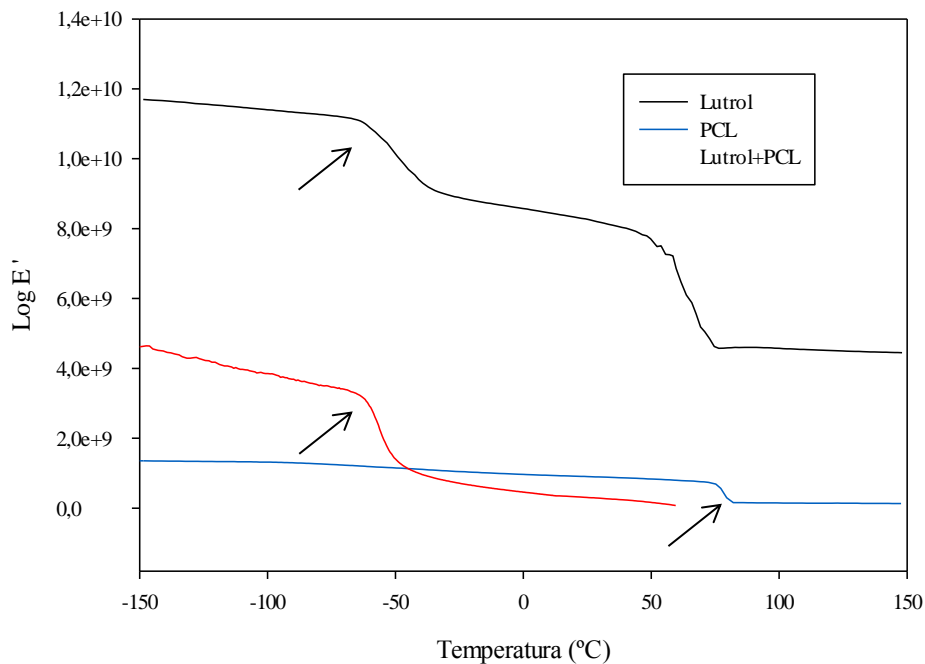


Gráfico 3.2 – Módulo de elasticidade (E') dos polímeros PCL e Lutrol F127 e da mistura dos dois, em modo de frequência de 1 Hz.

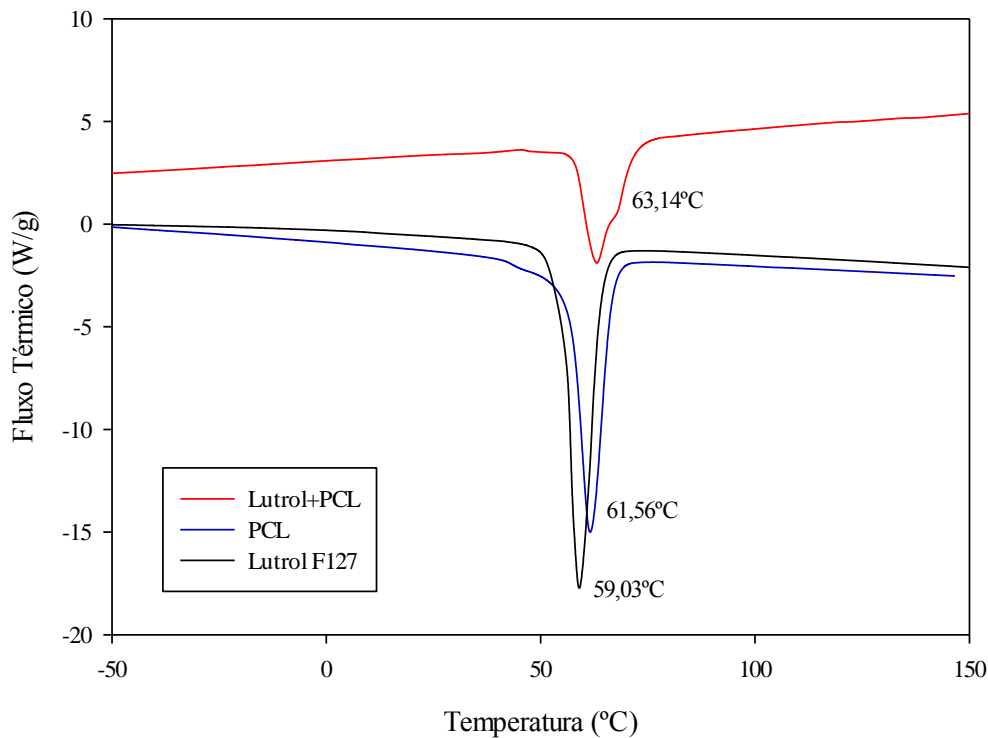


Gráfico 3.3 – Dissipação de energia mecânica ($\tan \delta$) para as amostras dos polímeros PCL e Lutrol F127 e para a mistura dos dois em modo de frequência de 1 Hz.

No gráfico 3.2 foi possível observar-se um decréscimo acentuado na curva de cada uma das amostras analisadas, decréscimo este associado à T_g . A esses decréscimos do Gráfico 3.2 correspondem picos máximos no Gráfico 3.3 com os valores de T_g iguais a $-54,56^\circ\text{C}$ para a mistura dos dois polímeros, a $-46,50^\circ\text{C}$ para o Lutrol F127 e a $82,04^\circ\text{C}$ para a PCL.

Para além destes picos anteriormente referidos, observaram-se outros picos, mas estes não puderam ser considerados como sendo T_g . No caso da mistura dos dois polímeros, na zona dos 50°C , para o pico corresponder a uma segunda T_g a análise teria que ter sido efetuada até valores de temperatura superiores (até cerca de 70°C), de modo a que se verificasse o mesmo tipo de decréscimo acentuado no Gráfico 3.2. Na zona dos 40°C a 70°C da curva do Lutrol F127, os picos indicaram ruído, embora com uma amplitude superior. Na curva da PCL, na zona dos -100°C a -60°C verificou-se um pico muito subtil (sem um decréscimo suficientemente acentuado para poder ser considerada uma T_g visível no gráfico 3.2 na mesma zona), sendo possível que apenas tenha ocorrido uma transição secundária.

Resumidamente, estes resultados encontram-se organizados na Tabela 3.3:

Tabela 3.3 – Comparação de resultados relativamente às T_g e T_f obtidas para as amostras de Lutrol F127, PCL e mistura dos dois polímeros.

Amostra	T_g [referência] (°C)	T_g obtida (°C)	T_f [referência] (°C)	T_f obtida (°C)
Lutrol F127	-58 [2]	-46,50	56 [22]	59,03
PCL	-50; 65 [50]	-90,36*; 82,04	61 [50]	61,56
Lutrol F127 + PCL	-54 e 44 [2]	-54,56	63 [2]	63,14


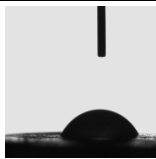
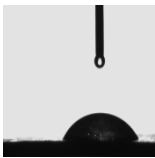
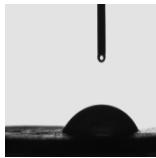
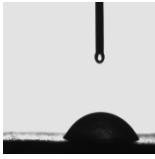

*não deve ser considerado um valor de T_g , apenas uma transição secundária.

Considerando os valores apresentados anteriormente, os resultados obtidos para as amostras analisadas não se verificaram muito aproximados para as T_g dos polímeros Lutrol F127 e PCL analisados individualmente, embora relativamente às T_f , os resultados não se tenham mostrado muito discrepantes.

Análise Física e Morfológica da Superfície das Amostras

Na Tabela 3.4 encontram-se representados os resultados obtidos referentes à medição dos ângulos de contacto das superfícies do filme analisado. Foram feitas três medições para cada superfície (com a respetiva fotografia no momento da medição do ângulo) e, ainda, uma média desses valores com os erros associados.

Tabela 3.4 - Medições do ângulo de contacto da amostra de PCL e Lutrol F127.

Superfície Superior				Superfície Inferior			
Ângulo (°)	Erro (°)	Foto	Valor médio (°)	Ângulo (°)	Erro (°)	Foto	Valor médio (°)
61.12	0.71			56.69	0.49		
56.84	1.24		58.44 ± 0.99	61.54	0.96		59.49 ± 0.68
57.35	1.01			60.25	0.60		

Durante a execução de diversos filmes, foi detetada uma certa diferença de rugosidade entre as duas superfícies, superior e inferior, consoante o solvente utilizado e consoante o contacto com vidro no momento da evaporação. Após a síntese de filmes de acordo com o descrito anteriormente (Capítulo 2), essas diferenças entre superfícies deixaram de ser tão evidentes, ou seja, tanto a superfície superior como a inferior apresentaram características muito próximas e ambas lisas, macroscopicamente. Tal situação confirmou-se pela análise do ângulo de contacto que indicou que, para a superfície superior, a média dos valores foi de 58.44 ± 0.99 ($^{\circ}$), um valor pouco inferior aos 59.49 ± 0.68 ($^{\circ}$) obtidos para a superfície inferior. Estes resultados mostraram, então, que a superfície superior é ligeiramente mais molhável e mais hidrofílica que a inferior.

Com a análise *SEM* foi possível obter imagens das superfícies dos filmes, mais concretamente das superfícies superior, inferior e ainda da superfície com revestimento, quando aplicável, antes e depois da libertação do fármaco, como se pode verificar analisando a morfologia da superfície de diversos filmes nas seguintes Figuras 3.2-a), 3.2-b), 3.3-a), 3.3-b), 3.4-a), 3.4-b), 3.5-a) e 3.5-b)).

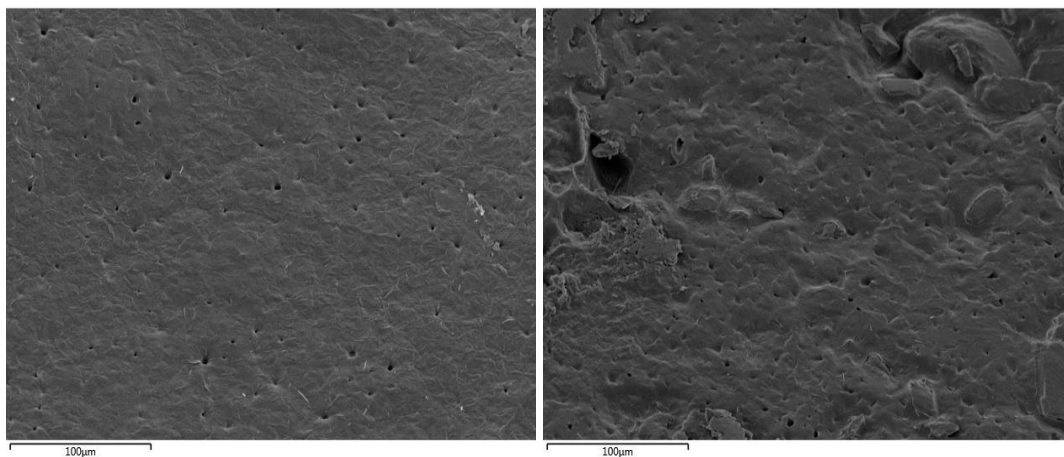


Figura 3.2-a) – Imagem SEM da superfície superior de um filme tipo 1 com fármaco incorporado.

Figura 3.2-b) – Imagem SEM da superfície inferior de um filme tipo 1 com fármaco incorporado.

A partir das Figuras 3.2-a) e 3.2-b) foi possível observar que as duas superfícies se apresentam porosas e com alguma rugosidade, salientando o fato da Figura 3.2-b) mostrar algumas irregularidades e uma maior zona de falhas.

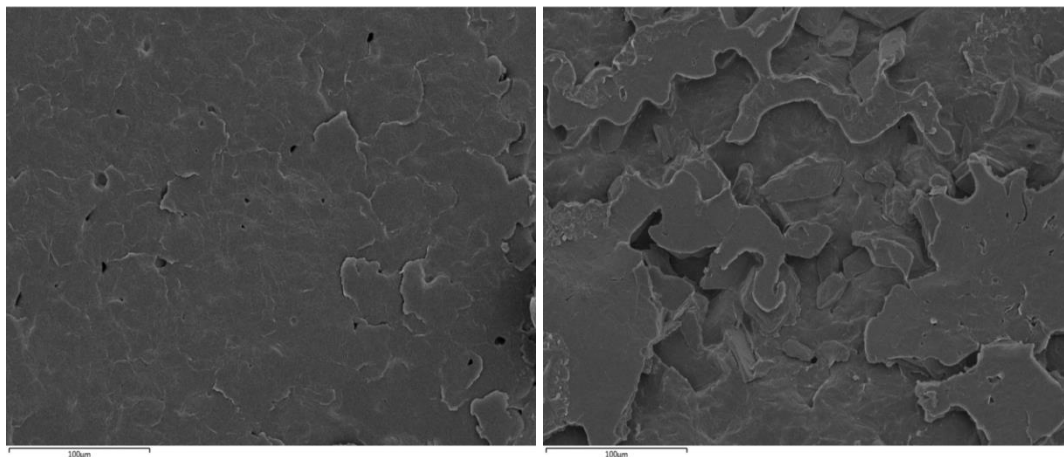


Figura 3.3-a) – Imagem *SEM* da superfície superior de um filme tipo 2 com fármaco incorporado.

Figura 3.3-b) – Imagem *SEM* da superfície inferior de um filme tipo 2 com fármaco incorporado.

Relativamente às Figuras 3.3-a) e 3.3-b), estas apresentaram uma maior quantidade de falhas visíveis com menor quantidade de porosidades notórias.

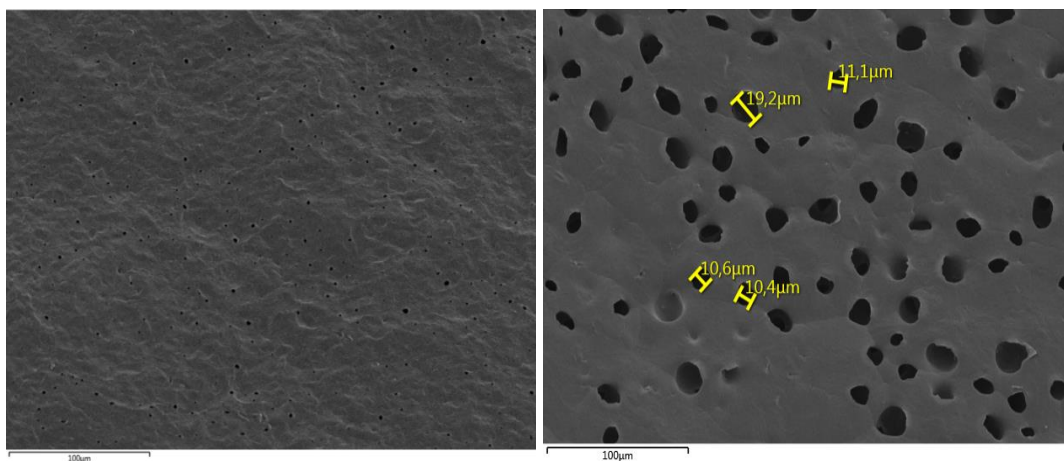


Figura 3.4-a) – Imagem *SEM* da superfície superior de um filme tipo 1 depois do estudo de libertação de fármaco.

Figura 3.4-b) – Imagem *SEM* da superfície superior de um filme tipo 2 depois do estudo de libertação de fármaco.

Comparando as superfícies superiores dos filmes com diferentes tamanhos e após o estudo da libertação de fármaco, foi possível verificar um maior número de poros em ambos os casos. Na Figura 3.4-b) foi também possível verificar um aumento significativo do tamanho do poro, uma vez que a ampliação das imagens 3.3-a) e 3.4-b) é a mesma.

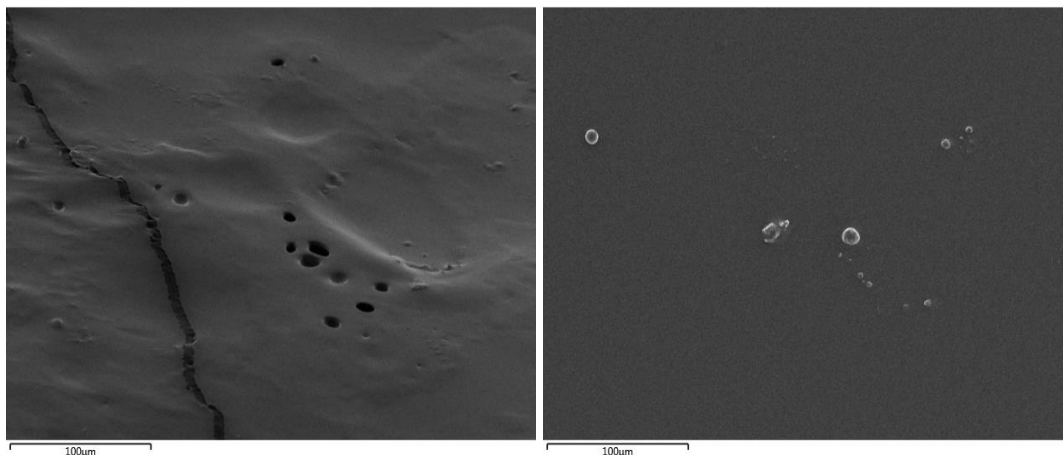


Figura 3.5-a) – Imagem SEM da superfície superior de um filme tipo 1 com revestimento depois do estudo de liberação de fármaco.

Figura 3.5-b) – Imagem SEM da superfície superior de um filme tipo 2 com revestimento depois do estudo de liberação de fármaco.

No último conjunto de Figuras, 3.5-a) e 3.5-b), a utilização do revestimento proporcionou uma diminuição na quantidade de poros visíveis nas superfícies, mesmo após o estudo da liberação de fármaco. Mais concretamente, na Figura 3.5-a), foi possível observar apenas alguns poros juntamente com uma falha mais acentuada, enquanto na Figura 3.5-b), apenas se observaram alguns poros ainda cobertos com revestimento.

Tendo em conta tudo o que foi descrito anteriormente, o mais importante a reter destes resultados foi que a perda de massa das amostras ao longo de um mês de estudo foi de $40,99 \pm 5,74$ (%), que as T_f e de T_g obtidas para a mistura de polímeros foram de $63,14^\circ\text{C}$ e de $-54,56^\circ\text{C}$, respetivamente, que o aumento da quantidade e, nalguns casos, do tamanho do poro, confirmaram a degradação do filme ao longo do tempo.

3.3. Liberação de Fármaco

De acordo com a Tabela 2.1, onde se encontram as variáveis tidas em conta durante os seguintes estudos da liberação de fármacos, os resultados obtidos a partir desses estudos serão apresentados por ensaio e tendo em conta uma média dos valores da concentração de fármaco por filme ao longo do tempo com o respetivo desvio padrão.

A cada ensaio corresponderá um gráfico. Considerando que ao Ensaio 1 corresponderá o Gráfico 3.4, ao Ensaio 2 o Gráfico 3.5, assim sucessivamente e respetivamente, ao Ensaio 12 corresponderá o Gráfico 3.15, como se mostrará de seguida.

Os primeiros ensaios foram feitos utilizando a acetazolamida como fármaco e a estufa como local onde os filmes foram colocados durante os estudos, variando o tipo de filme, o de revestimento do mesmo e a reposição do meio de PBS.

Ensaio 1

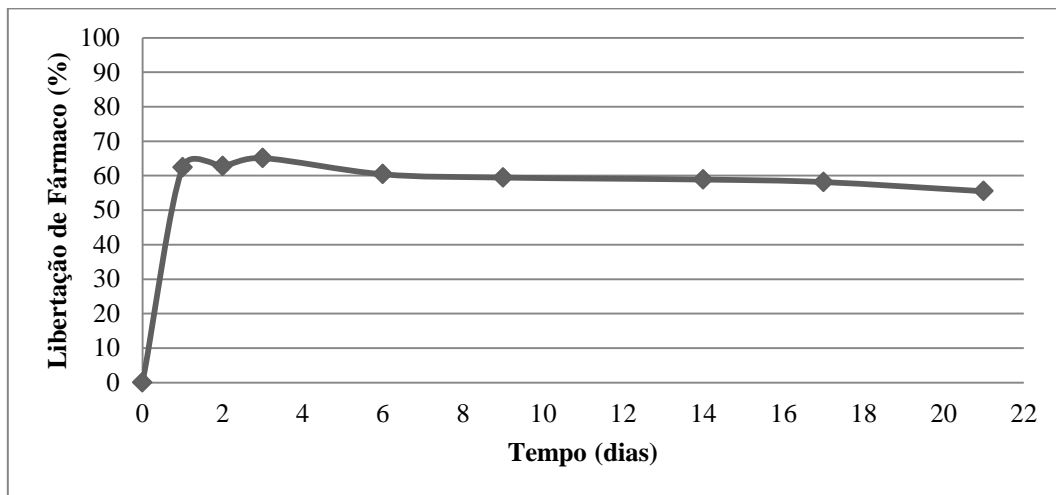


Gráfico 3.4 – Libertação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 1 (fármaco – acetazolamida, local – estufa, filme tipo 1, sem revestimento e sem reposição de PBS).

Neste ensaio observou-se uma liberação de fármaco inicial extensa nos primeiros dias (efeito *burst*), cujo máximo foi detetado ao 3º dia com o valor de 65%. No Gráfico 3.4 foi possível observar-se oscilações após o pico máximo de liberação de fármaco ter sido atingido que podem ser explicadas tendo em conta o comportamento apenas do fármaco em meio de PBS ao longo do tempo (Anexo E – Gráfico E.1), verificando-se princípios de degradação do fármaco a partir do 9º dia. Neste gráfico ficou ainda evidente que as barras de erro representadas possuíram uma amplitude muito pequena e consequentemente pouco visível.

Ensaio 2

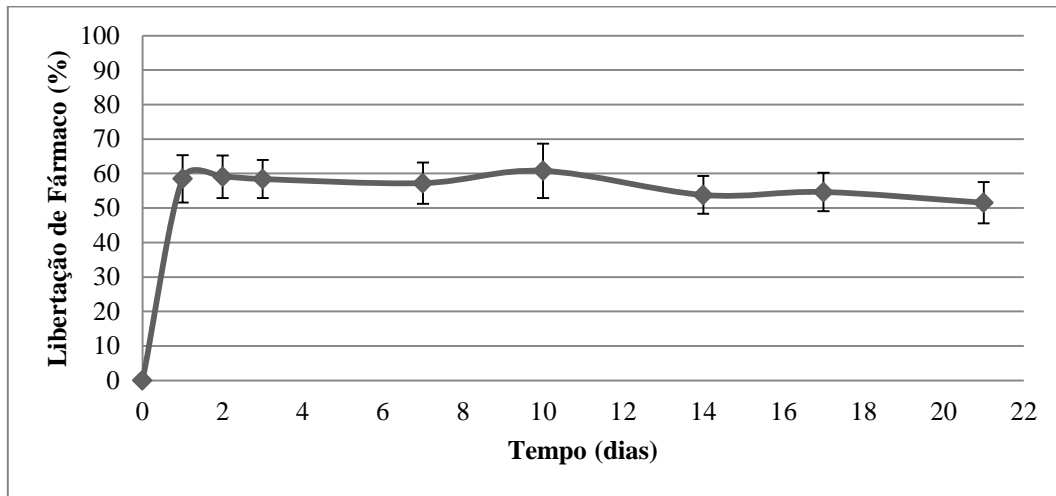


Gráfico 3.5 – Liberação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 2 (fármaco – acetazolamida, local – estufa, filme tipo 2, sem revestimento e sem reposição de PBS).

No Gráfico 3.5 também foi visível o efeito *burst* nos primeiros dias de estudo, em que praticamente a totalidade do fármaco foi quantificada. Após essa liberação extensa de fármaco ter ocorrido verificou-se novamente uma oscilação dos valores entre 50% e 60%, devido à degradação do fármaco ao longo do tempo.

Tendo em conta os dois últimos ensaios, estes apresentaram resultados aproximados, pois verificou-se em ambos o efeito *burst* e o mesmo tipo de comportamento da curva ao longo do tempo, independentemente do tipo de filme utilizado.

Nos dois ensaios seguintes (Ensaio 3 e 4) foram estudadas duas variáveis simultaneamente: o tipo de filme e o revestimento do mesmo com bopsil. A aplicação do revestimento foi feita para se poder averiguar se a liberação do fármaco ao longo do tempo se mostra mais controlada.

Ensaio 3

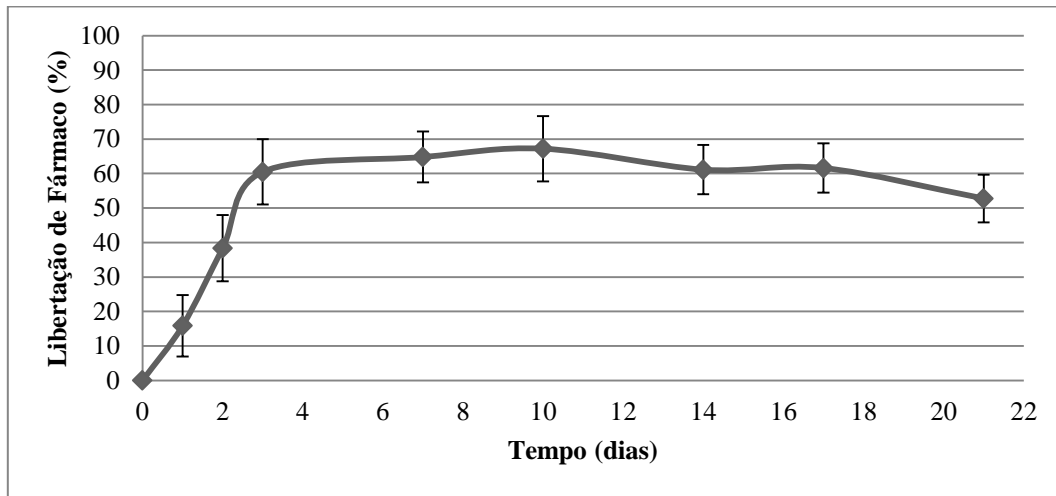


Gráfico 3.6 – Libertação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 3 (fármaco – acetazolamida, local – estufa, filme tipo 1, com revestimento e sem reposição de PBS).

Relativamente ao Gráfico 3.6, neste foi visível um crescimento ligeiramente mais controlado da percentagem de libertação do fármaco ao longo dos primeiros três dias. Após se ter verificado praticamente a libertação total do fármaco nesses primeiros dias, os valores decresceram aproximadamente até 50%, evidenciando-se novamente a sua degradação ao longo do tempo, como também já foi referido em ensaios anteriores.

Ensaio 4

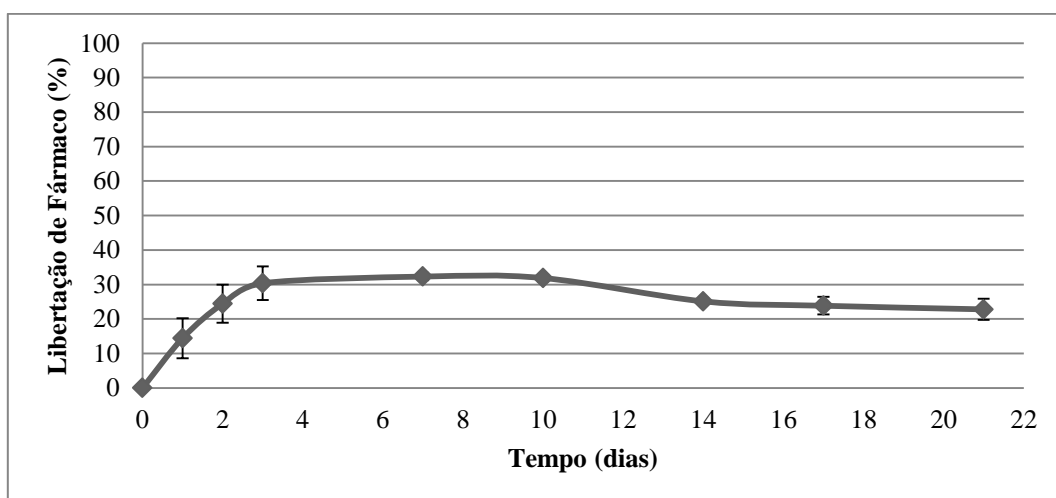


Gráfico 3.7 – Libertação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 4 (fármaco – acetazolamida, local – estufa, filme tipo 2, com revestimento e sem reposição de PBS).

Neste gráfico, o tipo de comportamento da curva foi semelhante ao do Gráfico 3.6, no entanto, percentagens menores foram atingidas. Após o valor máximo da percentagem de libertação do fármaco ter sido detetada, seguiu-se novamente um decréscimo dessa percentagem até cerca de 20%.

No entanto, nos filmes revestidos com bospil observou-se que ocorreu a degradação do revestimento que se encontrava ligado ao filme (Figura 3.6), explicando-se, assim, a reduzida vantagem da aplicação do revestimento observada nos ensaios anteriores, ao contrário do que seria expectável.



Figura 3.6- Revestimento desagregado do filme ao qual foi aplicado: filme, revestimento inferior, revestimento superior (sequencialmente da esquerda para a direita).

Para verificar se a agitação teria alguma influência no processo, os seguintes ensaios foram feitos utilizando a acetazolamida como fármaco, o shaker como local onde os filmes foram colocados ao longo dos estudos, variando o tipo de filme, o revestimento do mesmo e a reposição do meio de PBS.

Ensaio 5

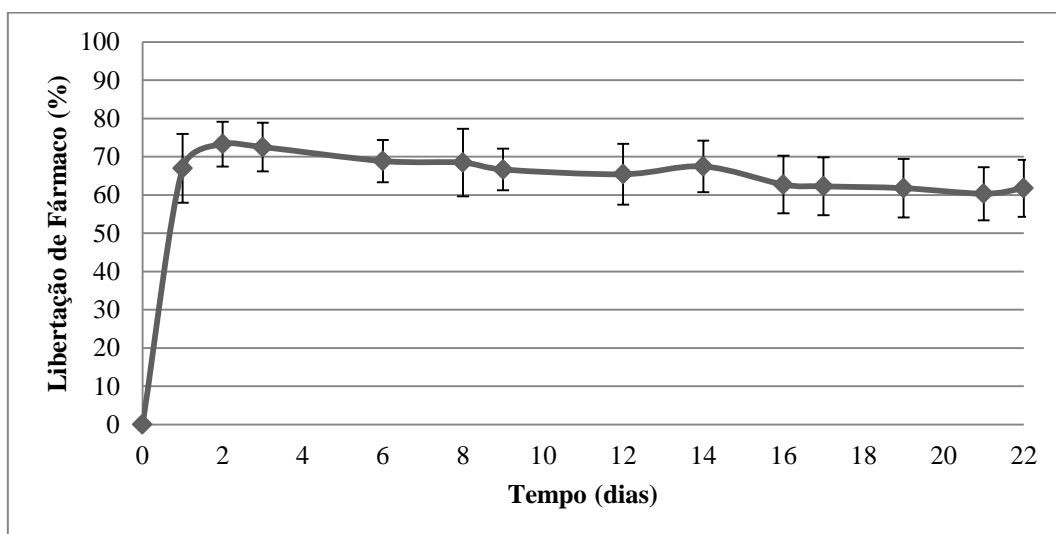


Gráfico 3.8 – Libertação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 5 (fármaco – acetazolamida, local – shaker, filme tipo 1, sem revestimento e sem reposição de PBS).

Analisando o Gráfico 3.8, verificou-se uma liberação inicial muito intensa de fármaco ao longo dos primeiros dois dias (efeito *burst*), atingindo o máximo de liberação ao 2º dia (73%). Nos dias seguintes, a percentagem de liberação do fármaco sofreu oscilações entre os 60% e 70%, evidenciando princípios de degradação do fármaco.

Ensaio 6

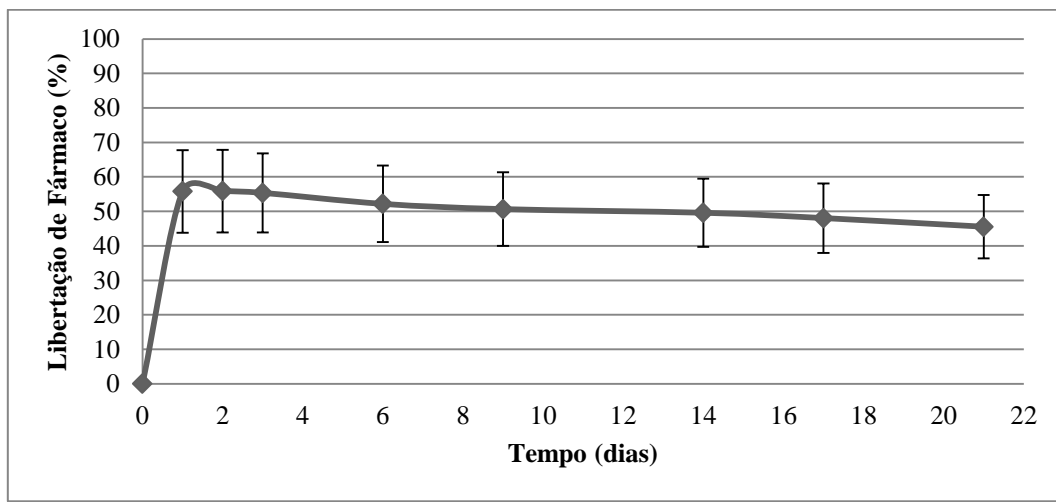


Gráfico 3.9 – Libertação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 6 (fármaco – acetazolamida, local – shaker, filme tipo 2, sem revestimento e sem reposição de PBS).

Neste caso, o comportamento da curva obtida no Gráfico 3.9 foi idêntico ao do gráfico anterior, cujo máximo foi observado novamente ao 2º dia (55%) com oscilações visíveis dos valores ao longo do tempo entre os 45% e 55%, indicando novamente uma liberação inicial muito extensa de fármaco e a sua degradação logo após o 2º dia.

Tendo em conta os dois últimos ensaios, estes apresentaram resultados diferentes relativamente ao máximo atingido, significando que a única variável que difere nos dois (o tipo de filme) influenciou nestes resultados, sendo o mais interessante aquele que ao fim do mesmo tempo de estudo mostrou uma percentagem de liberação de fármaco menor (Ensaio 6).

Nos dois ensaios seguintes (Ensaio 7 e 8) foram estudadas duas variáveis simultaneamente: o tipo de filme e o seu revestimento. A aplicação do revestimento foi feita novamente para se poder averiguar se a liberação do fármaco ao longo do tempo se mostra mais controlada.

Ensaio 7

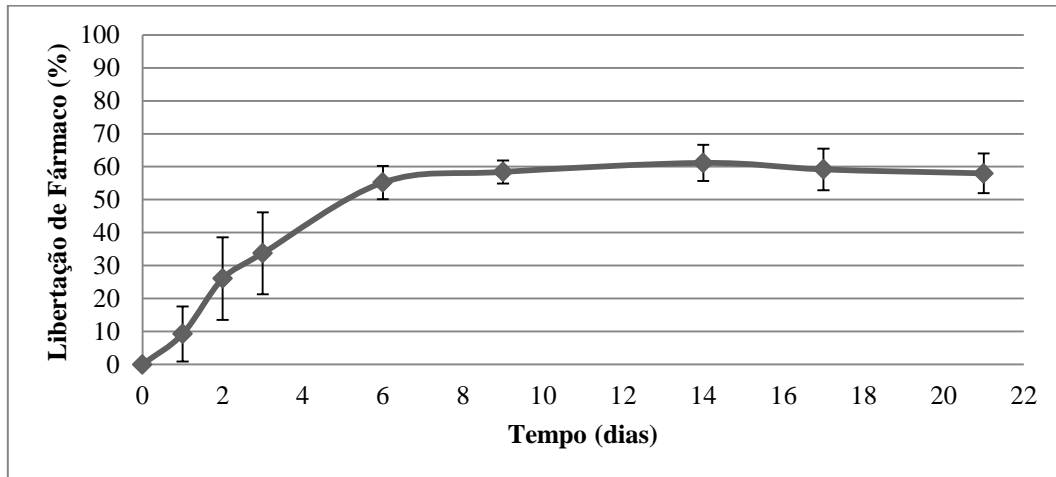


Gráfico 3.10 – Libertação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 7 (fármaco – acetazolamida, local – shaker, filme tipo 1, com revestimento e sem reposição de PBS).

No Gráfico 3.10 verificou-se um crescimento ao longo do tempo da percentagem da libertação do fármaco até ao 14º dia, cujo máximo foi observado nesse mesmo dia com o valor correspondente de 61%. Neste ensaio tornou-se evidente um crescimento menos abrupto da curva ao longo do tempo (diminuição do efeito *burst*), com um aumento notório do dia em que o máximo de libertação de fármaco foi atingido (do 2º/3º dias nos ensaios anteriores para o 14º dia neste ensaio). Verificou-se ainda a partir do 14º dia um decréscimo menos significativo dos valores da percentagem de libertação do fármaco, correspondendo mesmo assim à sua degradação ao longo do tempo.

Ensaio 8

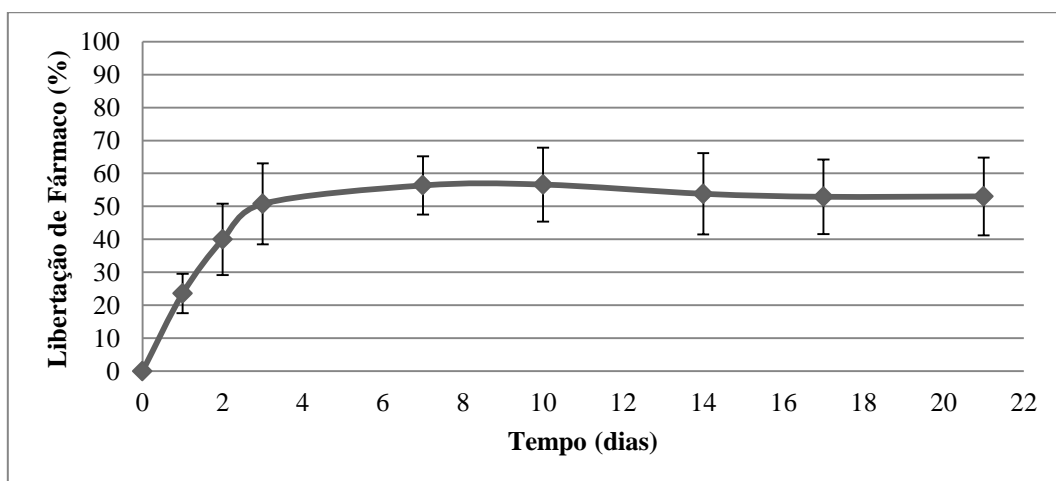


Gráfico 3.11 – Libertação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 8 (fármaco – acetazolamida, local – shaker, filme tipo 2, com revestimento e sem reposição de PBS).

De acordo com o Gráfico 3.11 foi observado também uma diminuição do efeito *burst*, ou seja, um crescimento mais controlado da percentagem da libertação do fármaco, neste caso, até ao 10º dia. Nesse mesmo dia o valor máximo atingido foi de 56%. De seguida verificou-se um decréscimo dos valores ao longo dos restantes dias do estudo, mostrando também indícios da degradação do fármaco.

Os resultados obtidos nos Ensaio 7 e 8 indicaram que o revestimento controlou de certa forma a libertação do fármaco ao longo do tempo e que, novamente, a libertação do fármaco foi menor no filme tipo 2.

Com vista a obter condições experimentais mais próximas da realidade foram também feitos estudos considerando a reposição do meio de PBS a cada leitura efetuada, aliada às variáveis já estudadas (Ensaio 9 e 10).

Ensaio 9

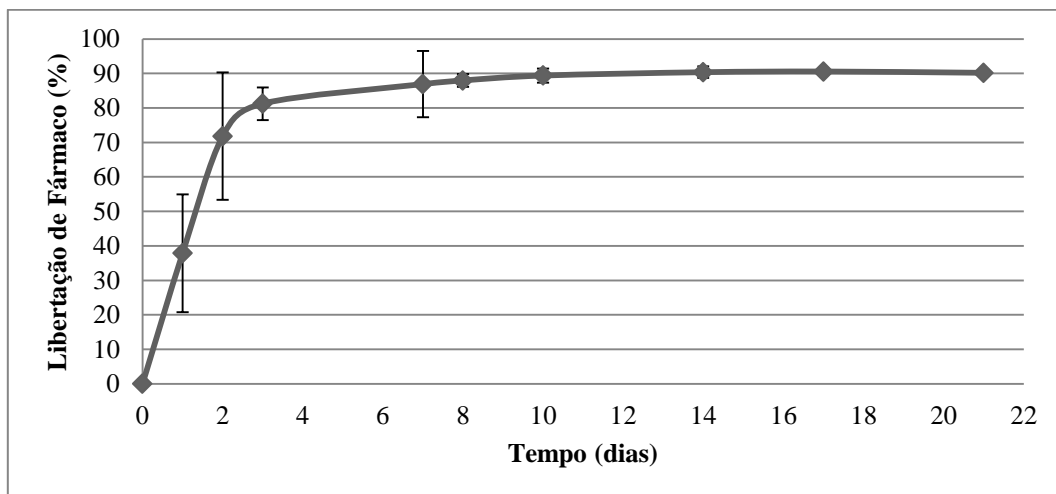


Gráfico 3.12 – Libertação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 9 (fármaco – acetazolamida, local – shaker, filme tipo 1, com revestimento e com reposição de PBS).

Relativamente ao Gráfico 3.12, devido à reposição a cada leitura do meio, observou-se que nos primeiros dias a percentagem de libertação do fármaco aumentou até cerca de 90%, estabilizando a partir do dia em que esse valor máximo foi atingido (17º dia). Por um lado, fazendo a reposição do meio de PBS a cada leitura, a saída do fármaco tornou-se forçada, pois a cada reposição formou-se um novo equilíbrio entre o meio e o fármaco, sendo atingida uma percentagem de libertação de fármaco superior e mais próxima dos 100%. Por outro lado, apesar de ter sido aplicado o revestimento, o

efeito *burst* manteve-se, pois apesar do máximo de libertação ter sido ao 17º dia, foi nos primeiros 3 dias de estudo que ocorreu a sua libertação praticamente na totalidade. Apesar de não ser tão notória a variação dos valores após o pico máximo, a degradação do fármaco também se verificou, pois o valor da percentagem da sua libertação decresceu ligeiramente na medição seguinte.

Ensaio 10

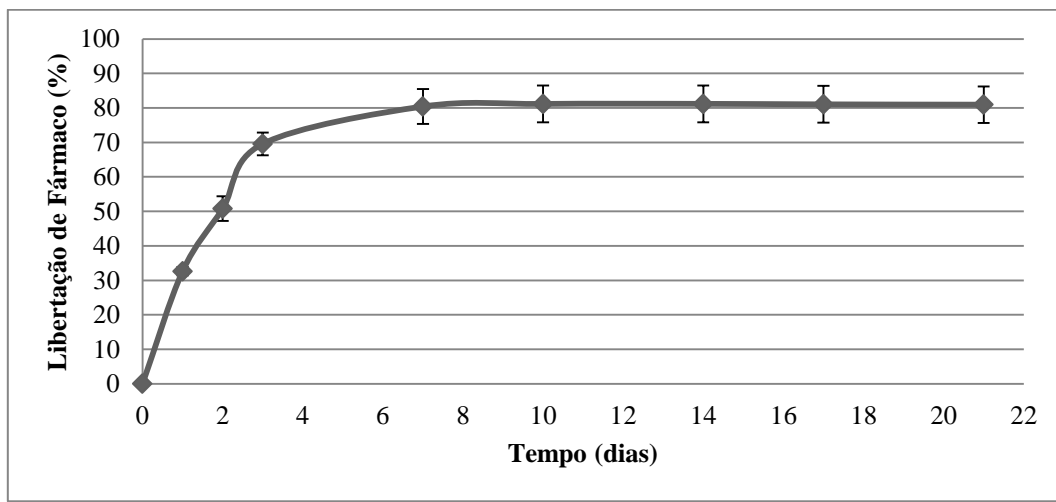


Gráfico 3.13 – Libertação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 10 (fármaco – acetazolamida, local – shaker, filme tipo 2, com revestimento e com reposição de PBS).

No Gráfico 3.13, fazendo a reposição do meio de PBS a cada leitura, o mesmo aconteceu relativamente à formação de novos equilíbrios, sendo atingida uma percentagem de libertação de fármaco novamente superior e mais próxima dos 100%. O máximo de percentagem de libertação de fármaco foi detetado ao 14º dia, com o valor de 81%. Neste caso, o revestimento aplicado também não surtiu grande efeito, pois a libertação de fármaco decorreu até ao 3º dia praticamente na sua totalidade. Relativamente à degradação do fármaco, esta também se verificou, pois após o dia em que se verificou o pico máximo, os valores da percentagem de libertação do fármaco decresceram ligeiramente.

De acordo com os resultados obtidos tornou-se evidente que o tipo de filme teve influência nos estudos de libertação do fármaco, devido às percentagens de libertação mais baixas detetadas, que o revestimento quando aplicado diminuiu o efeito *burst*, embora não se tenha verificado o mesmo quando este se aplicou e se efetuou a reposição do meio de PBS.

Atendendo aos resultados anteriores, os melhores verificaram-se quando se utilizou o shaker como local onde os filmes foram colocados ao longo dos estudos, variando o tipo de filme e aplicando o revestimento bopsil ao mesmo. Tendo em conta esses resultados e as condições dos estudos efetuados, o fármaco dorzolamida foi estudado nos seguintes Ensaio 11 e 12.

Ensaio 11

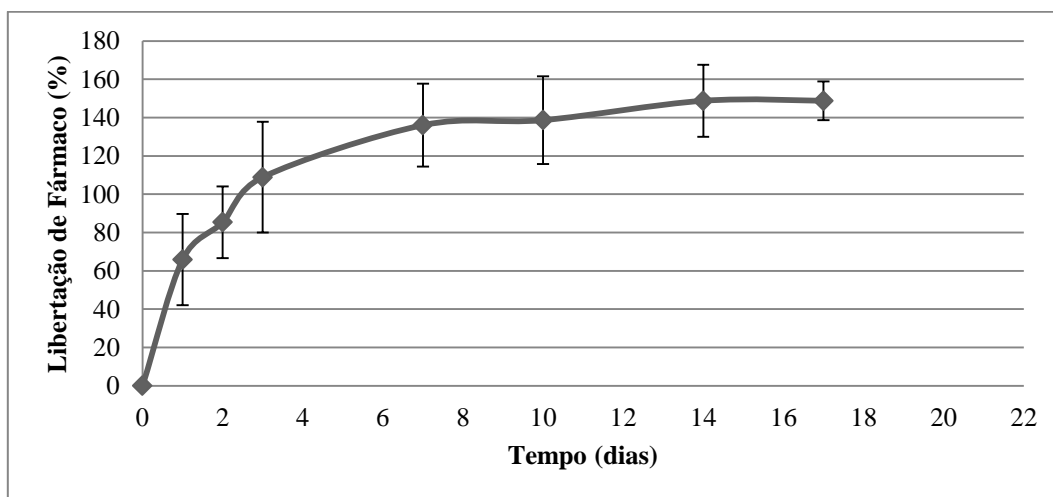


Gráfico 3.14 - Libertação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 11 (fármaco – dorzolamida, local – shaker, filme tipo 1, com revestimento e sem reposição de PBS).

Ensaio 12

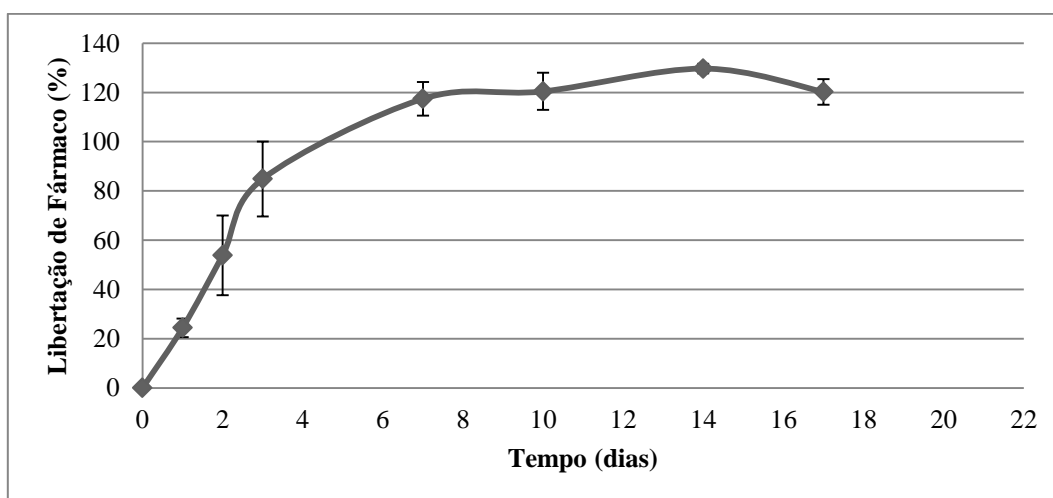


Gráfico 3.15 - Libertação de fármaco ao longo do tempo relativamente ao Ensaio 12 (fármaco – dorzolamida, local – shaker, filme tipo 2, com revestimento e sem reposição de PBS).

Os Gráficos 3.14 e 3.15 apresentaram a particularidade de o pico máximo da sua curva se verificar acima dos 100% (149% e 130%, respetivamente), o que não é de todo correto. Contudo, analisando de forma mais pormenorizada estes resultados disponíveis no Anexo F – Tabelas F.1 e F.2, foi possível fazer-se apenas uma comparação de resultados, considerando o cociente do valor da medida do 1º dia pelo valor máximo atingido. Assim, verificou-se que a libertação de fármaco no primeiro dia para os Ensaios 11 e 12 foi de 43% e de 19%, respetivamente. Relativamente aos máximos das curvas, estes foram atingidos ao 14º dia.

Embora os resultados obtidos nos dois últimos ensaios não fossem propriamente os esperados, estes apresentaram um comportamento idêntico aos ensaios anteriores com a particularidade de revelarem percentagens de libertação de fármaco superiores. Tal situação pode ser explicada, por exemplo, assumindo que a curva de calibração foi feita com uma solução contendo etanol (onde o fármaco se dissolveu) enquanto no meio de PBS, sem etanol, essa dissolução pode não ter ocorrido. A possibilidade da dorzolamida não se dissolver no meio de PBS torna a leitura da absorvância não concordante com a curva de calibração obtida no Gráfico 2.2. Outra possibilidade a considerar pode ser um erro na pesagem do fármaco no momento da preparação dessa curva, pois a pesagem necessária à sua preparação implicou a medição de um valor extremamente pequeno (1 mg), que mesmo utilizando balanças de alta precisão e sensíveis a valores na ordem das mg, qualquer tipo de erro pode ter ocorrido. O mesmo pode ser tido em conta para pesagens efetuadas no momento de preparação dos filmes em questão.

Numa apreciação geral de todos os resultados, no que diz respeito aos erros associados à média das medições efetuadas, nalguns casos, estes apresentaram-se com uma margem um pouco elevada, contudo, noutros casos, não se mostraram perceptíveis. Como estes resultados de erros tiveram em conta as medições efetuadas antes de ser calculada a média, a barra de erro apresentada acima e abaixo do valor médio significa que, entre cada grupo de medições, estas foram muito ou pouco discrepantes entre si, consoante a barra de erro tenha associada uma percentagem igualmente maior ou menor.

Relativamente às oscilações observadas após o pico máximo de libertação de fármaco ter sido atingido, estas verificaram-se em todos os ensaios, de forma mais ou menos acentuada, mas sempre presente, verificando-se, então, princípios de degradação

do fármaco ao longo do tempo. Possivelmente, este foi transformado noutra tipo de produto não detetado na leitura da absorvância, utilizando o mesmo comprimento de onda.

De acordo com o local escolhido para o estudo da libertação do fármaco, as diferenças em termos de resultados não foram muito significativas. Apenas no Ensaio 4 (fármaco – acetazolamida, local – estufa, filme tipo 2, com revestimento e sem reposição de PBS) se observou uma maior discrepância de resultados em relação aos outros, sendo a percentagem de libertação de fármaco relativamente baixa. Embora não se tenham verificado diferenças significativas nos resultados obtidos, comparativamente, o shaker revela-se como sendo o local mais adequado para desenvolver os estudos devido a uma maior aproximação com o corpo humano.

Considerando o tipo de filme utilizado, os resultados revelaram-se mais interessantes para filmes do tipo 2 pelas percentagens de libertação de fármaco relativamente mais baixas atingidas.

Tendo em conta a utilização do revestimento bopsil, tornou-se evidente um crescimento menos abrupto da curva ao longo do tempo (diminuição do efeito *burst*), com um aumento notório do dia em que o máximo de libertação de fármaco foi atingido (do 2º/ 3º dia para o 10º/ 14º dia). Isto significa que o revestimento controlou de certa forma a libertação do fármaco ao longo do tempo, como seria previsto. No entanto, nos ensaios em que foi aplicado o revestimento bopsil e foi feita simultaneamente a reposição do meio de PBS não se verificou um controlo significativo na libertação do fármaco.

Outro aspeto importante de salientar é que na maioria dos ensaios sem reposição do meio, o valor máximo atingido para a libertação do fármaco ficou aquém dos 100%. O facto de não se atingirem valores perto dos 100% de libertação do fármaco fez com que se considerasse que este se manteve encapsulado no dispositivo, possivelmente devido a um equilíbrio entre o meio e o fármaco. Assim, a libertação de fármaco por difusão não ocorreu novamente, verificando-se daí em diante a ação dos mecanismos de erosão do meio sobre o dispositivo e a sua degradação.

Fazendo-se a reposição do meio de PBS a cada leitura as percentagens de libertação de fármaco mostraram-se superiores e mais próxima dos 100%. Contudo, ao realizar este procedimento revelou-se uma maior aproximação ao funcionamento do corpo humano.

Comparando os fármacos utilizados, o esperado seria que os resultados obtidos não fossem muito diferentes, tendo em conta que os fármacos apresentam uma estrutura química semelhante.

Relativamente ao ensaio que melhor se poderá comparar à aplicação do filme no corpo humano, este pode ser considerado o Ensaio 10, aquele que atende às variáveis: filme tipo 2, colocação dos filmes no shaker, utilização do revestimento e reposição de PBS.

No entanto, não se encontra disponível na literatura qualquer procedimento explícito considerando a primeira medida efetuada em cada ensaio como sendo a leitura de uma solução só do meio de PBS (como branco) contra o meio que contém o filme branco (como amostra), sendo de seguida, a solução que contém o filme branco a funcionar como branco e os restantes meios lidos um a um como amostra. Em todos os ensaios efetuados essa leitura foi tida em conta e foi constatado que, apesar desses resultados serem esperados próximos de zero (%), tal facto nem sempre se verificou (Anexo G – Tabela G.1). Uma explicação possível para essa diferença de zero (%) estará no facto de durante as medições efetuadas uma outra absorvância poderá ter sido detetada aquando da leitura da amostra no comprimento de onda correspondente, devido à possibilidade da solução do meio extrair material do filme.

No que diz respeito a estudos semelhantes presentes na literatura, anteriormente foram referidos estudos em que fármacos como o ácido etacrínico, o hidrocloreto de dorzolamida, o maleato de timolol e o latanoprot foram utilizados. Estes mostram que, no primeiro caso, filmes de PLGA com ácido etacrínico podem reduzir a PIO durante pelo menos 10 dias quando implantados na esclera de olhos de coelho; que discos subconjuntivais de PCL com hidrocloreto de dorzolamida implantados em olhos de coelho mostraram taxas de libertação não-cumulativas acima do nível terapêutico durante 3 meses; que uma mistura de PLGA e PLA em forma de microesferas com maleato de timolol na forma de injeção subconjuntival permite a libertação contínua do fármaco por mais de 107 dias e que a partir de uma única injeção subconjuntival de uma formulação de lipossomas com latanoprost a sua libertação foi mantida durante 50 dias^[36, 41-43].

Relativamente ao trabalho de investigação referido inicialmente como base deste projeto, para os filmes de PCL e Lutrol F127 em forma de disco com hidrocloreto de dorzolamida revestidos com uma nova camada de PCL (procedimento semelhante ao descrito no Capítulo 2), esse revestimento apenas se mostrou eficaz em filmes 100%

PCL (libertação controlada durante 18 dias) e não tão eficiente em filmes PCL_50%+Lutrol F127_50%, devido à porosidade criada pelo Lutrol F127^[2].

3.4. Análise Estrutural e Química do Lutrol F127

De acordo com os resultados obtidos anteriormente verificou-se que a degradação do filme (possivelmente do Lutrol F127, dada à sua natureza hidrofílica) decorreu ao longo dos estudos efetuados da perda de massa com duração de cerca de um mês. Como já foi referido no Capítulo 2, para aumentar a estabilidade do Lutrol F127 no meio de PBS, a preparação de Lutrol F127 com maior peso molecular foi uma alternativa encontrada face a esse problema.

Contudo, após a preparação do Lutrol F127 de maior peso molecular verificou-se que o mesmo, inicialmente dissolvido em clorofórmio, depois de seco não tornou a dissolver-se, nem em clorofórmio nem noutros solventes disponíveis em laboratório como água, metanol, acetona, *dimetilformamida (DMF)*, tetrahidrofurano (THF), entre outros. Ou seja, a substituição do Lutrol F127 modificado pelo Lutrol F127 inicial não se tornou possível na preparação de novos filmes, pelo facto deste ter resultado numa estrutura extremamente reticulada e insolúvel nos solventes utilizados para a formação de filmes.

Como tal, esse aumento de peso molecular foi verificado a partir da análise FTIR, como se mostra no Gráfico 3.16. Analisando esse espectro FTIR foi visível o aparecimento de novos picos, nomeadamente na zona dos 3335 cm^{-1} , 1720 cm^{-1} , 1625 cm^{-1} e 1575 cm^{-1} . Esses picos correspondem às ligações N-H, O-H, C=N, C-N e C-C, ligações essas que resultaram efetivamente da ligação das cadeias do Lutrol F127 ao extensor de cadeia HDI^[51] (Anexo H – Figura H.1).

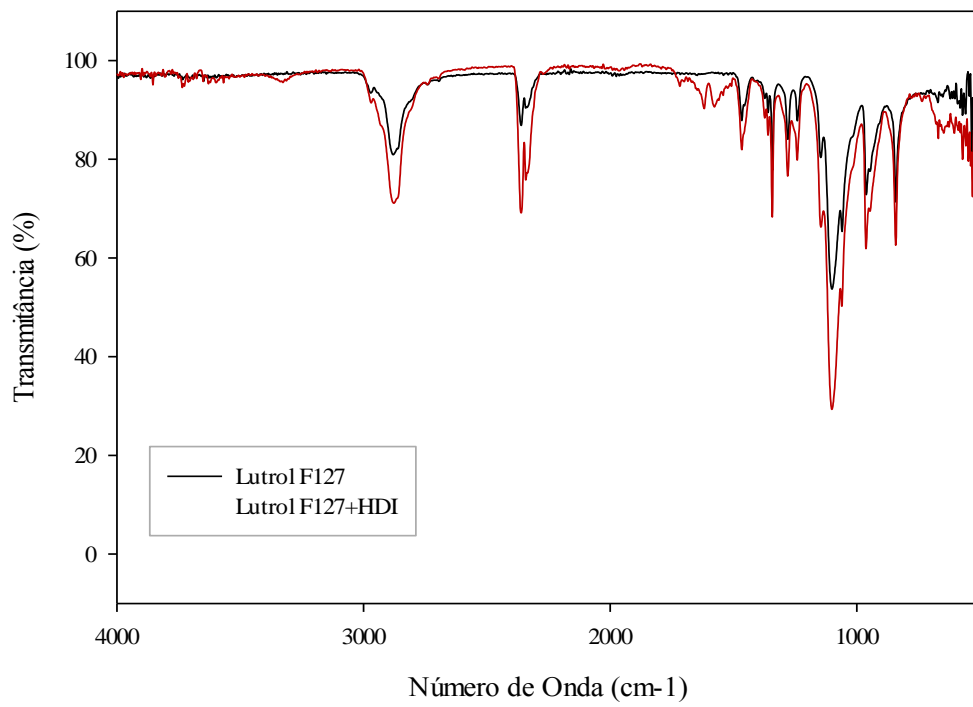


Gráfico 3.16 – Espectro FTIR dos polímeros Lutrol F127 e Lutrol F127 com HDI.

Capítulo 4

Conclusões e Perspetivas Futuras

4.1. Conclusões

Ao longo do trabalho desenvolvido foi possível tirar diversas conclusões acerca da síntese de implantes biodegradáveis intraoculares com consequente libertação controlada de fármaco.

Acerca do dispositivo desenvolvido durante este projeto, considerando que os polímeros utilizados na sua execução seriam os mais promissores, este apresenta uma T_f de 63°C, valor superior ao da temperatura corporal à qual estes terão que estar sujeitos quando implantados, garantindo uma durabilidade considerável no corpo humano nessas condições, embora os estudos da perda de massa revelem que o dispositivo também se degrada ao longo do tempo, devido à percentagem de $40,99 \pm 5,74$ (%) obtida.

Relativamente às análises físicas e morfológicas efetuadas aos filmes de PCL e Lutrol F127 estas confirmam os ângulos de contacto obtidos de $58,44 \pm 0,99$ (°) e $59,49 \pm 0,68$ (°) (superfícies superior e inferior, respetivamente) se revelam vantajosos ao longo do tempo, pelo facto de, aquando do seu contacto com o meio a superfície ser molhável; que as suas superfícies apresentam-se porosas, com particularidades e com falhas associadas, sendo assim possível a libertação do fármaco do interior do filme para o meio ao longo do tempo e que, efetivamente, a libertação do fármaco ocorre, devido ao aumento do tamanho do poro observado nas análises posteriores ao estudo da libertação.

De acordo com os resultados obtidos, o mais importante a referir sobre os estudos efetuados acerca da libertação do fármaco (acetazolamida) é que a sua degradação se verifica normalmente a partir do 9º dia de estudo; que relativamente ao local onde o filme é colocado não ocorrem diferenças significativas nos resultados; que sem a utilização de revestimento se verifica o efeito *burst* indesejado e que utilizando-o esse efeito fica atenuado; que tendo em conta o tipo do filme, os melhores resultados são os obtidos nos filmes tipo 2, que na maioria dos ensaios sem que seja feita a reposição do meio de PBS, o valor máximo atingido para a libertação do fármaco fica aquém dos 100% e que o melhor ensaio pode ser considerado o Ensaio 10.

Por fim, considerando o seguimento de toda a investigação concretizada é importante enfatizar que os objetivos iniciais foram cumpridos, na medida em que foram desenvolvidas técnicas de processamento para a preparação de um novo SLCF a

partir de uma mistura de polímeros, com consequente imobilização de fármacos para a sua posterior aplicação intraocular.

4.2. Perspetivas Futuras

Considerando a complexidade do projeto em questão, bem como a variável tempo, certo é que este se mantém aberto a outras perspetivas de investigação que poderão conduzir à melhoria de certos resultados.

Relativamente à execução do filme em si, o método descrito deve ser ainda melhorado, pelo fato dos filmes de menor tamanho (feitos nos moldes de vidro) apresentarem uma morfologia de superfície com mais falhas que os de maior tamanho, o que leva a crer que o facto de não serem colocados em contacto com vidro nas duas superfícies e na estufa a uma temperatura de 50°C durante 3 dias após a evaporação do solvente faz uma certa diferença. De modo a melhorar as características das suas superfícies, uma solução passaria por prensar os filmes de modo a compactá-lo e a eliminar os seus espaços livres através da força mecânica exercida pela prensa e, de seguida, coloca-los na estufa a 50°C, como se procede na execução dos filmes maiores. Outra hipótese seria efetuar este último passo descrito em ordem contrária e consoante os resultados obtidos para as duas tentativas decidir que método seria o melhor.

Assim, a necessidade de melhorar as características das suas superfícies com o intuito de as tornar mais homogéneas, sem tantas particularidades e falhas associadas, de modo a que a libertação do fármaco no interior do filme se dê apenas pela sua passagem através dos poros disponíveis, podendo ser controlada também dessa forma a sua libertação ao longo do tempo, seria solucionada aplicando a solução descrita anteriormente.

Outras hipóteses de estudo futuro seriam as de utilizar um revestimento diferente, de modo a que a libertação do fármaco seja ainda mais controlada ao longo duma escala maior de tempo, bem como efetuar estudos de libertação com fármacos com uma degradação mais lenta, pois se o objetivo passa por aplicar um implante intraocular com durabilidade de cerca de meses, o fármaco não deve degradar-se antes desse tempo e, por fim, averiguar se a substituição do Lutrol F127 pelo de maior peso molecular na preparação dos filmes será possível e quais as suas vantagens em termos de libertação controlada de fármaco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jain, K., *Drug Delivery Systems - An Overview*, in *Drug Delivery Systems*, K. Jain, Editor. 2008, Humana Press. p. 1-50.
2. Natu, M.V., *Drug loading strategies and processing of polymer blends for intraocular controlled drug release application*, in *Chemical Engineering*. 2011, Coimbra's University.
3. Weiner, A.L., *Drug Delivery Systems in Ophthalmic Applications*, in *Ocular Therapeutics*, T. Yorio, A.F. Clark, and M.B. Wax, Editors. 2008, Academic Press: London. p. 7-43.
4. Ullmann, F., Yamamotoo, Y.S and Gerhartz, W., *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH.
5. Schmid, F.-X., *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*, in *eLS*. 2001, John Wiley & Sons, Ltd.
6. Nascimento, A.P.D., *Develop and validate analytical methods for determination of dipyrone sodium and papaverine hydrochloride in pharmaceutical preparations*, in *Faculty of Pharmaceutical Sciences*. 2006, São Paulo's University.
7. Upstone, S.L., *Ultraviolet/Visible Light Absorption Spectrophotometry in Clinical Chemistry*, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 2006, John Wiley & Sons, Ltd.
8. Spectronic, T., *Basic UV-Vis Theory, Concepts and Applications*. [06-2014]; Available from:
http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_12067.pdf.
9. Peacock, A.J. and Calhoun, A.R., *Polymer Chemistry: Properties and Applications*. 2006: Hanser Gardner Publications.
10. Billmeyer, F.W.J., *Textbook of Polymer Science*. 2007: Wiley India Pvt. Limited.
11. Committee on Polymer Science and Engineering, et al., *Polymer Science and Engineering: The Shifting Research Frontiers*. 1994: The National Academies Press.
12. Dash, T.K. and Konkimalla, V.B., *Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review*. *Journal of Controlled Release*, 2012. 158(1): p. 15-33.
13. Ha, J.C., Kim, S. Y. and Lee, Y. M., *Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (Pluronic)/poly(ε-caprolactone) (PCL) amphiphilic block*

- copolymeric nanospheres: I. Preparation and characterization.* Journal of Controlled Release, 1999. 62(3): p. 381-392.
14. Ha, J.C., Kim, S. Y. and Lee, Y. M., *Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)/poly(ϵ -caprolactone) (PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres: II. Thermo-responsive drug release behaviors.* Journal of Controlled Release, 2000. 65(3): p. 345-358.
15. Labet, M. and Thielemans, W., *Synthesis of polycaprolactone: a review.* Chemical Society Reviews, 2009. 38(12): p. 3484-3504.
16. Woodruff, M.A. and Hutmacher, D.W., *The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century.* Progress in Polymer Science, 2010. 35(10): p. 1217-1256.
17. Rudnik, E., *Compostable Polymer Properties and Packaging Applications, in Plastic Films in Food Packaging*, S. Ebnesajjad, Editor. 2013, William Andrew Publishing: Oxford. p. 217-248.
18. Natu, M.V., de Sousa, H.C., and Gil, M.H., *Influence of polymer processing technique on long term degradation of poly(ϵ -caprolactone) constructs.* Polymer Degradation and Stability, 2013. 98(1): p. 44-51.
19. Sinha, V.R., et al., *Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview.* International Journal of Pharmaceutics, 2004. 278(1): p. 1-23.
20. Hakkarainen, M. and Albertsson, A.-C., *Heterogeneous biodegradation of polycaprolactone – low molecular weight products and surface changes.* Macromolecular Chemistry and Physics, 2002. 203(10-11): p. 1357-1363.
21. England, J.L., *Stabilization and Release Effects of Pluronic F127 in Protein Drug Delivery.* Journal of Undergraduate Sciences. Vol 5(2): p. 17-24.
22. Group, B. *Lutrol L and Lutrol F-Grades – Technical Information.* 2010;
Available from:
http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/03_100102e_Lutrol%20L%20and%20Lutrol%20F-Grades.pdf.
23. Nita, L.E., Chiriac, A.P., and Bercea, M., *Effect of pH and temperature upon self-assembling process between poly(aspartic acid) and pluronic F127.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014. 119(0): p. 47-54.
24. Stuart, B.H., *Polymer Analysis.* 2002: Wiley.







25. Fabela, I., *Photopolymerization and Characterization of Unsaturated Polyesters Resins*, in *Department of Chemical Engineering*. Coimbra's University.
26. Bhattacharya, A., Rawlins, J.W. and Ray, P., *Polymer Grafting and Crosslinking*. 2008: Wiley.
27. Gabbott, P., *Principles and Applications of Thermal Analysis*. 2008: Wiley.
28. Coates, J., *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 2006, John Wiley & Sons, Ltd.
29. Bagnis, A., et al., *Antiglaucoma drugs: The role of preservative-free formulations*. Saudi Journal of Ophthalmology, 2011. 25(4): p. 389-394.
30. Agudo-Barriuso, M., et al., *Anatomical and functional damage in experimental glaucoma*. Current Opinion in Pharmacology, 2013. 13(1): p. 5-11.
31. Sambhara, D. and Aref, A.A., *Glaucoma management: relative value and place in therapy of available drug treatments*. Ther Adv Chronic Dis, 2014. 5(1): p. 30-43.
32. Buys, E.S., et al., *Regulation of intraocular pressure by soluble and membrane guanylate cyclases and their role in glaucoma*. Front Mol Neurosci, 2014. 7: p. 38.
33. Wallace, D.M., et al., *The role of matricellular proteins in glaucoma*. Matrix Biol, 2014.
34. Weiner, A.L., *Refillable Devices for Therapy of Ophthalmic Diseases*, in *Drug Product Development for the Back of the Eye*, U.B. Kompella and H.F. Edelhauser, Editors. 2011, Springer US. p. 305-329.
35. Manickavasagam, D. and Oyewumi, M.O., *Critical assessment of implantable drug delivery devices in glaucoma management*. J Drug Deliv, 2013. 2013: p. 895013.
36. Natu, M.V., et al., *In vitro and in vivo evaluation of an intraocular implant for glaucoma treatment*. Int J Pharm, 2011. 415(1-2): p. 73-82.
37. Wells, L.A., Furukawa, S. and Sheardown, H., *Photoresponsive PEG-anthracene grafted hyaluronan as a controlled-delivery biomaterial*. Biomacromolecules, 2011. 12(4): p. 923-32.
38. Yasukawa, T., et al., *Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. 52(1): p. 25-36.
39. Yasukawa, T., et al., *Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. 57(14): p. 2033-46.
40. Del Amo, E.M. and Urtti, A., *Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment*. Drug Discov Today, 2008. 13(3-4): p. 135-43.

41. Wang, Y., et al., *Controlled release of ethacrynic acid from poly(lactide-co-glycolide) films for glaucoma treatment*. Biomaterials, 2004. 25(18): p. 4279-4285.
42. Bertram, J.P., et al., *Sustained delivery of timolol maleate from poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(lactic acid) microspheres for over 3 months*. J Microencapsul, 2009. 26(1): p. 18-26.
43. Natarajan, J.V., et al., *Sustained Release of an Anti-Glaucoma Drug: Demonstration of Efficacy of a Liposomal Formulation in the Rabbit Eye*. PLoS ONE, 2011. 6(9).
44. Katiyar, S., et al., *In situ gelling dorzolamide loaded chitosan nanoparticles for the treatment of glaucoma*. Carbohydr Polym, 2014. 102: p. 117-24.
45. Hasan, A., *Formulation and evaluation of dorzolamide hydrochloride-loaded nanoparticles as controlled release drug delivery system*. Vol. 6. 2012. 67-73.
46. Baraldi, C., et al., *Vibrational study of acetazolamide polymorphism*. Journal of Molecular Structure, 2009. 918(1-3): p. 88-96.
47. Erk, N., *Simultaneous determination of dorzolamide HCL and timolol maleate in eye drops by two different spectroscopic methods*. J Pharm Biomed Anal, 2002. 28(2): p. 391-7.
48. Industrie, C.M.A., *Ficha Técnica BOPSIL 1*. 2010: France.
49. Chen, Y.Y., et al., *Injectable and thermoresponsive self-assembled nanocomposite hydrogel for long-term anticancer drug delivery*. Langmuir, 2013. 29(11): p. 3721-9.
50. Averous, L., et al., *Properties of thermoplastic blends: starch-polycaprolactone*. Polymer, 2000. 41(11): p. 4157-4167.
51. Alishiri, M., et al., *Synthesis and characterization of biodegradable acrylated polyurethane based on poly(epsilon-caprolactone) and 1,6-hexamethylene diisocyanate*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014. 42: p. 763-73.



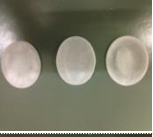


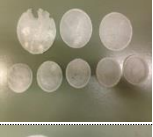

Anexos

Anexo A – Evolução dos filmes de PCL e Lutrol F127








Tabela A.1 – Evolução dos filmes de PCL e Lutrol F127 e das suas condições de preparação e respetiva foto.

Nr.	% w/v	Solvente	% PCL/Lu F127	PCL Perstorp		Lutrol F127		Evaporação do Solvente				Resultado
				US (min)	Agitação (min)	US (min)	Agitação (min)	Banho	Hote	Vácuo	Estufa	
1	15	acetona	0/100	-	-	-	30	-	1dpo*	-	-	
2	15	acetona	75/25	20	15	5	-	-	1dpo*	-	-	
3	15	acetona	100/0	90	5	-	-	-	1dpo*	-	-	
4	10	acetona	75/25	20	-	5	20	-	1dpo*	-	-	
5	10	acetona	50/50	15	-	5	-	1dpo (40°C)	1dpo**	-	-	
6	12	acetona butanona	50/50	15	-	5	-	1dpo (60°C)	1dpo**	-	-	



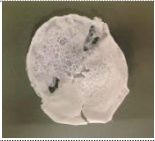




Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica
Síntese de Implantes Biodegradáveis para Aplicação Intraocular

Nr.	% w/v	Solvente	% PCL/Lu F127	PCL Sigma-Aldrich		Lutrol F127		Evaporação do Solvente				Resultado
				US (min)	Agitação (min)	US (min)	Agitação (min)	Banho	Hote	Vácuo	Estufa	
7	15	acetona	50/50	15	5	-	60	-	60 min	-	1dpo (40°C)	
8	12	clorofórmio	50/50	-	45	10	-	-	1dpo**	-	-	
9	12	clorofórmio	75/25	-	45	10	-	-	1dpo**	-	-	
10	12	clorofórmio	25/75	-	45	10	-	-	1dpo**	-	-	
11	12	acetona e clorofórmio (50/50)	50/50	-	45	10	-	-	1dpo**	-	-	
12	12	clorofórmio	45/45+ 10 glicerol	10	10	10	10	-	1dpo*	-	-	
13	12	acetona e clorofórmio (20/80)	45/45 + 10 glicerol	20	-	10	1dpo	-	1dpo**	-	-	


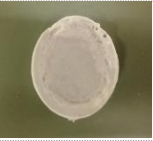


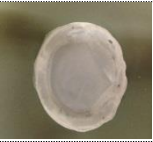


Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica
Síntese de Implantes Biodegradáveis para Aplicação Intraocular

Nr.	% w/v	Solvente	% PCL/Lu F127	PCL Sigma-Aldrich		Lutrol F127		Evaporação do Solvente				Resultado
				US (min)	Agitação (min)	US (min)	Agitação (min)	Banho	Hote	Vácuo	Estufa	
14	12	acetona e clorofórmio (20/80)	45/45 + 10 glicerol	20	-	10	1dpo	-	1dpo**	-	-	
15	12	acetona e clorofórmio (20/80)	45/45 + 10 glicerol	20	-	10	1dpo	-	1dpo**	-	-	
16	12	acetona e clorofórmio (20/80)	45/45 + 10 glicerol	20	-	10	1dpo	-	1dpo**	-	-	
17	12	clorofórmio	50/50	30	-	10	1dpo	-	1dpo**	-	-	
18	12	acetona e clorofórmio (20/80)	45/45 + 10 glicerol	45	-	10	1dpo	-	1dpo**	-	-	
19	12	acetona e clorofórmio (20/80)	50/50	50	-	10	10	-	1dpo**	-	-	
20	12	clorofórmio	45/45+ 10 glicerol	60	-	10	10	-	1dpo**	-	-	


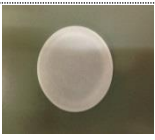




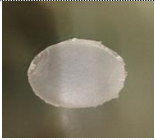
Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica
Síntese de Implantes Biodegradáveis para Aplicação Intraocular

Nr.	% w/v	Solvente	% PCL/Lu F127	PCL Sigma-Aldrich		Lutrol F127		Evaporação do Solvente				Resultado
				US (min)	Agitação (min)	US (min)	Agitação (min)	Banho	Hote	Vácuo	Estufa	
21	15	acetona	50/50	60	-	15	-	1dpo (40°C)	-	1dpo (37°C)	-	
22	12	clorofórmio + fármaco	50/50	40	10	60	1dpo	-	1dpo**	-	-	
23	12	acetona	50/50	60	-	20	-	1dpo (40°C)	-	1dpo (37°C)	-	
24	12	clorofórmio	50/50	60	-	20	-	1dpo (40°C)	-	1dpo (37°C)	-	
25	12	acetona e clorofórmio (20/80)	50/50	60	-	20	-	1dpo (40°C)	-	1dpo (37°C)	-	
26	12	clorofórmio	45/45 + 10 glicerol	60	-	20	-	1dpo (40°C)	-	1dpo (37°C)	-	
27	12	acetona	50/50	60	-	20	1dpo	-	-	1dpo (37°C)	-	




Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica
Síntese de Implantes Biodegradáveis para Aplicação Intraocular

Nr.	% w/v	Solvente	% PCL/Lu F127	PCL Sigma-Aldrich		Lutrol F127		Evaporação do Solvente				Resultado
				US (min)	Agitação (min)	US (min)	Agitação (min)	Banho	Hote	Vácuo	Estufa	
28	12	clorofórmio	50/50	60	-	20	1dpo	-	-	1dpo (37°C)	-	
29	12	acetona e clorofórmio (20/80)	50/50	60	-	20	1dpo	-	-	1dpo (37°C)	-	
30	12	acetona	50/50	60	-	20	-	1dpo (40°C)	-	1dpo (37°C)	-	
31	12	clorofórmio	50/50	60	-	20	-	1dpo (40°C)	-	1dpo (37°C)	-	
32	12	acetona e clorofórmio (20/80)	50/50	60	-	20	-	1dpo (40°C)	-	1dpo (37°C)	-	
33	12	acetona	50/50	60	-	20	1dpo	-	1dpo*	-	-	
34	12	clorofórmio	50/50	60	-	20	1dpo	-	1dpo*	-	3dias (50°C) +3h (105°C)	

Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica
Síntese de Implantes Biodegradáveis para Aplicação Intraocular

Nr.	% w/v	Solvente	% PCL/Lu F127	PCL Sigma-Aldrich		Lutrol F127		Evaporação do Solvente				Resultado
				US (min)	Agitação (min)	US (min)	Agitação (min)	Banho	Hote	Vácuo	Estufa	
35	12	acetona e clorofórmio (20/80)	50/50	60	-	20	1dpo	-	1dpo*	-	3dias (50°C) +3h (105°C)	
36	12	clorofórmio	50/50	60	-	20	1dpo	-	1dpo**	-	3dias (50°C)	 (Universidade do Porto)
37	12	acetona e clorofórmio (20/80)	50/50	60	-	20	1dpo	-	1dpo**	-	3dias (50°C)	
38	12	clorofórmio	50/50	60	-	20	1dpo	-	-	2dias	3dias (50°C)+4h (70°C)	
39	12	acetona e clorofórmio (20/80)	50/50	60	-	20	1dpo	-	-	2dias	3dias (50°C)	
40	12	clorofórmio	50/50	75	-	60	1dpo	-	Bancada 2 dias**	-	3 dias (50°C)	
41	12	clorofórmio	50/50	75	-	60	1dpo	-	-	-	3 dias (50°C)	

Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica
Síntese de Implantes Biodegradáveis para Aplicação Intraocular

Nr.	% w/v	Solvente	% PCL/Lu F127	PCL Sigma-Aldrich		Lutrol F127		Evaporação do Solvente				Resultado
				US (min)	Agitação (min)	US (min)	Agitação (min)	Banho	Hote	Vácuo	Estufa	
42	12	clorofórmio	50/50	75	-	60	1dpo	-	-	-	3 dias (37°C)	
43	12	clorofórmio	75/25	75	-	60	1dpo	-	1dpo**	-	3 dias (50°)	(Univeridade do Porto)
44	12	clorofórmio	66/33	75	-	60	1dpo	-	1dpo**	-	3 dias (50°C)	(Univeridade do Porto)
45	12	clorofórmio	50/50	60	-	20	1dpo	-	2 dias**	-	-	
46	12	clorofórmio + fármaco	50/50	75	-	20	1dpo	-	2 dias**	-	-	

1dpo: de um dia para o outro

*coberto por papel de alumínio

**coberto por papel de filtro

Notas:

1 – Os primeiros filmes da Tabela A.1 (pág. 63) em que foi utilizada a PCL da Perstorp não revelaram resultados tão satisfatórios quanto os filmes em que a PCL da Sigma-Aldrich foi utilizada, sendo por isso escolhida a última para desenvolver-se o restante trabalho.

2 – A certa altura dos estudos o glicerol foi utilizado para diminuir a ondulação presente nos filmes depois da evaporação do solvente, no entanto a resolução desse problema não passou pela adição do glicerol e sim pela descrição feita no Capítulo 2 na preparação dos filmes de PCL e Lutrol F127.

3 – Os filmes 45 e 46 foram feitos utilizando os moldes de vidro de 12 mm e não as caixas de petri (como os restantes filmes da Tabela A.1).

Anexo B – Resultados da Análise de Perda de Massa dos Filmes Nr. 43 e 44 do

Anexo A – Tabela A.1

Tabela B.1 – PM das amostras de PCL e Lutrol F27.



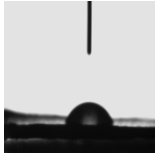
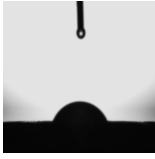
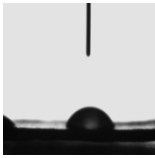

Filme	<i>mi</i> (mg)	<i>md</i> (mg)	PM (%)	Média PM ± σ (%)
Nr. 43	386	340	11,92	12,20±0,27
	353	309	12,46	
	401	352	12,22	
Nr. 44	335	267	20,30	19,87±0,45
	417	334	19,90	
	371	299	19,41	

De acordo com a Tabela B.1, os filmes com maior percentagem de Lutrol F127 na sua composição apresentaram uma *PM* superior que os filmes com menor percentagem do mesmo polímero, verificando-se, assim, que este polímero se degrada mais facilmente que a PCL.

Anexo C – Resultados da Análise de AC do Filme Nr. 37 do Anexo A – Tabela

A.1

Tabela C.1 – Medições do ângulo de contacto da amostra de PCL e Lutrol F127.

Superfície Superior				Superfície Inferior			
Ângulo (°)	Erro (°)	Foto	Valor médio (°)	Ângulo (°)	Erro (°)	Foto	Valor médio (°)
55.72	0.81		57.06 ± 0.73	44.15	0.50		54.66 ± 0.42
58.94	0.30			58.61	0.49		
56.53	1.07			61.21	0.28		

Tendo em conta os resultados obtidos na Tabela C.1, as superfícies em questão mostraram-se semelhantes em termos de ângulo de contacto, uma vez que os valores obtidos foram próximos: 57.06 ± 0.73 (°) e 54.66 ± 0.42 (°) para as superfícies superior e inferior, respetivamente.

Anexo D – Resultados da Análise de SEM do Filme Nr. 37 do Anexo A – Tabela A.1

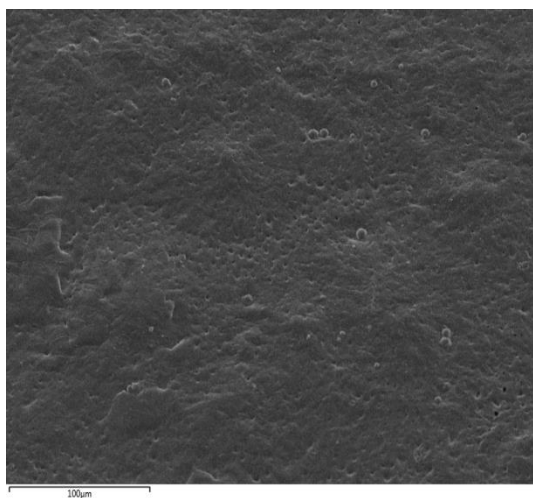


Figura D.1-a) – Imagem SEM da superfície superior do filme Nr. 37.

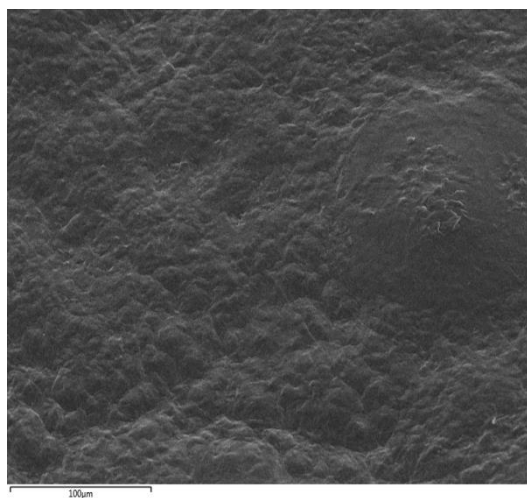


Figura D.1-b) – Imagem SEM da superfície inferior do filme Nr. 37.

Nas figuras D.1-a) e D.1-b) foi possível observar-se que as superfícies, tanto superior como inferior, não apresentaram diferenças significativas relativamente à sua morfologia, apenas se evidencia na superfície inferior uma rugosidade ligeiramente maior que na outra superfície, certificando os resultados obtidos na Tabela C.1.

Anexo E – Estudo do Comportamento da Acetazolamida em PBS

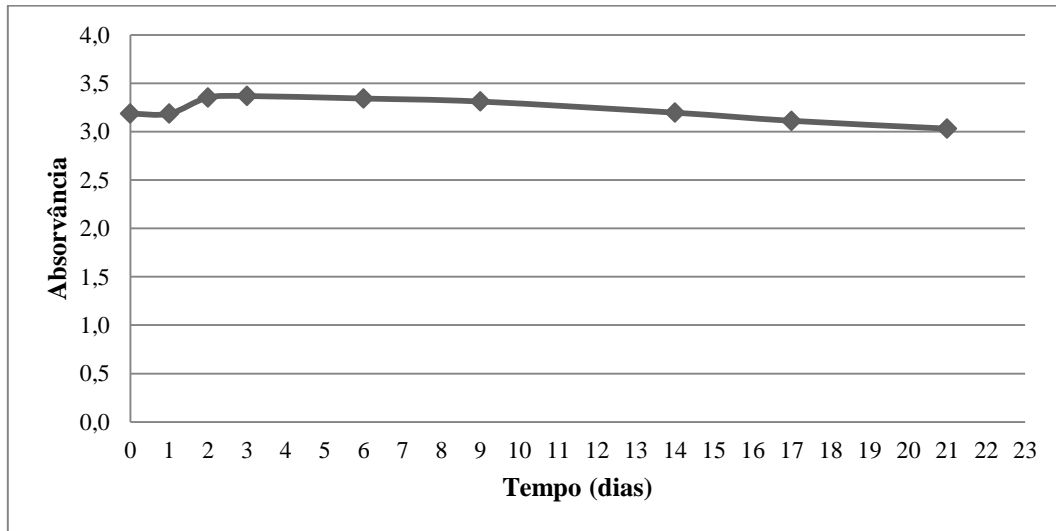


Gráfico E.1 – Comportamento da acetazolamida obtido através da sua absorvância ao longo do tempo.

Neste Gráfico E.1 tornou-se evidente a degradação do fármaco acetazolamida a partir do 9º dia de estudo, devido ao decréscimo dos valores verificados após esse momento.

Anexo F – Resultados Obtidos nos Ensaios 11 e 12 do Estudo da Liberação de Fármaco

Tabela F.1 – Valores discriminados dos resultados obtidos no Ensaio 11 (fármaco – dorzolamida, local – shaker, filme tipo 1, com revestimento e sem reposição de PBS).

Tempo (dias)	1 (%)	2 (%)	Média (%)	σ (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	49,08	82,71	65,90	23,78
2	72,14	98,55	85,35	18,68
3	88,43	129,35	108,89	28,94
7	120,70	151,38	136,04	21,69
10	122,48	154,88	138,68	22,91
14	135,54	162,05	148,79	18,75
17	141,65	155,89	148,77	10,07
-	-	-	-	-
medição do 1º dia				
valor máximo atingido	0,35	0,51	0,43	0,12

Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica
Síntese de Implantes Biodegradáveis para Aplicação Intraocular

Tabela F.2 – Valores discriminados dos resultados obtidos no Ensaio 11 (fármaco – dorzolamida, local – shaker, filme tipo 2, com revestimento e sem reposição de PBS).

Tempo (dias)	1 (%)	2 (%)	Média (%)	σ (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	27,08	21,71	24,39	3,80
2	65,34	42,45	53,90	16,19
3	95,62	74,11	84,87	15,21
7	122,21	112,60	117,40	6,79
10	125,73	115,09	120,41	7,53
14	128,29	131,05	129,67	1,95
17	123,91	116,57	120,24	5,19
-	-	-	-	-
medição do 1º dia				
valor máximo atingido	0,21	0,17	0,19	0,03

Anexo G – Resultados Obtidos para a Leitura da Absorvância dos Filmes

Branco

Tabela G.1 – Valores de absorvância (%) ao longo do tempo do filme branco de cada ensaio.

Ensaio →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tempo (dias) ↓												
1	47,26	33,39	5,32	0,44	2,43	1,51	1,70	1,92	0,62	0,50	4,93	3,13
2	11,37	1,17	49,14	29,30	2,62	1,59	3,00	4,35	0,15	4,15	9,98	13,45
3	0,71	1,50	4,68	1,47	3,09	1,52	4,61	2,31	0,10	0,52	4,76	5,35
6	2,44	-	-	-	0,98	1,59	2,73	-	-	-	-	-
7	-	2,25	3,00	1,46	-	-	-	2,95	0,26	1,28	5,47	4,46
8	-	-	-	-	1,79	-	-	-	0,10	-	-	-
9	2,66	-	-	-	2,09	1,76	3,43	-	-	-	-	-
10	-	1,04	11,49	2,71	-	-	-	2,62	0,47	0,61	10,10	8,11
12	-	-	-	-	2,36	-	-	-	-	-	-	-
14	38,65	0,65	2,50	7,45	2,08	0,85	3,70	3,39	0,26	0,24	9,95	5,20
16	-	-	-	-	3,35	-	-	-	-	-	-	-
17	2,31	1,46	2,91	9,94	2,12	1,76	3,48	5,01	0,10	0,22	13,23	9,02
19	-	-	-	-	1,68	-	-	-	-	-	-	-
21	49,14	4,48	11,41	1,13	2,83	3,39	4,18	0,41	0,47	0,04	-	-
22	-	-	-	-	1,28	-	-	-	-	-	-	-

Anexo H – Estrutura Química do Diisocianato hexametileno (HDI)



Figura H.1 – Diisocianato hexametileno^[51].