

Tânia Filipa Coelho Morgado

PREPARAÇÃO DE UM SISTEMA DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE UM FÁRMACO PARA APLICAÇÃO EM OFTALMOLOGIA

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química, especialização em Biossistemas, orientada pela Professora Doutora Maria Helena Mendes Gil e pelo Doutor António Jorge Rebelo Ferreira Guiomar e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Janeiro 2016



Universidade de Coimbra

Tânia Filipa Coelho Morgado

PREPARAÇÃO DE UM SISTEMA DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE UM FÁRMACO PARA APLICAÇÃO EM OFTALMOLOGIA

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química, especialização em Biossistemas, orientada pela Professora Doutora Maria Helena Mendes Gil e pelo Doutor António Jorge Rebelo Ferreira Guiomar e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Janeiro 2016







AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de manifestar o mais sincero agradecimento aos meus orientadores, Professora Doutora Maria Helena Gil e Doutor António Jorge Guiomar, por toda a orientação prestada, competência, transmissão de conhecimentos e disponibilidade que sempre apresentaram para me ajudar.

Quero agradecer às Doutoras Patrícia Alves e Patrícia Coimbra, que me ajudaram ao longo destes meses, pela disponibilidade e orientação na parte experimental. Um agradecimento especial à investigadora Ana Paula Vieira, que me acompanhou ao longo deste trabalho, pela permuta de ideias e orientação no laboratório.

À Engenheira Cátia Costa, pela concretização da análise de DMTA, às Doutoras Isabel Nunes Correia e Isabel Dantas, do Centro de Neurociência e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, pela utilização da ultracentrífuga e o Doutor Francisco Figueiredo, do Instituto de Biologia Celular e Molecular da Universidade do Porto, pela realização da análise de TEM.

Gostaria ainda de agradecer a todos os meus colegas de laboratório, pelos momentos de descontração e ajuda mútua. À Mónica Simões, que disponibilizou parte do seu tempo para analisar o tamanho das minhas partículas e se mostrou sempre disponível para me auxiliar.

A todos os meus amigos, pela amizade, conselhos e pelos bons momentos que passámos ao longo de todo o meu percurso académico.

Finalmente, agradeço à minha mãe e ao meu irmão, os pilares da minha vida, pelas palavras de apoio e incentivo e ao meu pai, um exemplo de luta e coragem, que certamente teria muito orgulho em ver-me concluir esta etapa.

A todos, um enorme Obrigada!

RESUMO

A administração oftálmica de fármacos é maioritariamente realizada na forma de colírios. Estes sistemas são ineficientes pois requerem aplicações frequentes, conduzem a perdas significativas de fármaco (cerca de 95%) e podem causar efeitos secundários. Para aumentar a eficiência e reduzir os efeitos secundários, tem-se procurado desenvolver sistemas de libertação controlada de fármacos sob a forma de lentes de contacto ou inserções oculares, ambas carregadas com fármaco. Estes sistemas apresentam-se promissores, uma vez que o tempo de contacto com o olho é prolongado e a perda de fármaco é minimizada.

Neste trabalho, foram preparados várias membranas de base quitosano, tendo sido selecionadas duas delas para o desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de um fármaco: membranas de quitosano/poli(álcool vinílico) reticuladas com glioxal (CS/PVA) e membranas de quitosano modificado com ácido lático e de PVA, reticuladas com glioxal(CS-LA/PVA). Estas membranas foram caracterizadas por refratometria, goniometria de ângulos de contacto, transmitância e análise termomecânica dinâmica (DMTA). Os resultados da caracterização demonstraram que a membrana de CS/PVA reticulada com glioxal foi a que apresentou propriedades mais adequadas à sua utilização como lente de contacto. Nelas foi incorporado o fármaco anti-inflamatório 21-fosfato dissódico de dexametasona, por oclusão e por *soaking*. Quando o fármaco foi incorporado por oclusão, os resultados mostraram que equilíbrio foi atingido mais cedo para a membrana de CS-LA/PVA do que para a membrana de CS/PVA, libertando esta última mais fármaco. Já na incorporação por *soaking*, a libertação foi igualmente rápida mas as membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA apresentaram um perfil de libertação semelhante.

Adicionalmente, prepararam-se nanopartículas de quitosano-poli(ácido acrílico) (CS/PAA) e micropartículas de silicone, adicionando-as às membranas de CS/PVA reticuladas com glioxal durante a sua preparação. Determinou-se o tamanho das partículas e a sua morfologia e estudou-se a libertação de duas formas do fármaco. Para o sistema contendo micropartículas de silicone foi estudada a libertação de dexametasona, enquanto que para o sistema com nanopartículas de CS/PAA fez-se uso de 21-fosfato dissódico de dexametasona. A libertação de fármaco a partir da membrana com micropartículas de silicone apresentou um perfil muito irregular na fase inicial. A membrana com nanopartículas de CS/PAA, com fármaco incorporado por oclusão, apresentou um perfil com duas libertações, enquanto que na membrana com fármaco incorporado por soaking e ocluso nas nanopartículas, o perfil obtido apresentou uma libertação mais lenta e uma maior quantidade de fármaco libertada em relação à membrana de CS/PVA sem partículas.

ABSTRACT

Ophthalmic drug delivery is generally carried out in the form of eye drops. These systems are inefficient because they require frequent applications, lead to significant drug loss (about 95%) and cause side effects. To increase efficiency and reduce side effects, there have been attempts at developing controlled release systems based on drug-loaded contact lenses and drug-loaded ocular insertions. These are promising systems since the contact time with the eye is prolonged and the drug loss is minimized.

In this work, several chitosan-based membranes were prepared and two of them were selected for developing a controlled drug release system: chitosan/poly(vinyl alcohol) membranes (CS/PVA) crosslinked with glyoxal and chitosan membranes modified with lactic acid and PVA (CS-LA/PVA), crosslinked with glyoxal. These membranes were characterized by refractometry, contact angle goniometry, transmittance and dynamic mechanical thermal analysis (DMTA). The characterization results demonstrate that the CS/PVA membrane crosslinked with glyoxal revealed the most adequate properties for an application as contact lens. Dexamethasone 21-phosphate disodium salt, an anti-inflammatory drug, was incorporated in the membranes by occlusion and by soaking. When the drug was impregnated by occlusion, the results showed that equilibrium was reached sonner for the CS-LA/PVA membrane than for the CS/PVA membrane, which released more drug. In the case of drug incorporation by soaking, drug release was also fast but CS/PVA and CS-LA/PVA membranes showed similar release profiles.

In addition, chitosan-poly(acrylic acid) (CS/PAA) nanoparticles and silicone microparticles were prepared, adding them to the CS/PVA membranes crosslinked with glyoxal during their preparation.. The particle size and morphology were determined and the release of two forms of the drug was studied. For the system with silicone microparticles, dexamethasone was used, whereas for the system containing CS/PAA nanoparticles dexamethasone 21-phosphate disodium salt was used. The drug release profile of the membrane with silicon microparticles was very irregular in its initial stage. The membrane with CS/PAA nanoaparticles, with drug incorporated by occlusion, showed a profile with two release phases, whereas the membrane with drug incorporated by soaking and inside the nanoparticles had a slower release and a greater amount of drug released in comparison to the membrane without CS-PAA nanoparticles.

ÍNDICE

OBJETIVOS.		1
Capítulo 1	l	3
1. Intro	DUÇÃO	3
1.1. Aı	natomia e fisiologia do olho	3
1.2. Bi	odisponibilidade de fármaco no olho humano	4
1.3. Si	stemas de libertação controlada de fármacos	5
1.3.1.	Lentes de contacto	7
1.3.2.	Inserções oculares	8
1.4. Si	stemas de libertação controlada de base polimérica	9
1.4.1.	Polímeros utilizados na preparação das membranas	11
1.4.2.	Nanopartículas	13
1.4.3.	Difusão de um fármaco no interior de uma matriz polimérica	14
1.5. Pr	eparação das membranas	20
1.5.1.	Fármacos utilizados	21
1.5.2.	Mecanismos	22
1.6. Té	écnicas	25
1.6.1.	Espetrofotometria	25
1.6.2.	Refratometria	25
1.6.3.	Goniometria de ângulos de contacto	26
1.6.4.	Transmitância	28
1.6.5.	Análise termomecânica dinâmica (DMTA)	28
Capítulo 2	2	31
2. Matei	riais e Métodos	31
2.1. Re	eagentes	31
2.2. Pr	eparação do sistema de libertação de fármaco	32
2.2.1.	Método de impregnação de fármaco	32

	2.2	.2.	Preparação de membranas de base quitosano com e sem PVA	32
2	2.3.	Pre	paração de micropartículas de silicone	33
	2.3	.1.	Procedimento	33
	2.3	.2.	Síntese das membranas carregadas com partículas de silicone	34
2	2.4.	Pre	paração de nanopartículas de quitosano/poli(ácido acrílico)	34
	2.4	.1.	Procedimento	35
	2.4	.2.	Síntese das membranas carregadas com nanopartículas de CS/PAA	35
2	2.5.	Ava	aliação da degradação térmica do fármaco	36
2	2.6.	Pre	paração do meio de libertação	36
2	2.7.	Pro	cesso de libertação	37
	2.7	.1.	Método da quantificação de fármaco	37
2	2.8.	Car	acterização	38
	2.8	.1.	Capacidade de absorção de água (swelling)	38
	2.8	.2.	Índice de refração	39
	2.8	.3.	Ângulo de contacto	39
	2.8	.4.	Transmitância	41
	2.8	.5.	Análise termomecânica dinâmica (DMTA)	41
	2.8	.6.	Avaliação do tamanho das nanopartículas	41
	2.8	.7.	Análise TEM	41
Cap	oítulo	3		43
3.	RES	SULT	ADOS E DISCUSSÃO	43
3	3.1.	Sele	eção da formulação a utilizar no sistema de libertação controlada do fármaco	43
	3.1	.1.	Capacidade de absorção de água	45
3	3.2.	Car	racterização das membranas selecionadas	48
	3.2	.1.	Índice de refração	48
	3.2	.2.	Ângulos de contacto	49
	3.2	.3.	Transmitância	49
	3.2	4	Análise termomecânica dinâmica	51

3	.3. C	aracterização das partículas	55
	3.3.1.	Tamanho das partículas	55
	3.3.2.	Morfologia das nanopartículas de CS/PAA	56
3	.4. M	lembranas carregadas com partículas	57
3	.5. E	studo da cinética de libertação de fármaco	58
	3.5.1.	Espetros de absorção de fármaco	58
	3.5.2.	Curvas de calibração	59
	3.5.3.	Avaliação da degradação térmica do fármaco	59
	3.5.4.	Membranas de base quitosano sem partículas	60
	3.5.5.	Membranas de base quitosano carregadas com partículas	65
CAF	ÝTULO 4	4	71
4.	Conc	LUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHO FUTURO	71
CAF	ÝTULO :	5	75
5.	REFER	RÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
Ani	EXOS		84
Ane	exo A –	Partículas de CS/PAA e de silicone	85
Ane	exo B –	Aiuste do perfil de libertação do fármaço aos modelos matemáticos	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia do olho humano [6]
Figura 2 - O sistema lacrimal (adaptado de [9])
Figura 3 - Variação da concentração de fármaco no sangue em função do tempo, para diferentes
tipos de administração do medicamento [21]6
Figura 4 - Esquema de lente de contacto carregada com nanopartículas no olho [30]
Figura 5 - Sistema da administração de fármaco do tipo reservatório: a) sistemas transdérmicos
e b) sistemas de implante ou orais [44]10
Figura 6 - Sistema de administração de fármaco matricial [44]10
Figura 7 - Desacetilação da quitina para obtenção de quitosano11
Figura 8 - Estrutura química do PVA
Figura 9 - Estrutura química do PVB (adaptado de [64]).
Figura 10 - Esquema representativo da libertação de fármaco a partir de uma matriz polimérica
em que l é a espessura da matriz, C0 a concentração inicial de fármaco e C1 a concentração de
fármaco à superfície do sistema15
Figura 11 - Representação gráfica do modelo de Korsmeyer-Peppas
Figura 12 - Representação gráfica do modelo de ordem zero em que as curvas obtidas são do
tipo $f(t) = a + bt$
Figura 13 – Representação gráfica do modelo de primeira ordem com um declive de –k/2,303
Figura 14 - Representação gráfica do modelo de Higuchi em que as curvas obtidas são do tipo
$f(t) = a + bt^{0.5}$
Figura 15 - Estrutura química do fármaco 21-fosfato dissódico de dexametasona [78]21
Figura 16 - Estrutura química do fármaco dexametasona [79]
Figura 17 - Mecanismo de reticulação do quitosano. a) glioxal reage com os grupos amina do
quitosano b) glioxal reage com os grupos hidroxilo do quitosano (adaptado de [82])22
Figura 18 - Reação de reticulação do quitosano com glutaraldeído (adaptado de [83])23
Figura 19 - Reação de reticulação entre PVA e glioxal (adaptado de [84])23
Figura 20 - Reação de reticulação do PVA com glutaraldeído (adaptado de [84])24
Figura 21 - Reação de ativação dos grupos carboxílicos do ácido lático através da carbodiimida
na presenca de quitosano [85].

Figura 22 - Ângulo de contacto entre a gota de líquido e uma superfície sólida, para o método
da gota séssil
Figura 23 - Ângulo de contacto formado entre a superfície sólida e bolha de ar, para o método
da bolha cativa
Figura 24 - Mecanismo de formação das nanopartículas de quitosano poli(ácido acrílico) 34
Figura 25 - Método de medição do ângulo de contacto por gota séssil (à esquerda) e por bolha
cativa (à direita)
Figura 26 - Aparência das membranas de base quitosano obtidas
Figura 27 - Comparação da capacidade de inchaço das membranas de base quitosano variando
a quantidade de reticulante ou de PVA, quando colocadas numa solução de lágrimas artificiais
(barras de erro: desvio padrão; n = 3)
Figura 28 - Comparação da capacidade de inchaço das membranas de base quitosano reticulada
com glutaraldeído ou glioxal e da membrana de CS-LA/PVA, reticulada com glioxal, quando
colocadas numa solução de lágrimas artificiais (barras de erro: desvio padrão; n = 3) 46
Figura 29 - Espetros de transmitância entre 200 e 700 nm, para membranas secas, CS/PVA e
CS-LA/PVA, reticuladas
Figura 30 - Resultados da análise DMTA da membrana de CS/PVA) seca, para taxa de
aquecimento 5 °C min ⁻¹ : variação do módulo de elasticidade e fator de perda (tanδ) em função
da temperatura para frequências de oscilação 1 e 10 Hz. O gráfico menor representa uma
ampliação do maior na zona entre 50 e 150 °C
Figura 31 - Resultados da análise DMTA da membrana de CS-LA/PVA seca, para taxa de
aquecimento 5 °C min ⁻¹ : variação do módulo de elasticidade e fator de perda (tanδ) em função
da temperatura para frequências de oscilação 1 e 10 Hz. O gráfico menor representa uma
ampliação do maior na zona entre 0 e 150 °C
Figura 32 - Resultados da análise DMTA da membrana de CS (membrana 6) seca, para taxa
de aquecimento 5 $^{\circ}$ C min $^{-1}$: variação do módulo de elasticidade e fator de perda (tan δ) em
função da temperatura para frequências de oscilação 1 e 10 Hz. O gráfico menor representa uma
ampliação do maior na zona entre 0 e 150 °C
Figura 33 - Variação do módulo de armazenamento em função da temperatura, para as
membranas secas 6, 12 e 13, com taxa de aquecimento 5 °C min ⁻¹ e frequências de oscilação 1
e 10 Hz
Figura 34 - Micropartículas de silicone. 56
Figura 35 - Nanopartículas de CS/PAA (à esquerda) e aparência das partículas de CS/PAA
sujeitas ao processo de liofilização (à direita)

Figura 36 - Micrografias TEM das nanopartículas de CS/PAA sem fármaco (à esquerda) e com
fármaco (à direita)
Figura 37 - Membranas de CS/PVA carregadas com nanopartículas de CS/PAA (à esquerda) e
micropartículas de silicone (à direita)
Figura 38 - Espetro de absorvância dos fármacos dexametasona e 21-fosfato dissódico de
dexametasona, de concentrações 50 μg/mL, em solução de lágrimas artificiais58
Figura 39 - Curva de calibração da dexametasona em solução de lágrimas artificiais59
Figura 40 - Curva de calibração de 21-fosfato dissódico de dexametasona em solução de
lágrimas artificiais
Figura 41 - Espetros de absorvância obtidos no ensaio de degradação de 30 μg/mL de
dexametasona em solução de lágrimas artificiais, a 60 °C, durante 6 horas59
Figura 42 - Espetros de absorvância obtidos no ensaio de degradação de 30 $\mu g/mL$ de 21-
fosfato dissódico de dexametasona em solução de lágrimas artificiais, a 40 $^{\circ}$ C, durante 24 horas.
60
Figura 43 - Quantidade de 21-fosfato dissódico de dexametasona libertada, ao longo do tempo,
em solução de lágrimas artificiais, a 37 °C (fármaco incorporado nas membranas 12 e 13 por
oclusão, barras de erro: desvio padrão; $n=3$). O gráfico menor representa uma ampliação do
maior até às 8 horas60
Figura 44 - Quantidade de 21-fosfato dissódico de dexametasona libertada ao longo do tempo,
a partir das membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA, em solução de lágrimas, artificiais a 37
$^{\circ}$ C (fármaco incorporado nas membranas por soaking, barras de erro: desvio padrão; $n=3$). O
gráfico menor representa uma ampliação do maior até às 8 horas
Figura 45 - Quantidade de dexametasona libertada, ao longo do tempo, em solução de lágrimas
artificiais, a 37 °C, pela membrana de CS/PVA (membrana 12), carregada com partículas de
silicone (barras de erro: desvio padrão; n = 3)65
Figura 46 - Quantidade de 21-fosfato dissódico de dexametasona libertada a partir da
membrana de CS/PVA (membrana 12), carregada com partículas de CS/PAA (fármaco no
interior das partículas; barras de erro: desvio padrão; n = 3). O gráfico menor representa uma
ampliação do maior no 1º dia
Figura 47 - Quantidade de 21-fosfato dissódico de dexametasona libertada pela membrana de
CS/PVA carregada com partículas de CS/PAA (fármaco no interior das partículas e incorporado
na membrana, por soaking; barras de erro: desvio padrão; n = 3). O gráfico menor representa
uma ampliação do maior no 1º dia

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos sistemas de libertação controlada [8]	9
Tabela 2 - Formas de quitosano investigadas em oftalmologia.	12
Tabela 3 - Interpretação dos mecanismos de libertação a partir de matrizes polimér	
geometria planar [73]. ^a	17
Tabela 4 - Medidas dos ângulos de contacto da água de lentes de contacto hidrófilas com	nerciais
com diferentes conteúdos de água, obtidos através do método sessile drop	27
Tabela 5 - Composição das membranas de base quitosano.	32
Tabela 6 - Composição da solução de lágrimas artificiais [96]	36
Tabela 7 - Resultados da solubilidade em água das membranas de base quitosano prep	aradas.
	43
Tabela 8 - Conteúdo de água (EWC) das membranas de base quitosano/PVA reticulad	as com
glioxal e glutaraldeído e da membrana de CS-LA/PVA reticulada com glioxal,	quando
colocadas numa solução de lágrimas artificiais (erro: desvio padrão; n = 3)	47
Tabela 9 - Índices de refração (erro: desvio padrão; n = 3)	48
Tabela 10 - Valores médios dos ângulos de contacto determinados com água, pelos m	nétodos
da gota séssil e da bolha cativa (erro: desvio padrão; n = 8)	49
Tabela 11 - Temperaturas de transição vítrea das membranas secas de CS, de CS/PV	'A e de
CS-LA/PVA, obtidas pela análise DMTA (teste realizado de -130 a 150 °C; t	axa de
aquecimento 5 °C min ⁻¹ ; frequências de oscilação: 1 e 10 Hz)	51
Tabela 12 - Diâmetros médios e índices de polidispersão (PDI) das nanopartículas de C	S/PAA
e micropartículas de silicone, a 37 °C (erro: desvio padrão; n = 4)	55
Tabela 13 - Coeficiente de correlação linear (R2) obtido através da linearização dos m	nodelos
matemáticos para o perfil de libertação de 21-fosfato dissódico de dexametasona a pa	rtir das
membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA.	62
Tabela 14 - Espessura das membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA estudadas na lib	ertação
de fármaco incorporado por oclusão e soaking.	63
Tabela 15 - Valores do parâmetro n e mecanismo de transporte obtidos do modelo Kors	meyer-
Peppas, a partir das membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA preparadas com impregna	ação de
fármaco por oclusão e por soaking	63

Tabela 16 - Coeficiente de difusão aparente e constante cinética, k, obtidos através do modelo
de Korsmeyer-Peppas, para o perfil de libertação de 21-fosfato dissódico de dexametasona a
partir das membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA
Tabela 17 - Coeficiente de correlação linear (R2) obtido através da linearização dos modelos
matemáticos para o perfil de libertação de 21-fosfato dissódico de dexametasona a partir da
membrana de CS/PVA, com nanopartículas de CS/PAA (fármaco no interior das partículas).
67
Tabela 18 - Coeficiente de correlação linear (R ²) obtido através da linearização dos modelos
matemáticos para o perfil de libertação de 21-fosfato dissódico de dexametasona a partir da
membrana de CS/PVA, com nanopartículas de CS/PAA (fármaco no interior das partículas e
incorporado na membrana)
Tabela 19 - Coeficiente de difusão aparente e constante cinética, k, obtidos através do modelo
de Korsmeyer-Peppas, para o perfil de libertação de 21-fosfato dissódico de dexametasona da
membrana de CS/PVA, com nanopartículas de CS/PAA (fármaco no interior das partículas e
incorporado na membrana)

LISTA DE ABREVIATURAS

AA Ácido acrílico

AIC Critério de informação de Akaike

BIC Critério de informação bayesiano

Brij 35 Éter laurílico de poli(etileno glicol)

CMC N-ciclohexil-N'-(2-morfolinoetil)-carbodiimida meto-*p*-toluenossulfonato

CS Quitosano

CS/PAA Quitosano/poli(ácido acrílico)

CS-LA/PVA Membrana de quitosano modificado com ácido lático e de PVA

DMTA Análise termomecânica dinâmica

DSC Calorimetria diferencial de varrimento

DLS Dispersão dinâmica da luz

EWC Equilibrium water content

HEMA 2-hidroxietilmetacrilato

IR Índice de refração

OTMS Trimetoxi(octadecil)silano

PAA Poli(ácido lático)

PDI Índice de polidispersão

PGA Poli(ácido glicólico)

PLA Poli(ácido lático)

PLGA Poli[(ácido lático)-co-(ácido glicólico)

PVA Poli(álcool vinílico)

PVB Poli(vinil butiral)

SCL Soft contact lens

 $T_{\rm g}$ Temperatura de transição vítrea

TGA Análise termogravimétrica

UV Ultravioleta

Vis Vísivel

OBJETIVOS

A maioria das formulações oftalmológicas para o tratamento de doenças oculares são administradas na forma de colírios. Esta forma de dosagem convencional representa cerca de 90% das formulações atualmente comercializadas [1]. As razões para a seleção destas soluções devem-se, principalmente, ao facto de apresentarem custos favoráveis e da simplicidade no desenvolvimento e produção da formulação [2]. Apesar da excelente aceitação por parte dos pacientes, um dos principais problemas encontrados é a perda rápida de fármaco na zona précorneal [1]. A ação do medicamento aplicado é condicionada por diversos fatores, de entre os quais se destacam o mecanismo fisiológico protetor, responsável por grandes perdas de fármaco por via lacrimal, e a rápida absorção de fármaco através da conjuntiva. Apenas cerca de 5% do fármaco aplicado penetra na córnea e atinge o tecido ocular, enquanto que o restante é absorvido pela conjuntiva ou entra na corrente sanguínea, podendo causar efeitos secundários indesejáveis [3]. Além da baixa taxa de penetração na córnea, o curto período de permanência origina uma elevada variabilidade na concentração de fármaco nos tecidos intra-oculares e conduz à necessidade de instilações frequentes de soluções altamente concentradas, que poderão conduzir a uma eventual diminuição da taxa de adesão dos doentes aos tratamentos [1, 4]. Devido a estas restrições, as formas de dosagem mais frequentemente utilizadas, soluções e suspensões, estão comprometidas na sua eficácia.

Para melhorar a biodisponibilidade de fármaco no olho, prolongar o seu tempo de residência e reduzir os efeitos colaterais, o desenvolvimento de novos sistemas de libertação de fármacos, para administração oftalmológica, tem sido objeto de investigação. Neste contexto, as lentes de contacto parecem constituir uma abordagem promissora, devido ao tempo prolongado de contacto com o olho. O seu papel pode ser importante no período pós-cirúrgico e na proteção da córnea, durante os processos de crescimento e adesão célular, que conduzem à sua cicatrização. As inserções oculares também podem constituir um importante veículo de libertação prolongada de fármaco, na medida em que estão em permanente contacto com o olho.

Pretende-se, com a realização deste trabalho, desenvolver membranas que possam ser utilizadas como lentes de contacto ou inserções oculares terapêuticas pós-operatórias, que permitam uma concentração de fármaco constante e eficaz no filme lacrimal durante um período de tempo prolongado. Para isso prepararam-se membranas de base quitosano pela técnica de evaporação do solvente.

CAPÍTULO 1

1. Introdução

1.1. Anatomia e fisiologia do olho

De modo a estudar e desenvolver um sistema de libertação de fármaco eficaz, é necessário um bom conhecimento da anatomia e fisiologia do olho (globo ocular). O globo ocular é uma esfera assimétrica com cerca de 25 milímetros de diâmetro, sendo responsável pela captação da luz refletida pelos objetos e por transformar essa perceção em impulsos elétricos, a serem processados e interpretados a nível cerebral [5]. A Figura 1 mostra o olho humano e uma secção transversal do mesmo [6]. Este órgão pode ser dividido em duas partes:

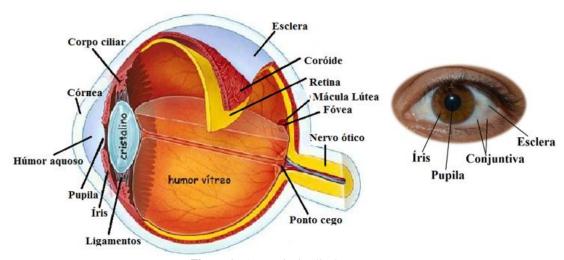


Figura 1 - Anatomia do olho humano [6].

o segmento anterior e o segmento posterior. O segmento anterior inclui a pupila, íris, córnea, corpo ciliar, humor aquoso e cristalino. O segmento posterior envolve dois terços do olho, compreendendo a retina, humor vítreo, mácula, coróide e nervo ótico [7]. A luz que penetra no olho é parcialmente refratada na córnea, passa através do humor aquoso e da pupila, é seguidamente refratada no cristalino, atravessando o humor vítreo e convergindo na retina [8]. Uma outra estrutura associada ao olho é o sistema lacrimal, mostrado na Figura 2 [9]. Este sistema inclui o sistema secretor e o excretor. As lágrimas são produzidas pelo sistema secretor e drenadas pelo sistema excretor. O sistema lacrimal excretor drena a lágrima, produzida na

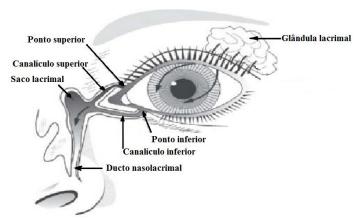


Figura 2 - O sistema lacrimal (adaptado de [9]).

glândula lacrimal, através dos pontos lacrimais superior e inferior, passando pelos canalículos superior e inferior, canalículo comum, saco lacrimal e ducto nasolacrimal, até à cavidade nasal [10]. O sistema permite um fluxo contínuo de modo a evitar a desidratação da córnea e a assegurar a limpeza da superfície ocular.

1.2. Biodisponibilidade de fármaco no olho humano

Os medicamentos usados para tratamento de infeções oculares podem ser administrados por via sistémica, periocular e tópica. Por via sistémica, o acesso dos fármacos ao olho é dificultado por diversas barreiras biológicas, requerendo doses mais elevadas e levando a efeitos secundários. As injeções perioculares são realizadas por baixo da conjuntiva, onde o fármaco administrado atravessa a esclera e passa para o interior do olho por difusão. Esta via é normalmente utilizada para administração de antibióticos e antivirais de infeções graves no segmento anterior do olho [11]. As formas de dosagem administradas por via tópica incluem soluções, emulsões, suspensões, pomadas, géis oftálmicos e inserções oculares [11]. As lentes de contacto também estão incluídas nesta forma de dosagem. Contudo, a sua aplicação destinase apenas à profilaxia de infeções em situações pós-operatórias. A administração por colírios é considerada o método mais popular e bem aceite, devido à sua facilidade de administração, mas tem como desvantagem o facto de que a maior parte do volume instilado é eliminado a partir da área pré-corneal, resultando numa fraca biodisponibilidade. Isto ocorre devido à absorção na conjuntiva, à baixa permeabilidade da córnea, ao lacrimejamento e ao reflexo de piscar [12]. O saco conjuntival tem um volume de aproximadamente 15-30 µL e o volume do filme lacrimal é de 7-8 μL. A taxa de renovação da lágrima é de cerca de 16% por minuto, que corresponde a 15 a 20 movimentos abrir/fechar o olho [13]. Quando uma gota de solução farmacêutica é

instilada, o fármaco mistura-se com o fluido presente no filme lacrimal, tendo um tempo de residência curto, de aproximadamente 2 minutos [14]. O volume de uma gota administrada varia normalmente entre 50 a 100 μL: deste modo, será perdida uma quantidade substancial de fármaco por transbordo [13]. Como resultado de todos estes fatores, menos de 5% do fármaco administrado entra no olho [12]. Para ultrapassar esta situação, muitos fármacos são utilizados em elevadas concentrações, causando efeitos adversos. Além disto, são necessárias instilações frequentes para manter o nível terapêutico de fármaco contínuo [15].

A biodisponibilidade de fármaco no olho também depende das propriedades físicoquímicas do fármaco, nomeadamente a solubilidade, lipofilicidade, tamanho molecular, forma, carga elétrica e grau de ionização. Estas propriedades afetam o percurso do fármaco até ao seu local de ação, bem como a taxa de penetração na córnea. No que diz respeito à permeabilidade da córnea, a lipofilicidade do fármaco é uma propriedade muito importante [16].

1.3. Sistemas de libertação controlada de fármacos

Os sistemas de libertação controlada de fármacos têm sido estudados ao longo do tempo de modo a ultrapassar os problemas dos sistemas convencionais de administração de fármacos. As principais motivações destes sistemas são a possibilidade de administração de um fármaco numa quantidade ótima por um período de tempo desejado, permitindo evitar oscilações da quantidade de fármaco presente no organismo durante o tratamento, assegurando uma maior biodisponibilidade, reduzindo os efeitos secundários possíveis e aumentando o efeito terapêutico desejado. Neste contexto, o termo fármaco engloba todos os compostos bioativos administrados com intuito terapêutico [17].

Nestes sistemas, o fármaco está incorporado ou ligado a uma matriz polimérica, em geral. A matriz polimérica é responsável por contornar as propriedades físico-químicas limitantes do fármaco, melhorando, desta forma, a farmacodinâmica (potencialização do efeito terapêutico), farmacocinética (controlo da absorção e distribuição nos tecidos) e os efeitos toxicológicos (redução da toxicidades local e sistémica) dos mesmos [18].

O desenho de um sistema de libertação controlada implica a consideração de diversos fatores, tais como as propriedades do fármaco, as vias de administração, o mecanismo e o tempo da libertação [19] e as características mecânicas, físicas, químicas e bioquímicas do material utilizado como suporte [20].

Em geral, os sistemas de libertação controlada produzem níveis sanguíneos do fármaco mais constantes que as formas tradicionais de administração, tais como por injeção, por colírios

ou por pomadas. A Figura 3 ilustra as mudanças dos níveis de fármaco no sangue, utilizando diferentes tipos de administração [21]. Como se pode observar, numa única dose, a

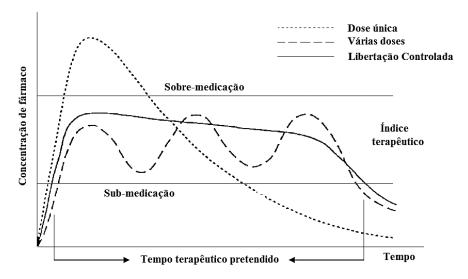


Figura 3 - Variação da concentração de fármaco no sangue em função do tempo, para diferentes tipos de administração do medicamento [21].

concentração de fármaco no sangue aumenta rapidamente e decai exponencialmente assim que o medicamento é metabolizado e/ou eliminado. A Figura 3 também mostra as concentrações acima do qual o fármaco produz efeitos secundários indesejáveis e abaixo do qual o fármaco não é terapeuticamente eficaz. A diferença entre estes dois níveis é conhecido como índice terapêutico. Com uma simples dose administrada, o tempo com que a concentração de fármaco é superior ao nível mínimo eficaz só pode ser prolongado aumentado o tamanho da dose. Contudo, ao fazê-lo, a concentração de fármaco no sangue aumenta para um nível tóxico. Por esta razão, o desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de fármaco, que mantenham constante a concentração de fármaco no sangue, por longos períodos de tempo, sem atingir níveis tóxicos, é de grande interesse [8].

Existem inúmeros estudos de sistemas de libertação ocular de fármacos. Têm sido estudadas formulações com vários polímeros com o intuito de aumentar a viscosidade. Deste modo, o tempo de contacto do fármaco com o olho é maior e a sua taxa de eliminação é menor [22, 24]. Este caso baseia-se no facto de que o aumento do tempo de contacto entre o fármaco e a superfície ocular pode aumentar a biodisponibilidade. Contudo, os estudos indicam que esta abordagem apresenta limitações, pois as formulações são líquidas e capazes de serem eliminadas pelo olho pelos fatores abordados anteriormente [16].

As formas de dosagem coloidais também têm sido alvo de grande interesse por parte dos investigadores. Estes sistemas coloidais consistem em pequenas partículas, como lipossomas, nanopartículas e microemulsões, suspensas numa solução aquosa [16]. Estudos demonstraram que nanopartículas [25, 26] e nanocápsulas [27, 28] são capazes de aumentar a

penetração de fármaco na córnea, reduzindo assim a absorção sistémica. No entanto, uma limitação destes sistemas coloidais é a sua incapacidade de permanecer na superfície do olho por longos períodos de tempo e, por conseguinte, não proporcionar uma libertação prolongada do fármaco.

1.3.1. Lentes de contacto

As lentes de contacto são um dispositivo ótico colocado sobre a córnea do olho. São amplamente utilizadas em oftalmologia para corrigir deficiências visuais ou para fins cosméticos e terapêuticos. As lentes de contacto são polímeros covalentemente reticulados que formam uma rede tridimensional, capaz de reter uma solução aquosa de fármaco. Apesar das lentes de contacto convencionais, constituídas por hidrogéis, apresentarem capacidade para captar certos fármacos, a sua capacidade para assegurar o controlo da libertação é, ainda, algo reduzida. O recurso a lentes de contacto hidrófilas (SCL - *Soft Contact Lenses*), como sistemas de libertação de fármacos, tem merecido especial interesse, devido ao seu elevado grau de conforto, biocompatibilidade e aumento do tempo de contacto do fármaco com o olho, reduzindo o desperdício do medicamento e os efeitos adversos [29].

Tradicionalmente, o carregamento de fármaco baseia-se na imersão da lente de contacto numa solução de fármaco de concentração conhecida, durante algumas horas, de modo a que a lente absorva água que, por sua vez, transporta o fármaco. Este método é designado por absorção ou soaking [12]. Embora esta abordagem seja mais eficiente do que a administração de fármaco por colírios, existem algumas limitações. Em primeiro lugar, a quantidade de fármaco que pode ser incorporado na matriz da lente é limitada pela solubilidade de equilíbrio do fármaco na matriz da lente, sendo pequeno na maioria dos fármacos hidrofóbicos. Em segundo lugar, se o fármaco é incorporado na matriz por absorção, todo ele é libertado em poucas horas [30]. Assim, as lentes de contacto carregadas por este método não conseguem fornecer uma libertação de fármaco lenta e prolongada. Outro método de veiculação do fármaco na lente de contacto é por oclusão, que consiste no aprisionamento da substância ativa no interior do polímero. Para tal, dissolve-se as moléculas de fármaco diretamente na mistura reacional, juntamente com os monómeros, permitindo que o fármaco fique retido no interior da matriz polimérica. Contudo, este método não é muito útil para fármacos hidrofóbicos devido à sua fraca solubilidade na mistura de polimerização que, em geral, contém 2hidroxietilmetacrilato (HEMA). De modo a ultrapassar estas limitações, têm sido estudadas diversas estratégias. A duração da libertação de fármaco pode ser aumentada pela dispersão uniforme, no interior da matriz da lente, de nano ou micropartículas pré-carregadas com fármaco [14]. A libertação do fármaco será mais lenta uma vez que este difunde primeiro através das partículas, penetra a matriz da lente e alcança o filme lacrimal pós-lente, uma fina camada de lágrima situada entre a córnea e a superfície da lente, como mostra a Figura 4.

Diversas outras técnicas têm sido estudadas de modo a criar barreiras à difusão do

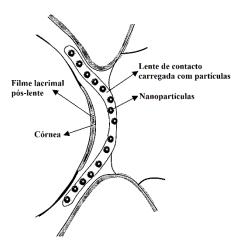


Figura 4 - Esquema de lente de contacto carregada com nanopartículas no olho [30].

fármaco. Uma delas é a modificação/revestimento da superfície das lentes de contacto comerciais. O revestimento com lipossomas [31] ou com polieletrólitos [32] e a modificação da superfície com plasma [33] são alguns dos métodos estudados para retardar a libertação do fármaco. Outra abordagem centra-se na incorporação de vitamina E em lentes de contacto. Estudos revelaram que o carregamento de vitamina E em lentes de contacto proporciona um aumento da duração de libertação de diversos fármacos [34-36].

Outra estratégia de melhoria é a modificação do material da lente, durante o processo de polimerização, pois as propriedades da lente podem influenciar o carregamento/libertação de fármaco. Por exemplo, Santos *et al.* estudaram a copolimerização de HEMA com diferentes monómeros, de modo a controlar as propriedades da libertação de fármaco [37]. Outros investigadores abordaram o uso de impressão molecular durante a formação do hidrogel, permitindo uma maior afinidade deste para com as moléculas de fármaco [38, 39]. Esta técnica consiste na criação de "cavidades" com memória molecular dentro da matriz por polimerização na presença de uma molécula molde.

1.3.2. Inserções oculares

Inserções oculares são dispositivos, na forma de discos finos ou pequenos cilindros, feitos à base de polímeros e colocados no saco conjuntival superior ou inferior e, em alguns casos, colocados diretamente na córnea [40]. A sua longa permanência na área periocular pode

resultar numa maior disponibilidade de fármaco, em relação às formulações líquidas. Estes sistemas podem ser insolúveis, necessitando de ser removidos após um determinado período de tempo ou podem ser projetados para se dissolverem, erodirem ou biodegradarem na superfície ocular. Ocusert[®], foi o primeiro sistema bem sucedido de libertação de pilocarpina para o tratamento do glaucoma e tem sido comercializado desde 1974 [41]. Este dispositivo consiste num reservatório de pilocarpina-alginato entre duas membranas de etileno-acetato de vinilo, sendo capaz de libertar fármaco a uma taxa lenta e constante durante 7 dias.

1.4. Sistemas de libertação controlada de base polimérica

Os polímeros representam uma das classes de materiais mais versáteis disponíveis para aplicações em diversas áreas, inclusive a farmacêutica. Os polímeros para fazerem parte de um sistema de libertação controlada necessitam de preencher alguns requisitos, como serem biocompatíveis e os seus produtos de decomposição não poderem apresentar toxicidade para o organismo. As suas propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas são também um fator importante, uma vez que o corpo humano é maioritariamente constituído por água. Por último, a viabilidade do polímero para uma determinada aplicação depende de uma característica muito importante, a biodegradabilidade [42]. Os sistemas de libertação controlada de base polimérica podem ser classificados de acordo com o mecanismo que controla a libertação de fármaco, destacando-se três categorias como apresenta a Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação dos sistemas de libertação controlada [8].

Tipo de sistema	Mecanismo de taxa de controlo
Difusão controlada	
 Sistemas de reservatório 	 Difusão através da membrana
 Sistemas monolíticos ou matriciais 	 Difusão através da matriz polimérica
Controlados por solvente	
 Sistemas osmóticos 	 Transporte osmótico de água através da membrana semipermeável
 Sistemas controlados por absorção de 	 Absorção de água pela matriz
água (swelling)	polimérica
Quimicamente controlados	
 Sistemas monolíticos 	 Desintegração da matriz por erosão e difusão
Sistemas de cadeia pendente	 Hidrólise/ação enzimática e difusão através da matriz polimérica

Os sistemas de libertação controlados por difusão encontram-se divididos em dois tipos: sistemas de reservatório e sistemas matriciais. Num sistema matricial, o fármaco encontra-se uniformemente disperso ou dissolvido numa matriz polimérica, sendo a taxa de libertação

controlada pela taxa de difusão do fármaco através dessa mesma matriz, como mostra a Figura 6 [8]. Nos sistemas de reservatório, o fármaco está contido num núcleo rodeado por uma camada ou membrana polimérica através da qual se difunde lentamente. A taxa de libertação do fármaco é controlada pelas propriedades do

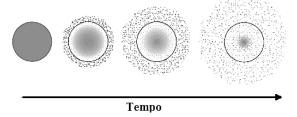


Figura 6 - Sistema de administração de fármaco matricial [44].

polímero (p. ex., composição e massa molecular), pela espessura do revestimento e pelas propriedades físico-químicas do fármaco, tais como a solubilidade, o tamanho da partícula do

fármaco e a massa molecular [43]. O sistema mostrado na Figura 5a ilustra um sistema de reservatório de libertação transdérmica, onde o fármaco é libertado apenas de um dos lados do sistema, enquanto que, a Figura 5b representa um sistema de reservatório para implantes ou administração oral [44].

a)
b)

Figura 5 - Sistema da administração de fármaco do tipo reservatório: a) sistemas transdérmicos e b) sistemas de implante ou orais [44].

Os sistemas de libertação ativados por solvente estão também divididos em dois tipos:

sistemas controlados por pressão osmótica e sistemas controlados pela absorção de água. O sistema de libertação controlada por pressão osmótica baseia-se no fenómeno da osmose, processo de difusão da água que ocorre quando duas soluções de diferentes concentrações de soluto são separadas por uma membrana permeável apenas às moléculas de solvente. Este sistema consiste num reservatório, constituído por uma membrana polimérica semipermeável que permite a passagem das moléculas de água mas impede o movimento das moléculas de fármaco. Esta membrana possui um orifício que permite a passagem de fármaco quando a pressão osmótica aumenta. No interior do reservatório encontra-se o fármaco no estado sólido e uma solução saturada de fármaco. A diferença de concentrações de fármaco no interior e exterior da membrana gera um fluxo de água do exterior para o interior forçando a solução saturada a sair pelo orifício presente na membrana [45].

Nos sistemas controlados pela absorção de água, o fármaco é disperso numa matriz polimérica constituída por um polímero hidrofílico (hidrogel). A entrada de água no hidrogel, controlada pelo grau de hidrofilicidade da matriz polimérica, expande a rede polimérica,

aumentando a mobilidade das cadeias poliméricas, ocorrendo a libertação do fármaco por difusão [42].

Os sistemas de libertação quimicamente controlados incluem todas as formulações poliméricas onde a difusão de fármaco é controlada pela desintegração da matriz polimérica [46]. Nos sistemas monolíticos, o fármaco, inicialmente disperso numa matriz polimérica, é libertado assim que o polímero começa a erodir ou a degradar [47]. Já nos sistemas de cadeia pendente, as moléculas de fármaco estão ligadas covalentemente à cadeia principal do polímero através de ligações facilmente degradáveis. Assim, à medida que o polímero entra em contacto com a água ou outros agentes com capacidade de provocar hidrólise (p. ex., enzimas capazes de catalizar reações de hidrólise), o fármaco é libertado a uma taxa controlada [47].

1.4.1. Polímeros utilizados na preparação das membranas

O polímero principal utilizado na preparação das membranas foi o quitosano, poli(1,4)-2-amino-2-desoxi- β -D-glucose. Este composto é um polissacarídeo formado por unidades de glucosamina unidas por ligações $\beta(1\rightarrow 4)$, sendo produzido por desacetilação da quitina (Figura 7). A quitina, composta por unidades de *N*-acetilglucosamina unidas por ligações $\beta(1\rightarrow 4)$, é um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto dos crustáceos, nas carapaças dos insetos e nas

Figura 7 - Desacetilação da quitina para obtenção de quitosano.

paredes celulares de fungos e outros microrganismos, como leveduras [48,49]. A pequena diferença na estrutura química da quitina e do quitosano tem extrema importância em termos da sua utilidade em sistemas de libertação de fármaco. Tem-se verificado que o quitosano, para além de ser natural e biodegradável, não é tóxico e é biocompatível. Além disto, possui características antimicrobianas e antifúngicas [50]. O mecanismo exato da ação antimicrobiana do quitosano ainda permanece desconhecido, mas o mais aceitável sugere que a presença da carga positiva do grupo amina na sua estrutura interage com a carga negativa das membranas

das células microbianas, conduzindo à rutura da membrana celular e à saída dos componentes intracelulares dos microrganismos [49]. Este polímero é insolúvel em água, mas solúvel em soluções com pH inferior a 6,5, apresentando grande capacidade em formar filmes [51]. As propriedades dos filmes de quitosano podem depender de vários parâmetros tais como, o peso molecular do polímero, o grau de desacetilação e do ácido usado como solvente [52]. Todas estas propriedades tornam o quitosano bastante estudado na indústria farmacêutica e biomédica, dado seu potencial no desenvolvimento de sistemas de libertação de fármaco [7]. Na Tabela 2 são indicadas as várias formas em que o quitosano tem sido investigado na área da oftalmologia.

Tabela 2 - Formas de quitosano	o investigadas em oftalmologia.

Forma de quitosano	Aplicação
Lentes de contacto	Cicatrização de feridas na córnea [53]
Solução	Cicatrização de feridas na córnea [54]
Solução	Olho seco [55]
Solução	Retenção prolongada [56]
Lipossomas revestidos	Melhoria da retenção da córnea [57]
Nanocápsulas revestidas	Retenção prolongada [58]
Microesferas	Melhoria da permeabilidade da córnea [59,60]
Nanopartículas	Retenção prolongada [61,62]

Na preparação das membranas de base quitosano foram ainda utilizados dois polímeros sintéticos: poli(álcool vinílico) (PVA) e poli(vinil butiral) (PVB). As propriedades do PVA (Figura 8) tais como, elevada transparência, hidrofilicidade e o seu carácter hidratante tornamno num potencial polímero para ser usado em lentes de contacto [63]. O PVB (Figura 9) foi utilizado devido às suas propriedades mecânicas, como elevada resistência e tenacidade, e para dar origem a filmes transparentes e ser flexível [64].

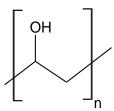


Figura 8 - Estrutura química do PVA.

Figura 9 - Estrutura química do PVB (adaptado de [64]).

1.4.2. Nanopartículas

Embora não exista uma definição única do que é uma nanopartícula, aquela que reúne mais consenso define nanopartículas como sendo partículas em que pelo menos uma das suas dimensões tem um tamanho inferior a 100 nm [65]. No entanto, em áreas como a libertação controlada de fármacos, é comum classificar as nanopartículas como sendo partículas com menos de 1 µm de diâmetro [66]. As nanopartículas têm-se tornado uma importante área de pesquisa, devido à sua capacidade em libertar uma larga gama de medicamentos em diferentes áreas do corpo humano, por períodos de tempo prolongados. O fármaco pode ser dissolvido, encapsulado, adsorvido ou retido na matriz de nanopartículas, dando origem a diferentes terminologias como nanopartículas, nanoesferas ou nanocápsulas, com diferentes propriedades e características de libertação do agente terapêutico. Nanoesferas são sistemas esféricos constituídos por uma matriz maciça no qual o fármaco é uniformemente disperso ou solubilizado, enquanto que nanocápsulas são sistemas vesiculares, em que o fármaco está confinado numa cavidade rodeada por uma membrana polimérica [67].

Formulações de nanopartículas carregadas com fármaco são fáceis de aplicar no olho sendo, mais vantajosas em relação a soluções de gotas para olhos, na medida em que prolongam o tempo de contacto com o olho, reduzindo a frequência de administração. Para uma retenção efetiva no saco conjuntival é essencial produzir nanopartículas com materiais bioadesivos, a fim de não serem tão depressa eliminadas da área pré-corneal como as soluções aquosas [68]. Exemplos de polímeros bioadesivos já utilizados incluem o poli(ácido acrílico) e os polímeros naturais quitosano e alginato de sódio [68]. A importância do tamanho da nanopartícula é um fator importante, uma vez que tamanhos maiores podem causar uma sensação de desconforto no olho.

Os polímeros mais usados para a produção de nanopartículas têm sido o poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) e os seus copolímeros, poli[(ácido lático)-co-(ácido glicólico)] (PLGA), conhecidos pela sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. A taxa de

libertação de fármaco pode ser manipulada pela variação da proporção de PLA, que aumenta a hidrofobicidade e o tempo de degradação da matriz polimérica, enquanto que, o PGA aumenta a hidrofilicidade [66]. No caso de se produzir nanopartículas apenas com polímeros hidrofílicos, é necessário existir algum tipo de reticulação entre as cadeias poliméricas para que as partículas não se dissolvam em contacto com o meio aquoso.

Nanopartículas à base de quitosano têm recebido um crescente interesse como sistemas de libertação controlada de fármacos. O quitosano apresenta propriedades mucoadesivas devido à sua capacidade para criar forças de atração moleculares por interações eletrostáticas com as cargas negativas da mucosa [7]. O caráter mucoadesivo é significantemente maior a pH neutro ou ligeiramente alcalino, como é o caso do filme lacrimal [69]. De Campos *et al.* [62], reportaram as vantagens destes sistemas incluindo a capacidade de contactar com a superfície ocular aumentando assim a libertação nos tecidos oculares sem comprometer a exposição do fármaco a nível sistémico. De Salamanca *et al.* [61] concluíram que as nanopartículas de quitosano penetram facilmente nas células epiteliais da conjuntiva e são bem toleradas na superfície ocular dos coelhos.

A produção de nanopartículas é mais complexa em comparação com as formulações aquosas. Vários métodos de preparação de nanopartículas poliméricas têm sido investigados, tais como precipitação, dessolvatação, emulsificação/difusão do solvente, polimerização em emulsão, gelificação ionotrópica, etc.. A seleção do método de fabrico depende das propriedades do polímero e fármaco utilizados. O tamanho das partículas pode desempenhar um papel importante na estabilidade física e biodisponibilidade do fármaco [68].

1.4.3. Difusão de um fármaco no interior de uma matriz polimérica

A difusão é um processo de transferência de massa de um local para outro no interior de um dado sistema, devido a um gradiente de concentração, ou seja, é o transporte de um componente de uma região onde a sua concentração é elevada para uma região onde a concentração é mais baixa.

Segundo a primeira lei de Fick para a difusão em estado estacionário, proposta em 1855, a massa da substância que passa através de uma secção, por unidade de tempo, é proporcional ao gradiente de concentração na mesma direção. Deste modo, a proporcionalidade entre o fluxo (*J*) e o gradiente de concentração é dada pela Equação (1):

$$J = -D\frac{dC}{dx} \tag{1}$$

sendo *D* o coeficiente de difusão, *J* o fluxo em massa por unidade de área e tempo, *C* a concentração de fármaco e *x* a direção da difusão do fármaco. O sinal negativo nesta expressão indica que a direção da difusão se dá contra o gradiente de concentração, isto é, da concentração mais alta para a concentração mais baixa. Em soluções de fármaco diluídas, o coeficiente de difusão pode admitir-se constante, no entanto, em matrizes poliméricas, este depende não só da concentração do fármaco como de outros parâmetros, como a densidade de reticulação, o grau de ramificação, o grau de cristalinidade e o tamanho das zonas cristalinas [70]. A primeira lei de Fick permite determinar a taxa de difusão em condições em que o perfil de concentração não depende do tempo. Contudo, a maioria das situações práticas envolvendo a difusão ocorrem em condições de estado não-estacionário, também designado de estado transiente, pelo que a primeira lei de Fick deixa de ser válida. Assim, a lei proposta para a transferência de massa em estado transiente é conhecida pela segunda lei de Fick e é representada pela Equação (2):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \tag{2}$$

sendo as condições iniciais e de fronteira:

$$t = 0 \quad -\frac{l}{2} < x < \frac{l}{2} \quad C = C_0$$
$$t > 0 \quad x = \pm \frac{l}{2} \quad C = C_1$$

onde C_0 é a concentração inicial de fármaco presente no sistema, C_1 a concentração de fármaco na superfície do sistema e l a espessura do filme onde o fármaco se encontra imobilizado (como mostra a Figura 10). Assim, integrando a equação (2), a equação de difusão do composto ativo pode ser expressa pela Equação (3):

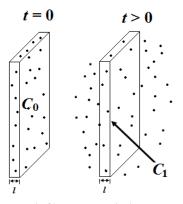


Figura 10 - Esquema representativo da libertação de fármaco a partir de uma matriz polimérica, em que l é a espessura da matriz, C_0 a concentração inicial de fármaco e C_1 a concentração de fármaco à superfície do sistema.

$$\frac{M_{\rm t}}{M_{\infty}} = 4\left(\frac{Dt}{\pi l^2}\right)^{\frac{1}{2}} \tag{3}$$

onde l é a espessura do filme onde o fármaco se encontra imobilizado, $M_{\rm t}$ é definido como sendo a quantidade de fármaco libertado no tempo t e M_{∞} indica a quantidade de fármaco libertado para um tempo infinito. O quociente $M_{\rm t}/M_{\infty}$ representa a fração de fármaco libertado relativamente às condições de equilíbrio. Esta equação é apenas válida até à libertação de 60% do fármaco ($M_{\rm t}/M_{\infty} \leq 0.6$) [71], pois é quando o perfil de libertação é praticamente linear.

A difusão em muitos polímeros nem sempre é descrita de forma adequada pelas leis de Fick, para condições fronteira constantes, pois a absorção do solvente provoca o aumento da espessura do polímero. Alfrey, Gurnee e Lloyd, em 1966, propuseram uma classificação de acordo com as taxas de difusão e de relaxamento polimérico¹. São distinguidos três tipos de difusão [72]:

- Caso I (ou difusão Fickiana) quando a taxa de difusão é mais baixa do que a de relaxamento da matriz polimérica;
- Caso II quando o processo de difusão é mais rápido quando comparado com o processo de relaxamento da matriz polimérica;
- Não-Fickiana (ou difusão anómala) quando as taxas de difusão e de relaxamento são semelhantes.

Nestes casos, pode ser usado um modelo mais genérico, desenvolvido por Korsmeyer e Peppas, representado pela Equação (4):

$$\frac{M_{\rm t}}{M_{\rm m}} = kt^{\rm n} \tag{4}$$

em que, $k=4\left(\frac{D}{\pi l^2}\right)^{1/2}$ e n é o expoente de libertação que, consoante o seu valor, determina os diferentes mecanismos de libertação. Então, para um sistema de geometria linear (p. ex., uma membrana), a difusão é Fickiana para n=0,5. No entanto, quando a taxa de difusão é muito mais baixa que a de relaxamento, é possível obter valores de n abaixo de 0,5. Este comportamento é designado por difusão quase Fickiana. Para valores de n mais elevados, entre 0,5 e 1,0, a difusão é não-Fickiana. Quando n=1, ocorre um transporte do tipo Caso II, sendo

⁻

¹ Entende-se por relaxamento o processo de mudança configuracional do polímero, que quando o solvente penetra na matriz, este passa de um estado configuracional emaranhado para um estado em que as cadeias se dispõem ao acaso [70].

uma libertação de ordem zero, e valores de n superiores a 1 conduzem a um processo de difusão não-Fickiano designado de transporte do tipo Super Caso II. Para determinar o expoente n, apenas devem ser usados os valores de $M_{\rm t}/M_{\infty} \leq 0$,6. A Tabela 3 apresenta a relação entre o valor de n e o respetivo mecanismo de libertação para um sistema matricial plano.

Tabela 3 - Interpretação dos mecanismos de libertação a partir de matrizes poliméricas de geometria planar [73].^a

Expoente de libertação (n)	Mecanismo de transporte	Tempo em função de <i>n</i>
<i>n</i> < 0,5	Difusão Quase Fickiana	
0,5	Difusão Fickiana (Transporte Caso I)	$t^{-0,5}$
0.5 < n < 1	Transporte anómalo (não-Fickiano)	t^{n-1}
1	Transporte Caso II	Ordem zero
n > 1	Transporte Super Caso II	t^{n-1}

^a No caso de sistemas esféricos, o expoente *n* para a difusão Fickiana e para o caso II toma valores de 0,43 e 0,85, respetivamente.

O modelo de Korsmeyer e Peppas é utilizado para descrever a libertação do fármaco tendo em conta a influência da difusão deste e do relaxamento da rede polimérica na libertação do fármaco [74,75]. A difusão Fickiana é caracterizada por uma baixa velocidade de difusão do fármaco para o exterior da matriz em relação à velocidade de relaxamento polimérica, induzido pela absorção de água, pelo que o mecanismo principal que controla a libertação do fármaco é a difusão. A difusão Quase Fickiana acontece quando a taxa de difusão do fármaco é muito mais baixa que a taxa de relaxamento polimérica. Nos processos não-Fickianos, as cadeias não apresentam mobilidade suficiente para permitir uma rápida entrada do solvente para o interior da matriz, e a consequente saída de fármaco, pelo que o relaxamento das cadeias pode ser mais lento que o processo de difusão do fármaco. Os processos de difusão não-Fickiana têm sido classificados em três tipos, distinguindo-se no que diz respeito às velocidades relativas de difusão do fármaco. Para o transporte anómalo, a velocidade de difusão do fármaco e o relaxamento do polímero são da mesma ordem de grandeza; no transporte Caso II a velocidade de difusão do fármaco é maior que o respetivo relaxamento da matriz polimérica, sendo uma cinética de ordem zero, pelo que apresenta uma libertação constante ao longo do tempo; no transporte Super Caso II, ocorre um retardamento no arranque da libertação de fármaco e uma aceleração na parte final da libertação, antes de se atingir o *plateau*.

A determinação do expoente n efetua-se através da representação gráfica de $\log M_t/M_{\infty}$ (até ao valor de 0,6) versus $\log t$ (Figura 11), sendo n dado pelo declive da linha de regressão.

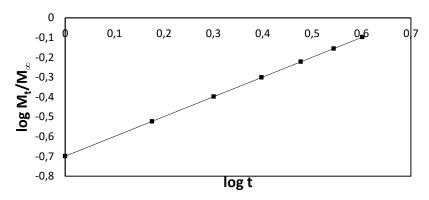


Figura 11 - Representação gráfica do modelo de Korsmeyer-Peppas.

Têm sido extensivamente usados vários outros modelos matemáticos para representar perfis de libertação dos fármacos, pois não só permitem efetuar uma análise quantitativa do processo de libertação como contribuir para a elucidação do próprio mecanismo de libertação. Entre os que são relevantes para o tipo de sistemas preparados neste trabalho, encontram-se os modelos de cinética de ordem zero e de primeira ordem e o modelo de Higuchi. A escolha destes modelos, em detrimento de outros, deve-se à sua melhor descrição da libertação do fármaco a partir de matrizes sólidas [76] e ao facto dos restantes modelos não se aplicarem aos sistemas aqui estudados, uma vez que se referem a sistemas diferentes dos aqui estudados (planares) ou a diferentes mecanismos de controlo da saída do fármaco como, por exemplo, por erosão da matriz.

A dissolução de fármacos a partir de formas farmacêuticas que não sofram degradação e que libertem o fármaco lentamente pode ser representada pela cinética de ordem zero [73], sendo o mesmo mecanismo que o Caso II (n = 1) do modelo de Korsmeyer-Peppas, representado pela da Equação (5):

$$W_0 - W_t = kt \tag{5}$$

onde W_0 é a quantidade inicial de fármaco na forma farmacêutica, W_t é a quantidade de fármaco no instante t e k é a constante de libertação de ordem zero expressa em unidades de concentração/tempo. Dividindo a equação por W_0 e simplificando tem-se:

$$f_{t} = kt \tag{6}$$

sendo $f_t = 1 - (W_t/W_0)$, em que f_t representa a fração de fármaco libertada no tempo t. Representando f_t em função do tempo, se este modelo se aplicar ao sistema de libertação controlada em estudo, obter-se-á uma linha reta (Figura 12). As formas farmacêuticas que seguem este perfil libertam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo,

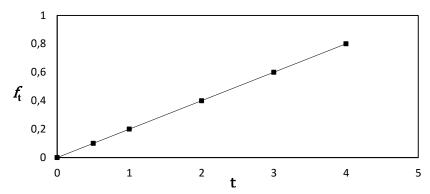


Figura 12 - Representação gráfica do modelo de ordem zero em que as curvas obtidas são do tipo f(t) = a + bt.

constituindo-se como uma das melhores formas de veicular fármacos para libertação prolongada.

A cinética de primeira ordem descreve a libertação de fármaco a partir de sistemas onde a taxa de libertação depende da concentração de fármaco e é descrita pela Equação (7):

$$logC_{t} = logC_{0} + \frac{kt}{2.303} \tag{7}$$

onde C_t é a quantidade de fármaco libertado no instante t, C_0 é a quantidade inicial de fármaco na solução e k é a constante de libertação de primeira ordem. Deste modo, um gráfico do logaritmo decimal da quantidade libertada em função do tempo será linear (Figura 13). Um exemplo das formas farmacêuticas que seguem este perfil são aquelas que contêm fármacos hidrofílicos em matrizes porosas.

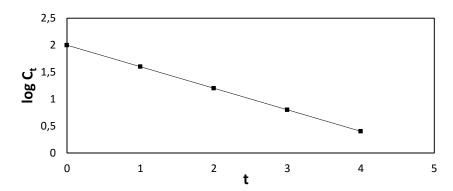


Figura 13 - Representação gráfica do modelo de primeira ordem com um declive de -k/2,303.

Higuchi desenvolveu teoricamente vários modelos para a libertação de fármacos solúveis ou pouco solúveis incorporados em matrizes semi-sólidas e/ou sólidas. Este modelo é

baseado na hipótese de que as matrizes não sofrem alterações estruturais significativas na presença de água. De um modo geral, é possível resumir o modelo de Higuchi na expressão (8):

$$f_{\rm t} = K_{\rm H} t^{1/2} \tag{8}$$

em que, f_t é a quantidade de fármaco dissolvida no tempo t e K_H é a constante de dissolução de Higuchi. A equação descreve a libertação de fármaco como um processo de difusão baseado na primeira lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo (Figura 14).

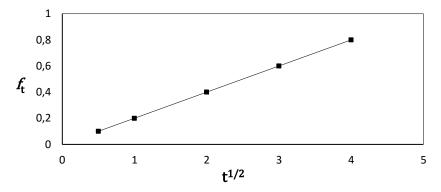


Figura 14 - Representação gráfica do modelo de Higuchi em que as curvas obtidas são do tipo f(t)= a + bt^{0,5}.

Um dos critérios possíveis para escolher o modelo que se ajusta melhor ao processo de libertação do fármaco faz uso do coeficiente de correlação, R², da regressão linear de cada modelo, tendo sido este o que se usou neste trabalho. Assim, a escolha do melhor modelo referese aquele que apresenta um valor de R² mais elevado [76]. Existem outros métodos para escolher o melhor modelo, como o critério de informação de Akaike (AIC) e o critério de informação bayesiano (BIC) [77].

1.5. Preparação das membranas

A preparação das membranas pode ser efetuada por diversos métodos. Neste trabalho, procedeu-se ao método da evaporação do solvente. Este método baseia-se na dissolução de um polímero num solvente, no espalhamento dessa solução sobre a superfície sólida (que funciona como suporte), e na evaporação do solvente à temperatura ambiente ou a uma temperatura mais elevada, resultando na formação de um filme sobre a superfície sólida.

1.5.1. Fármacos utilizados

O fármaco 21-fosfato dissódico de dexametasona é um corticoide sintético, utilizado em oftalmologia, causando a inibição da resposta inflamatória de infeções oculares e suprimindo a reação ao enxerto após transplantes de córnea. Na sua forma pura é um pó cristalino branco, inodoro e solúvel em água. É um produto químico estável à temperatura ambiente, com a fórmula molecular $C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$, o que lhe confere um peso molecular de 516,40 g/mol. A estrutura química deste fármaco está apresentada na Figura 15.

Figura 15 - Estrutura química do fármaco 21-fosfato dissódico de dexametasona [78].

O fármaco dexametasona de fórmula molecular C₂₂H₂₉FO₅ e peso molecular de 392,46 g/mol, é pouco solúvel em água e apresenta a mesma ação terapêutica que 21-fosfato dissódico de dexametasona. A Figura 16 representa a estrutura química da dexametasona.

Figura 16 - Estrutura química do fármaco dexametasona [79].

Estas duas formas de fármaco são capazes de difundir através das membranas celulares e formar complexos com recetores de corticóides citoplasmáticos específicos. Estes complexos penetram no núcleo da célula, onde se ligam ao DNA estimulando a transcrição de RNA-mensageiros, responsáveis pela síntese de enzimas e outras proteínas específicas que irão alterar a função da célula [80]. A utilização destes fármacos como agentes terapêuticos baseia-se na

capacidade de interferir com a inflamação ou suprimir a resposta imunitária. Como antiinflamatório, inibe a acumulação de células inflamatórias, como macrófagos e leucócitos, na zona de inflamação. Inibe, ainda, a fagocitose, a libertação enzimática e a síntese ou libertação de alguns mediadores químicos da inflamação. Como imunossupressor, reduz a concentração de células do sistema imunitário, tais como linfócitos T, monócitos e eosinófilos. Na sua presença, ocorre também uma diminuição da interação entre imunoglobulinas e os seus recetores celulares, e inibição da síntese ou libertação de interleucinas, responsáveis pela ativação dos linfócitos. Deste modo, há uma redução da resposta imunitária primária [81].

1.5.2. Mecanismos

Nesta secção são apresentados os mecanismos que ocorrem durante a síntese das membranas abordadas neste trabalho.

Uma das reações que pode ocorrer é a reticulação do quitosano com o glioxal. A unidade estrutural do quitosano apresenta dois grupos hidroxilo e um grupo amina, já a molécula de glioxal tem dois grupos carbonilo. Podem existir duas possibilidades de reticulação, o glioxal reage com o grupo amina (Figura 17a)) ou reage com o grupo hidroxilo (Figura 17b)).

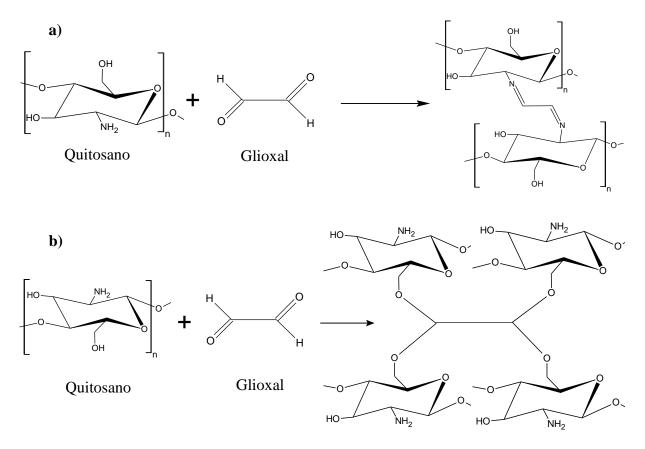


Figura 17 - Mecanismo de reticulação do quitosano. a) glioxal reage com os grupos amina do quitosano b) glioxal reage com os grupos hidroxilo do quitosano (adaptado de [82]).

Se o agente de reticulação for o glutaraldeído, então a reação de reticulação ocorre através dos grupos amina do quitosano e é dada pelo mecanismo apresentado na Figura 18.

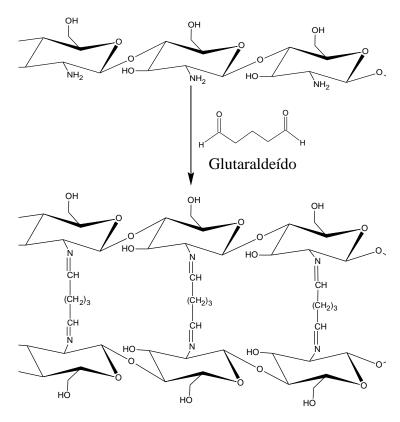


Figura 18 - Reação de reticulação do quitosano com glutaraldeído (adaptado de [83]).

O poli(álcool vinílico) também pode reagir com o glioxal, onde grupos hidroxilo do PVA reagem com os grupos carbonilo, formando ligações acetal como apresentado na Figura 19.

Figura 19 - Reação de reticulação entre PVA e glioxal (adaptado de [84]).

Caso se utilize o glutaraldeído, este pode reticular o PVA, como mostra o mecanismo da Figura 20.

Figura 20 - Reação de reticulação do PVA com glutaraldeído (adaptado de [84]).

Finalmente, preparou-se uma membrana em que se utilizou quitosano modificado com ácido láctico, por tratamento com uma carbodiimida (Figura 21). A reação inicia-se com a ativação do grupo carboxílico do ácido lático. A carbodiimida liga-se ao grupo carboxílico formando um composto intermediário designado de *O*-acilisoureia. A acilisoureia reage então com as aminas livres do quitosano, formando-se um grupo amida. O quitosano modificado apresenta assim mais um grupo hidroxilo que confere hidrofilicidade ao sistema.

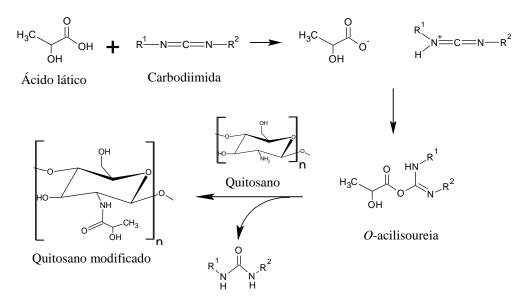


Figura 21 - Reação de ativação dos grupos carboxílicos do ácido lático através da carbodiimida, na presença de quitosano [85].

1.6. Técnicas

1.6.1. Espetrofotometria

A espetrofotometria é uma técnica analítica que utiliza a radiação luminosa para determinar a concentração de espécies químicas. O seu princípio de funcionamento baseia-se na absorção de luz por moléculas dispersas em solução. A espetrofotometria é fundamentada na lei de Beer-Lambert que estabelece a proporcionalidade entre a absorvância (*A*) de um composto a em determinado comprimento de onda e a sua concentração (*C*), através da Expressão 9:

$$A = \log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon I C \tag{9}$$

onde I_0 é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra, I é a intensidade da radiação que emerge da amostra e l é a distância percorrida pelo feixe através da amostra. A absortividade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente.

1.6.2. Refratometria

O desvio que a luz sofre quando passa de um meio para o outro é designada de refração, e depende da velocidade da luz nesses dois meios. A grandeza física que relaciona a velocidade nesses meios é o índice de refração (IR) relativo $(n_{B,A})$, onde A e B são o 1.º e 2.º meio, sendo definido como a razão entre a velocidade da luz no primeiro meio (v_A) e a velocidade da luz no segundo meio (v_B) , como demonstra a Equação 10:

$$n_{\rm B,A} = \frac{v_{\rm A}}{v_{\rm B}} \tag{10}$$

O índice de refração é um parâmetro importante no desenvolvimento da lente de contacto, pois determina a sua espessura, pelo que é necessário conhecê-lo [86]. O conteúdo de água na lente influência diretamente o índice de refração, uma vez que, quanto maior o conteúdo de água da lente, mais próximo do índice de refração da água será o índice de refração da lente. Se o índice de refração for muito próximo ao da água, quer dizer que a quantidade de água na lente é maior do que num IR superior a este e, consequentemente, mais espessa é a lente. No

entanto, existe uma dependência do aumento do conteúdo de água maximizar a permeabilidade do oxigénio [87]. Para lentes de contacto com o mesmo número de dioptrias, quanto maior o índice de refração da lente mais fina esta poderá ser; contudo, se apresentar pouca água o seu uso torna-se desconfortável e maior será a dificuldade do oxigénio difundir. Portanto, tem de haver um compromisso entre o índice de refração e o conteúdo de água na lente.

1.6.3. Goniometria de ângulos de contacto

A determinação do ângulo de contacto de uma gota de água sobre a superfície de um material permite saber qual o grau de hidrofilicidade/hidrofobocidade do sistema. Para o caso da determinação de ângulos de contacto pelo método da gota séssil, quando um líquido entra em contacto com a superfície de um sólido forma-se uma interface tripla entre o sólido, o líquido e o vapor, cuja posição de equilíbrio depende das forças associadas às três tensões interfaciais. O ângulo de contacto (θ) é o ângulo formado entre a superfície do sólido e a tangente que passa pelo ponto no qual se encontram as 3 fases em interação (sólida, líquida e gasosa), como demonstra a Figura 22.

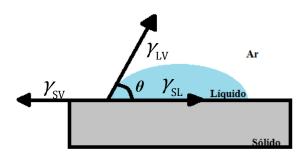


Figura 22 - Ângulo de contacto entre a gota de líquido e uma superfície sólida, para o método da gota séssil.

No caso da determinação de ângulos de contacto pelo método da bolha cativa, em vez de colocar uma gota sobre o sólido, é injetada uma bolha de ar sob a superfície imersa num meio líquido. Neste caso, o ângulo também é formado entre a superfície do sólido e a tangente que passa pelo ponto onde se encontram as 3 fases em interação (Figura 23).

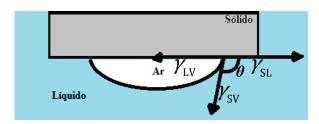


Figura 23 - Ângulo de contacto formado entre a superfície sólida e bolha de ar, para o método da bolha cativa.

A equação que descreve o equilíbrio das forças que atuam em cada ponto da linha tripla onde, se encontram em simultâneo a fase sólida, líquida e vapor, é descrita pela equação de Young (Equação 11),

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta \tag{11}$$

onde γ_{SV} , γ_{SL} e γ_{LV} correspondem às tensões superficiais das interfaces sólido-vapor, sólido-líquido e líquido-vapor, respetivamente.

Diferentes critérios têm sido propostos para definir o valor do ângulo de contacto de uma gota de água que separa uma superfície hidrofílica de uma hidrofóbica. De acordo com o critério mais aceite, proposto por Erwin Vogler e designado por "Limite de Berg" [88], a transição de um caráter hidrofóbico para um caráter hidrofílico ocorre para um valor de 65°, para o ângulo de contacto de uma gota de água colocada sobre a superfície. As superfícies que exibem ângulos de contacto superiores a 65° são consideradas hidrofóbicas, enquanto que as superfícies com ângulos de contacto inferiores a 65° são consideradas hidrofílicas. Assim, o ângulo de contacto permite determinar a hidrofilicidade da superfície das membranas. Os ângulos de contacto para lentes de contacto hidrófilas disponíveis no mercado, com diferentes conteúdos de água, encontram-se sumariados na Tabela 4. O ângulo de contacto varia entre 45 e 109°, consoante o tipo de material da lente. Para inserções oculares apenas foram encontrados ângulos de contacto entre 38,5 e 42° [89], produzidas à base de poli(álcool vinílico) e carboximetilcelulose de sódio.

Tabela 4 - Medidas dos ângulos de contacto da água de lentes de contacto hidrófilas comerciais com diferentes conteúdos de água, obtidos através do método *sessile drop*.

Nome comercial	USAN ¹	Conteúdo de	Ângulo de contacto, H2O	
Nome comercial	USAIN	água (%) ²	(°)	
Bausch&Comb	Hilafilcon B	59	70	[90]
Serevue [®]	Etafilcon A	58	45	[91]
Acuvue® Advance™	Galyfilcon	47	94	[92]
PureVision®	Balafilcon A	36	109	[92]
Focus® Night&Day	Lotrafilcon A	24	60	[92]
O_2Optix^{TM}	Lotrafilcon B	33	68	[92]

¹ United States Adopted Name

² % de água no sistema inchado, calculada em relação ao peso da lente hidratada no equilíbrio.

1.6.4. Transmitância

A transmitância (T) da amostra está relacionada com a intensidade da luz inicial (I_0) , antes de passar pela amostra e a intensidade da luz após passar a amostra (I). A transmitância é dada em percentagem pela Equação 12:

$$T(\%) = \frac{I}{I_0} \times 100 \tag{12}$$

Os valores de transmitância aceitáveis para lentes de contacto hidrófilas hidratadas, no espetro visível, são superiores a 83% [92], sendo que a maioria das lentes de contacto apresentam transmitâncias superiores as 90% [93]. Já para inserções oculares esta propriedade não é relevante, dado que estes dispositivos não interferem com a visão. A transmitância permite averiguar se as membranas são ou não transparentes à luz visível de modo a preencher um dos requisitos fundamentais para a sua utilização como lentes de contacto.

1.6.5. Análise termomecânica dinâmica (DMTA)

Esta técnica consiste na aplicação de uma força periódica sinusoidal a uma determinada amostra, durante um intervalo de temperaturas, permitindo verificar o seu comportamento. O módulo de Young ou módulo de elasticidade ($E(\omega)$) é uma propriedade intrínseca dos materiais que relaciona a deformação aplicada com a resposta a essa deformação e é dado pela Equação 13:

$$E(\omega) = \frac{\sigma}{\varepsilon} \tag{13}$$

onde σ representa a tensão aplicada ao material e ε a deformação do material. A temperatura de transição vítrea (T_g) é determinada como sendo o pico em tan δ (Equação 14):

$$\tan \delta = \frac{E''}{E'} \tag{14}$$

onde E'' revela a tendência para o material dissipar energia (comportamento viscoso), designando-se de módulo de perda e E' caracteriza a tendência para o polímero com

comportamento viscoelástico armazenar energia , designando-se de módulo de armazenamento. Quando o polímero atravessa a zona de transição vítrea, o módulo de armazenamento diminui, enquanto a tan δ atinge o seu máximo, permitindo determinar a temperatura de transição vítrea. A análise DMTA é muito utilizada para determinar a temperatura de transição vítrea de certos materiais e fornece informações sobre o seu comportamento viscoelástico. Para lentes de contacto hidrófilas secas, os valores típicos de $T_{\rm g}$ são superiores a 100 °C, por exemplo, para lentes de pHEMA, Hilafilcon A e Balafilcon B, as temperaturas de transição vítrea são 116 °C, 143 °C e 124 °C, respetivamente [94]. Para inserções oculares, não foram encontrados valores de $T_{\rm g}$'s na literatura.

CAPÍTULO 2

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Os reagentes utilizados para a preparação das membranas, utilizadas como sistema de libertação controlada de fármaco, foram os seguintes: ácido lático (90%) fornecido pela *Acros Organics*, Bélgica; quitosano de peso molecular médio, adquirido à *Fluka*, Alemanha; Nciclohexil-N'-(2-morfolinoetil)-carbodiimida meto-*p*-toluenossulfonato (CMC; \geq 97%), adquirido à *Fluka*, Alemanha; glioxal (40%), da *BASF*, Alemanha; glutaraldeído (25%), da *Fluka*, Alemanha; poli(álcool vinílico) (PVA; 98%), fornecido pela *Sigma Aldrich*, Alemanha e o poli(vinil butiral) (PVB), adquirido à *Kuraray*, Alemanha.

Para a preparação das micropartículas de silicone foram utilizados os seguintes reagentes: Brij 35 (éter laurílico de poli(etileno glicol), proveniente da *Acros Organics*, Bélgica; trimetoxi(octadecil)silano (OTMS) (90%), dodecano (99%) e ácido clorídrico (HCl) (37%), foram adquiridos à *Sigma Aldrich*, Alemanha.

Os reagentes utilizados na síntese das nanopartículas de quitosano/poli(ácido acrílico) (CS/PAA) foram o quitosano já referido, o ácido acrílico (AA; 99%), da *Sigma Aldrich*, Alemanha e o iniciador persulfato de potássio (K₂S₂O₈), obtido da *Fluka*, Alemanha.

O meio de libertação foi preparado com cloreto de cálcio desidratado (CaCl₂) (\geq 97%), obtido da *Fluka*, Alemanha; bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (\geq 99,5%), da *Fisher Scientific*, Inglaterra; cloreto de potássio (KCl) (\geq 99,5%), proveniente da *Merck*, Alemanha e cloreto de sódio (NaCl) (\geq 99%), da *Sigma Aldrich*, Alemanha.

As substâncias ativas utilizadas no estudo do sistema de libertação controlada foram os fármacos 21-fosfato dissódico de dexametasona (98%) e dexametasona (98%), adquiridos à *Alfa Aesar*, Alemanha.

2.2. Preparação do sistema de libertação de fármaco

2.2.1. Método de impregnação de fármaco

No decorrer deste trabalho foram utilizados dois métodos de impregnação do fármaco: por oclusão e por imersão numa solução de fármaco (soaking). Na impregnação de fármaco por oclusão, colocou-se 20 mg de fosfato dissódico de dexametasona em 20 mL da solução de polímero usada para preparar a membrana. Na impregnação de fármaco por soaking, colocaram-se três pedaços de membrana em cada poço de uma placa multiwell, que continham 3 mL de uma solução de fosfato dissódico de dexametasona a 5 mg/mL de dexametasona, de modo a ficarem submersos, durante 48 horas e à temperatura ambiente.

2.2.2. Preparação de membranas de base quitosano com e sem PVA

O sistema de libertação de fármaco foi preparado sob a forma de membranas. Estas foram preparadas por evaporação do solvente a partir de uma solução com o polímero, que forma a membrana, e com o fosfato dissódico de dexametasona. Esta solução foi colocada num suporte sólido e o solvente foi deixado evaporar à temperatura ambiente ou a temperatura mais elevada, formando um filme. Numa primeira abordagem, foram preparadas membranas com diferentes composições e concentrações de modo a selecionar a membrana com melhores características. A Tabela 5 apresenta as composições dos vários tipos de membranas preparadas.

Tabela 5 - Composição das membranas de base quitosano.

		Membrana													
Composição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Quitosano em															
1% de ácido	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
lático (%; m/v)															
Glioxal			1	0,1	0,01				0,01	0,02	0,03	0,05	0,05	0,05	
(%; v/v)			1	0,1	0,01				0,01	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	
PVA		1			1		1	2	2	2	2	2	2	2	2
(%; m/v)		1			1		1	2	2	2	2	2	2	2	
CMC													0,5		
(%; m/v)													0,5		
														1 gota	
PVB														em 10	
(1% em etanol)														mL de	
														sol.	
Glutaraldeído															0,05
(%; v/v)															0,03

Como a espessura dos filmes obtidos depende da concentração de quitosano na solução, do diâmetro da caixa de Petri e do volume total da solução, foram testados diferentes volumes e diferentes diâmetros de modo a obter uma espessura aceitável. Portanto, o procedimento que se passa a descrever apenas se refere ao volume e diâmetro da caixa de Petri otimizados. Assim dissolveu-se quitosano em 20 mL de uma solução de 1% de ácido lático, sob agitação magnética. Uma vez dissolvido, adicionou-se à solução os restantes reagentes, sendo que o último reagente adicionado foi sempre o agente reticulante (glioxal ou glutaraldeído). A mistura foi colocada numa caixa de Petri de vidro com 7 cm de diâmetro e foi deixada a evaporar a 40 °C. Depois de evaporado o solvente, retirou-se a membrana da caixa de Petri com o auxílio de uma pinça ou, nos casos em que a remoção era difícil, transferiu-se a caixa para uma atmosfera húmida, de modo a que a membrana seja hidratada e se torne mais maleável. Em seguida, cortaram-se pedaços de membrana, com cerca de 2 cm de comprimento e 1 cm de largura, que foram colocados numa estufa de vácuo à temperatura ambiente até ficarem totalmente secos, registando-se a sua massa seca.

2.3. Preparação de micropartículas de silicone

A preparação de micropartículas de silicone foi baseada no método relatado por Gulsen e Chauhan [30], um método de emulsão do tipo óleo em água (O/W), em que se obtém uma microemulsão como um sistema termodinamicamente estável de dois líquidos imiscíveis (óleo e água), estabilizados por um tensioativo. Esta técnica é vantajosa para a encapsulação de fármaco hidrofóbicos devido à grande solubilidade destes na fase orgânica.

2.3.1. Procedimento

Preparou-se uma solução de 1g de Brij35 em 10 g de água destilada. Esta solução foi aquecida até 60 °C e agitada a 1000 rpm, numa placa de aquecimento com controlo de temperatura. Preparou-se uma segunda solução de 0,10 mL de OTMS em 0,15 mL de dodecano. Seguidamente, esta solução foi adicionada à mistura anterior, mantendo a temperatura e agitação, até que a mistura clareasse. Por último, 10mL de uma solução de HCl (1 M) foram adicionados à microemulsão, mantendo a temperatura a 60 °C por 6 horas, com agitação contínua. A adição de ácido clorídrico causa a hidrólise e condensação do OTMS, de modo a formar a cápsula do tipo silicone em torno das partículas.

No caso da preparação de partículas com fármaco por incorporação, o procedimento é igual com a exceção da composição da segunda solução, que contém 10 mg de dexametasona dissolvida na mistura de 0,10 mL de OTMS com 0,15 mL de dodecano.

2.3.2. Síntese das membranas carregadas com partículas de silicone

Obtiveram-se duas microemulsões de micropartículas de silicone, com e sem fármaco, sendo a microemulsão sem fármaco usada como branco no estudo da libertação de fármaco. Para isso, dissolveram-se 400 mg de quitosano em 20 mL de ácido lático a 1%. Seguidamente, adicionou-se à solução 400 mg de PVA. Após dissolvido, juntou-se a esta solução 5 mL da m Quitosano , por último, adicionou-se 100 µL de glioxal a 10%. A mistura foi vertida para uma caixa de Petri de 7 cm de diâmetro e colocada a evaporar numa estufa a 40 °C.

2.4. Preparação de nanopartículas de quitosano/poli(ácido acrílico)

Para a preparação destas partículas adotou-se o procedimento dos autores Hu *et al.* [95], com algumas alterações. As nanopartículas foram obtidas pela polimerização do ácido acrílico numa solução de quitosano, iniciada pelo persulfato de potássio (K₂S₂O₈). Quando a polimerização atinge um determinado nível, ocorrem interações iónicas entre os grupos carboxilo do poli(ácido acrílico), carregados negativamente, e os grupos amina do quitosano, carregados positivamente, formando-se o complexo quitosano/poli(ácido acrílico). O mecanismo de preparação das nanopartículas de quitosano/poli(ácido acrílico encontra-se na Figura 24.

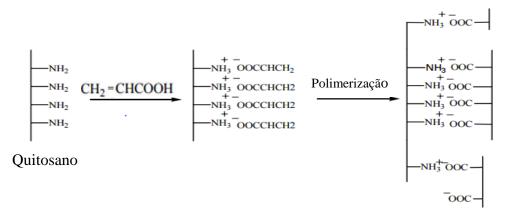


Figura 24 - Mecanismo de formação das nanopartículas de quitosano poli(ácido acrílico).

2.4.1. Procedimento

O quitosano foi dissolvido em 50 mL de uma solução de ácido acrílico (AA) na proporção 1:1 ([unidades de quitosano]:[AA]) com agitação magnética. A quantidade de ácido acrílico foi mantida constante a 3 mmol. Depois de dissolvido o quitosano, adicionou-se 27 mg de $K_2S_2O_8$ à solução, com agitação contínua, até esta ficar clareada. O pH do sistema foi mantido a 4 e a polimerização ocorreu a 70 °C com agitação a 900 rpm, durante 5 horas.

Posteriormente, as nanopartículas foram separadas da fase aquosa por ultracentrifugação (Optima XE-100, *Beckam Coulter*, EUA, rotor SW28, tubos 344058) com força centrífuga relativa de 141000 g, a 4 °C, durante 1 hora, com aceleração e desaceleração controladas (níveis 7 e 6, respetivamente). Após este tempo, o tubo continha o sobrenadante e o sedimento. Contudo, o sobrenadante apresentava duas fases distintas, uma mais clara e outra mais escura, por isso, centrifugou-se novamente por mais 1h30m mas não se conseguiu obter mais sedimentação. Seguidamente, o sedimento obtido foi liofilizado no liofilizador 2040 (*Snijders Scientific*, Holanda) para obter as partículas secas.

A incorporação de fármaco nas nanopartículas foi realizada dissolvendo 25 mg de dexametasona em 50 mL da solução de nanopartículas, obtidas pela polimerização do ácido acrílico com o quitosano, e a solução foi incubada por mais 48 horas. As partículas carregadas com fármaco foram então sujeitas aos mesmos processos descritos anteriormente (centrifugação e liofilização) de modo a isolar e secar as partículas.

2.4.2. Síntese das membranas carregadas com nanopartículas de CS/PAA

Foram preparadas dois tipos de membranas com nanopartículas: membranas contendo nanopartículas com fármaco e membranas contendo nanopartículas sem fármaco (utilizada como branco). Para isso, preparou-se uma suspensão de 1,86 mg de partículas secas em 15 mL de ácido lático a 1%. A seguir, dissolveram-se 300 mg de quitosano na suspensão anterior, adicionou-se 300 mg de PVA e, por fim, 75 μL de glioxal (10%). A mistura foi colocada numa caixa de Petri de 5 cm de diâmetro e evaporada numa estufa a 40 °C.

Além do sistema descrito, que contém fármaco apenas no interior das partículas, também foi preparado um sistema que continha o fármaco no interior das partículas e na própria membrana. Para isso, depois de preparada a membrana contendo nanopartículas com fármaco,

a membrana foi imersa numa solução de 5 mg/mL de fosfato dissódico de dexametasona durante 48 horas, à temperatura ambiente

2.5. Avaliação da degradação térmica do fármaco

Coma na síntese das nanopartículas de silicone o fármaco é adicionado à mistura reacional e é sujeito a temperaturas de 60 °C, durante 6 horas, é necessário verificar se o fármaco resiste a estas condições. Para tal, foi preparada uma solução de dexametasona de concentração 30 µg/mL e colocada na estufa a 60 °C, durante 6 horas. Foram retiradas amostras antes e depois deste período e obtidos os espetros de absorção, para verificar se existiu alteração das absorvâncias após o tratamento térmico.

Também foi necessário estudar a estabilidade do fármaco durante o processo de evaporação. Para isso, foi preparada uma solução de 21-fosfato dissódico de dexametasona, de concentração 30 μg/mL e foi colocada numa estufa a 40 °C durante 24 horas, tendo sido retiradas amostras neste intervalo de tempo e procedido à leitura das absorvâncias.

2.6. Preparação do meio de libertação

O meio de libertação utilizado foi uma solução de sais que pretende simular o conteúdo de sais da lágrima. Esta solução de lágrimas artificiais tem um pH de 7,4 e foi preparada de acordo com as quantidades apresentadas na Tabela 6 [96].

Tabela 6 - Composição da solução de lágrimas artificiais [96].

Sal	Concentração (g/L)		
NaCl	6,7		
KCl	1,0		
$CaCl_2$	0,08		
NaHCO ₃	2,0		

2.7. Processo de libertação

A necessidade de simular o ambiente ocular implica que o meio onde está a ser libertado o fármaco esteja à temperatura média do corpo humano (37 °C). Para isso, utilizou-se a incubadora RO 500 (*Thermoshake Gerhardt*, Alemanha), que permite manter a temperatura desejada. Esta incubadora permitia também uma agitação permanente a 100 rpm.

O processo de libertação foi realizado em triplicado para cada um dos sistemas de libertação. Cada amostra foi imersa em 20 mL da solução de lágrimas artificiais, em tubos de Falcon de 50 mL e colocada na incubadora. A tempos pré-determinados, foram retiradas alíquotas de 2 mL do meio de libertação, de cada um dos tubos e foram repostos 2 mL de solução de lágrimas artificiais em cada tubo, para manter constante o volume do meio de libertação do fármaco. Os tempos de tiragem das alíquotas foram:

- De 15 em 15 minutos, durante 30 minutos;
- De 30 em 30 minutos, durante 1 hora e 30 minutos;
- De 60 em 60 minutos durante 6 horas;
- De 24 em 24 horas até ao fim da libertação.

Os perfis de libertação representam a massa acumulada de fármaco por massa seca de amostra em função do tempo.

2.7.1. Método da quantificação de fármaco

A quantidade de fármaco que é libertada pela matriz polimérica com o decorrer do tempo pode ser avaliada através da medição da absorvância das alíquotas recolhidas, utilizando um espetrofotómetro de ultravioleta/visível (UV/Vis). As medições foram realizadas no espetrofotómetro UV/Vis V-530 (*Jasco*, EUA) utilizando células de quartzo de 10 mm de espessura provenientes da *Labbox*, Espanha. Durante a medição da absorvância das amostras com as partículas de silicone, observou-se que a absorvância não estabilizou, indicando que as partículas de silicone permaneciam na alíquota. Por isso, no momento de retirar as alíquotas estas foram filtradas antes de serem guardadas nos tubos de Eppendorf.

Determinação do comprimento de onda máximo

A primeira etapa antes de iniciar o estudo da cinética de libertação consiste em obter os espetros de absorvância dos dois fármacos utilizados, de forma a determinar o comprimento de

onda para o qual a absorvância é máxima, designado por comprimento de onda máximo (λ_{max}). Para tal, preparou-se uma solução de 50 µg/mL de fármaco em solução de lágrimas artificiais, que foi colocada numa cuvete no espetrofotómetro. Através de um computador conectado ao aparelho foi possível registar as absorvâncias numa gama de comprimentos de onda entre 200 e 600 nm.

Curvas de Calibração

De modo a poder converter os valores da absorvância em valores de concentração de fármaco foi necessário recorrer a uma curva de calibração, também designada de curva padrão, que demonstra a relação linear entre estes dois parâmetros. Para a elaboração da curva, prepararam-se várias soluções de fármaco em solução de lágrimas artificiais, de concentrações conhecidas e procedeu-se à leitura das suas absorvâncias, no comprimento de onda máximo de 242 nm.

Partindo de uma solução *stock*, de concentração 50 μg/mL, realizaram-se diluições sucessivas de modo a obter as soluções de concentração desejada. Na Tabela A.1 (Anexo A) são apresentadas concentrações das soluções utilizadas na obtenção das curvas de calibração para os dois fármacos, assim como as respetivas absorvâncias.

Para além das amostras carregadas com fármaco, são também medidas absorvâncias de amostras sem fármaco incorporado (branco) de modo a se poder corrigir a absorvância medida descontando a absorvância de alguma substância que possa sair da matriz polimérica e absorver a 242 nm. Assim, a absorvância corrigida será a diferença entre a absorvância do meio de libertação da amostra carregada com fármaco e a absorvância do meio de libertação do branco. Fazendo uso da proporcionalidade existente entre a absorvância e a concentração (Equação 9) e usando uma reta de equação do tipo y = mx + b, é possível converter as absorvâncias corrigidas (y) em concentrações de fármaco libertado (x), em $\mu g/mL$.

2.8. Caracterização

2.8.1. Capacidade de absorção de água (swelling)

A capacidade de absorção de água é a capacidade que um polímero tem de absorver água sem que se dissolva nesta. As amostras de membranas foram secas e pesadas, tendo-se

registado o seu valor denominado de massa seca (W_0). Seguidamente, cada amostra foi imersa numa solução de lágrimas artificiais à temperatura ambiente. Em períodos definidos, as amostras foram retiradas da solução e o excesso de água na superfície foi removido com papel de filtro humedecido. Procedeu-se então à sua pesagem (W_t) e voltou-se a colocar as amostras na solução. Este procedimento foi repetido diversas vezes até atingir o equilíbrio, isto é, quando a massa das membranas é constante ao longo do tempo. A capacidade de inchaço (SC) para cada tempo de imersão foi calculada através da Equação 10:

$$SC = \frac{W_{\rm t} - W_0}{W_0} \times 100 \tag{15}$$

e o conteúdo de água ou equilibrium water content (EWC) a é definido por:

% EWC =
$$\frac{W_{\infty} - W_0}{W_{\infty}} \times 100$$
 (16)

onde W_{∞} é o peso da amostra hidratada no equilíbrio.

2.8.2. Índice de refração

O índice refração foi avaliado através de um refratómetro automático ATR (*Schmidt* + *Haensch*, Alemanha). Antes de iniciar o teste as amostras foram hidratadas por imersão numa solução de lágrimas artificiais. Cada amostra foi avalizada 3 vezes consecutivas, tendo sido colocada sobre o prisma do refratómetro e pressionada durante a medição para garantir o contacto entre a superfície do prisma e a amostra.

2.8.3. Ângulo de contacto

A hidrofilicidade das membranas foi determinada através da medida do ângulo de contacto entre gotas de água e a superfície de amostras secas, pelo método da gota séssil, e com bolhas de ar em amostras hidratadas imersas em água, pelo método da bolha cativa. Para cada amostra, foram efetuadas 8 medições em diferentes pontos da amostra, utilizando o goniómetro *OCA 20 (Dataphysics*, EUA). Através de uma câmara digital existente no equipamento é captada uma imagem da gota/bolha e os ângulos de contacto são medidos com recurso a um *software*. Este *software* faz o ajuste do perfil da gota/bolha, à equação de Young-Laplace, e

traça uma tangente ao perfil da mesma, a partir da qual se determina o ângulo de contacto. De referir que ângulo obtido corresponde à média da medida de dois ângulos, um à esquerda e outro à direita da imagem da gota.

No método da gota séssil, a amostra foi colocada sobre uma lâmina de vidro e gotas de volume 10 µL foram depositadas, com auxílio de uma seringa micrométrica, sobre a superfície da amostra. Uma vez que com o passar do tempo o ângulo que a gota forma com a superfície diminui, a medição do ângulo foi efetuada assim que a gota contacta a superfície da amostra.

O método da bolha cativa consistiu em colocar uma bolha de ar de volume 10 µL sobre a superfície a ser analisada com o auxílio de uma agulha curva conectada a uma micro-seringa. A superfície da amostra a analisar estava invertida e submersa em água destilada, fixando-a numa tampa de uma célula de vidro GC 10 (*Dataphysics*, EUA), por meio de fita adesiva de dupla face e, colocada sobre a célula preenchida com água. Neste caso, o ângulo de contacto é definido entre a superfície do sólido e a tangente no ponto em que as três fases se encontram. Uma vez que a gota de ar em contacto com a amostra não alterou a sua forma com o tempo, não foi necessário definir um intervalo de tempo para a medição.

As montagens utilizadas na medição dos ângulos de contacto pelos métodos da gota séssil e da bolha cativa estão representados na Figura 25.

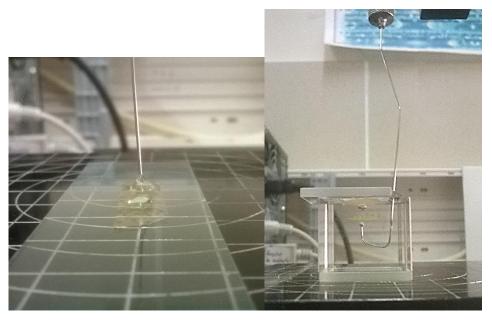


Figura 25 - Método de medição do ângulo de contacto por gota séssil (à esquerda) e por bolha cativa (à direita).

2.8.4. Transmitância

A transmitância das membranas foi determinada no intervalo de comprimentos de onda 200 a 700 nm, com intervalos de 1 nm, utilizando o espetrofotómetro UV/Vis V-530 (*Jasco*, EUA). Para isso, cortou-se uma tira de membrana seca e as extremidades foram coladas com fita cola numa célula de quartzo que serviu com suporte.

2.8.5. Análise termomecânica dinâmica (DMTA)

A análise DMTA foi conduzida num equipamento Tritec 2000 (*Triton Technology*, Reino Unido). As medições foram realizadas a frequências de 1 e 10 Hz e com uma velocidade de aquecimento de 5 °C min⁻¹. As amostras foram avaliadas numa gama de temperaturas de -130 °C a 150 °C.

2.8.6. Avaliação do tamanho das nanopartículas

O tamanho das nanopartículas foi caracterizado por dispersão dinâmica da Luz (DLS) através do equipamento Nano ZetaSizer ZS (*Malvern*, Reino Unido). Uma suspensão de nanopartículas foi introduzida numa cuvette de plástico e inserida no equipamento. Foram realizadas quatro medições a 37 °C.

2.8.7. Análise TEM

De modo a analisar a morfologia das nanopartículas de quitosano/poli(ácido acrílico), recorreu-se à técnica de microscopia eletrónica de transmissão (TEM), através do microscópio JEM 1400 (*JEOL*, EUA) com uma câmara SC1000 OriusTM CCD (*Gatan*, EUA). A nanoemulsão foi introduzida numa grelha com um revestimento de carbono e as imagens TEM foram obtidas através de uma câmara acoplada ao equipamento.

Capítulo 3

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção da formulação a utilizar no sistema de libertação controlada do fármaco

Foram preparadas diversas membranas com diferentes composições de modo a selecionar aquela que mais se adequava a um sistema de libertação de fármaco. Uma vez que as membranas são projetadas para serem utilizadas como lentes de contacto, é necessário que estas não se dissolvam no filme lacrimal. Portanto, o primeiro teste a realizar, para verificar a viabilidade das membranas, foi a sua solubilidade em água. A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 7 - Resultados da solubilidade em água das membranas de base quitosano preparadas.

Membrana	Composição	Dissolve em água?	Membrana	Composição	Dissolve em água?
1	1% CS	Sim	9	2% CS + 0,01% glioxal + 2% PVA	Não
2	1% CS + 1% PVA	Sim	10	2% CS + 0,02% glioxal + 2% PVA	Não
3	1% CS + 1% glioxal	Não	11	2% CS + 0,03% glioxal + 2% PVA)	Não
4	1% CS + 0,1% glioxal	Não	12	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA	Não
5	2% CS + 0,01% glioxal + 1% PVA	Não	13	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA + 0,5% CMC	Não
6	2% CS	Sim	14	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA + PVB	Não
7	2% CS + 1% PVA	Sim	15	2% CS + 2% PVA + 0,05% glutaraldeído	Não
8	2% CS + 2% PVA	Sim			

As membranas que dissolveram em água não têm as características necessárias para serem utilizadas como lentes de contacto, pelo que foram excluídas deste estudo. Verificou-se

que, para a concentração de quitosano de 1% (m/v; membranas 1 a 4), todas as membranas que apresentavam na sua composição um agente reticulante (glioxal ou glutaraldeído) não se dissolveram em água. Para esta concentração de quitosano, não foi possível a remoção das membranas 3 e 4 das caixas de Petri, devido ao facto de se apresentarem muito quebradiças. Uma vez que estas membranas foram preparadas com as concentrações de reticulante mais elevadas, tudo indica que se encontravam demasiado reticuladas e, como tal, demasiado rígidas. O aspeto das membranas preparadas com quitosano a 1% (m/v) e que se dissolveram em água (membranas 1 e 2) encontra-se documentado na Figura 26.

Uma vez que as membranas preparadas com quitosano a 1% (m/v) eram difíceis de manusear, por serem demasiado finas, aumentou-se a concentração de quitosano de 1 para 2% (m/v; membranas 5 a 15). As membranas obtidas eram mais espessas e permitiam um fácil manuseio, apresentando o aspeto documentado pelas fotografias da Figura 26. De notar que a reticulação com glutaraldeído tornou a membrana mais castanho-avermelhado, uma indicação da formação de um elevado número de ligações imina (–HC=N–). De referir que a membrana 14 não foi estudada, uma vez que se observou a precipitação da gota de PVB quando foi adicionada à mistura polimérica.

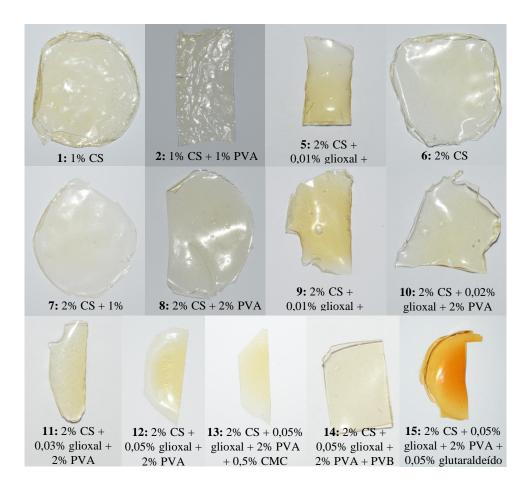


Figura 26 - Aparência das membranas de base quitosano obtidas.

3.1.1. Capacidade de absorção de água

O primeiro estudo realizado foi a avaliação da capacidade de absorção de água (swelling) das membranas quando imersas numa solução de lágrimas artificiais, de modo a selecionar a concentração ótima de reticulante e a exibirem um conteúdo de água semelhante ao das lentes de contacto mais comercializadas, que varia entre 38% a 85% [97]. Assim, foram preparadas membranas com diferentes concentrações do agente reticulante glioxal, mantendose as restantes concentrações constantes. A gama de concentrações estudadas variou entre 0,01% e 0,05% (v/v) de glioxal. Além disto, também se pretendeu observar o efeito do aumento da concentração de PVA, mantendo constante a concentração de reticulante. A Figura 27 representa a influência da concentração de glioxal (membranas 9 a 12) e o efeito do aumento de PVA (membranas 5 e 9) na cinética de absorção de água.

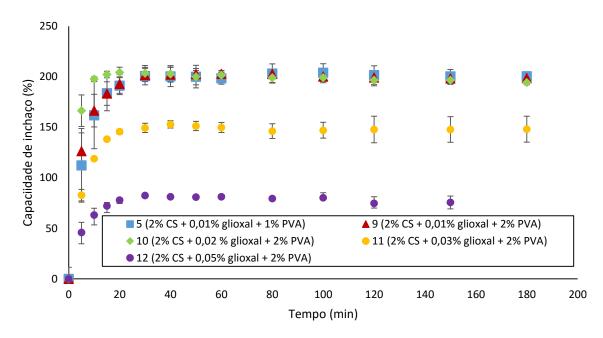


Figura 27 - Comparação da capacidade de inchaço das membranas de base quitosano variando a quantidade de reticulante ou de PVA, quando colocadas numa solução de lágrimas artificiais (barras de erro: desvio padrão; n=3).

Para todas as amostras, verifica-se um rápido aumento na quantidade de água absorvida, nos primeiros 20 minutos, alcançando-se o equilíbrio por volta dos 30 minutos. Pode observar-se claramente que o aumento da concentração de reticulante (membranas 9 a 12) provocou um decréscimo na velocidade e na capacidade de absorção de água, entre cerca de 75% e 200% (Figura 27). Isto ficará a dever-se ao maior grau de reticulação conseguido, do qual resulta um aumento da dificuldade de penetração das moléculas de água e uma menor capacidade de expansão da rede polimérica. Simultaneamente, ocorre uma redução dos grupos hidrofílicos

disponíveis, pois quanto maior a quantidade de glioxal, maior a probabilidade de ocorrer reação entre o glioxal e os grupos amínicos e hidroxílicos da membrana. Assim, é possível variar a capacidade de absorção de água alterando a concentração de glioxal.

Também se pretendeu comparar a influência da concentração de PVA na capacidade de absorção de água (membranas 5 e 9; Figura 27). Os resultados não são conclusivos, pois a percentagem de absorção de água é coincidente em ambos os casos. Tanto o PVA como o quitosano apresentam grupos hidroxilo que conferem maior hidrofilicidade ao polímero; contudo, estes grupos poderão reagir com o glioxal, diminuindo a hidrofilicidade. Assim, esperar-se-ia que se pudesse detetar algum efeito na absorção de água se a quantidade de PVA fosse bastante mais elevada do que a utilizada, de modo a existir um excesso de PVA na capacidade de inchaço em relação ao glioxal.

Além do uso de glioxal como agente reticulante, foi também estudado o efeito do outro reticulante utilizado, o glutaraldeído e foi ainda estudada uma membrana de quitosano modificado com ácido lático recorrendo a uma carbodiimida (CMC) e de PVA, reticulada com glioxal, passando a designar-se de membrana de CS-LA/PVA. Na Figura 28, pode-se comparar a capacidade de inchaço das membranas sintetizadas com a adição de quitosano reticulado com glutaraldeído, com glioxal e das membranas de CS-LA/PVA. A absorção de água da membrana

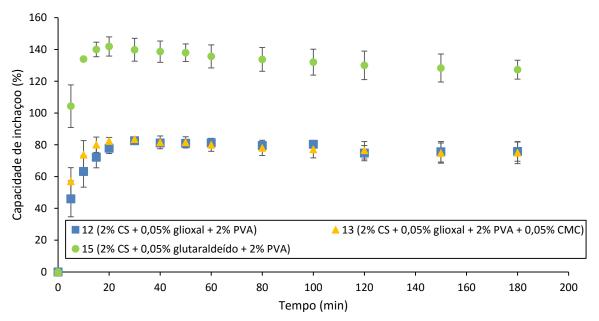


Figura 28 - Comparação da capacidade de inchaço das membranas de base quitosano reticulada com glutaraldeído ou glioxal e da membrana de CS-LA/PVA, reticulada com glioxal, quando colocadas numa solução de lágrimas artificiais (barras de erro: desvio padrão; n=3).

de quitosano e PVA, reticulada com glutaraldeído (membrana 15) é maior que a absorção de água da membrana de quitosano e PVA, reticulada com glioxal, (membrana 12; designada de membrana de CS/PVA). Isto está de acordo com o que seria de esperar pois, como o

glutaraldeído apresenta um peso molecular superior ao glioxal, isso significa que, para a mesma concentração de reticulante, existe um menor número moléculas de glutaraldeído do que de glioxal, ou seja, existe um menor número de grupos aldeído, resultando num menor grau de reticulação e uma maior absorção de água. A membrana de CS-LA/PVA (membrana 13) apresentou o mesmo perfil de inchaço que a membrana de CS/PVA (membrana 12). Na Tabela 8 encontram-se os valores do conteúdo de água das membranas preparadas com diferentes concentrações de glioxal e diferentes concentrações de PVA, bem como da membrana reticulada com glutaraldeído e da membrana de CS-LA/PVA reticulada com glioxal. O conteúdo de água (EWC) refere-se à percentagem de água no sistema inchado, calculada em relação ao peso da lente hidratada no equilíbrio (Equação 11).

Tabela 8 - Conteúdo de água (EWC) das membranas de base quitosano/PVA reticuladas com glioxal e glutaraldeído e da membrana de CS-LA/PVA reticulada com glioxal, quando colocadas numa solução de lágrimas artificiais (erro: desvio padrão; n=3).

Membrana	Composição	% EWC
5	2% CS + 0,01% glioxal + 1% PVA	$66,71 \pm 0,1$
9	2% CS + 0,01% glioxal + 2% PVA	$66,5 \pm 0,4$
10	2% CS + 0,02% glioxal + 2% PVA	$66,0 \pm 0,3$
11	2% CS + 0,03% glioxal + 2% PVA	$59,6 \pm 2,1$
12	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA	$43,1 \pm 1,6$
13	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA + 0,05% CMC	$43,5 \pm 1,7$
15	2% CS + 0,05% glutaraldeído + 2% PVA	$56,9 \pm 1,5$

Os valores de conteúdo de água determinados variam entre 43 e 67% (Tabela 8), aproximadamente, estando dentro dos limites das lentes de contacto comerciais, que variam entre 38 e 85% [97]. As membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA (membranas 12 e 13) foram as selecionadas para os estudos subsequentes de caracterização e de carregamento e libertação do fármaco, já que eram as que apresentavam uma menor capacidade de absorção de água, permitindo um melhor manuseamento, uma vez que não rasgavam tão facilmente.

3.2. Caracterização das membranas selecionadas

Nesta secção, serão apresentados os resultados da caracterização das membranas selecionadas, utilizando os seguintes métodos: refratometria, goniometria de ângulos de contacto, transmitância e DMTA. A refractometria determina o índice de refração, relacionado com o conteúdo de água da membrana. A goniometria de ângulos de contacto permite caracterizar a hidrofilicidade da superfície das membranas. A análise DMTA tem o objetivo de determinar as temperaturas de transição vítrea, indicadoras da estabilidade da membrana e o módulo de armazenamento, indicador da resistência do material à deformação sob pressão.

3.2.1. Índice de refração

A Tabela 9 apresenta os índices de refração das membranas de CS/PVA (membrana 12) e de CS-LA/PVA (membrana 13), reticuladas com glioxal.

Tabela 9 - Índices de refração (erro: desvio padrão; n=3).

Membrana	Composição	Índice de refração
12	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA	$1,40 \pm 0,01$
13	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA+ 0,05% CMC	$1,36 \pm 0,01$

Os resultados mostram que o valor médio do índice de refração da membrana 12 (CS/PVA) é maior que o da 13 (CS-LA/PVA), uma diferença que possui significado estatístico (p = 0,008, teste t de Student; grau de confiança de 95%). Como quanto maior o conteúdo de água da lente mais o seu índice de refração se aproxima do índice de refração da água (1,33; [98]), a membrana que apresenta um índice de refração mais próximo deste (membrana 13) deverá possuir um maior conteúdo de água, embora os valores de conteúdo de água obtidos sejam semelhantes (Tabela 8). Como as lentes de contacto hidrófilas comerciais apresentam um índice de refração entre 1,40 e 1,42 [99], a membrana 12 é a que mais se aproxima das lentes de contacto comerciais.

3.2.2. Ângulos de contacto

A Tabela 10 apresenta os valores dos ângulos de contacto obtidos pelos métodos da gota séssil e da bolha cativa, determinados com água.

Tabela 10 - Valores médios dos ângulos de contacto determinados com água, pelos métodos da gota séssil e da bolha cativa (erro: desvio padrão; n = 8).

		Ângulo de co	ontacto (°)
Membrana	Composição	Gota Séssil	Bolha Cativa
12	2% CS + 2% glioxal + 2% PVA	75 ± 2	56 ± 3
13	2% CS + 2% glioxal + 2% PVA+ 0,05% CMC	54 ± 2	45 ± 3

Como já foi referido (Secção 1.6.3) superfícies com ângulos de contacto (gota séssil) superiores a 65° podem ser consideradas hidrofóbicas. Pela observação da Tabela 10, pôde constatar-se que a superfície da membrana de CS/PVA é hidrofóbica, enquanto que a da membrana de CS-LA/PVA é hidrofílica. Isto sugere que a modificação do quitosano altera as características da superfície da membrana. Uma possível explicação para a diminuição do ângulo de contacto da membrana de CS-LA/PVA está na estrutura química do quitosano modificado, que apresenta um maior número de grupos polares (hidroxilo e carbonilo) do que o quitosano não modificado, aumentando, assim, a hidrofilicidade do material. Uma vez que os valores do ângulo de contacto conhecidos para lentes comerciais se referem a lentes de contacto hidratadas [90-92], não foi possível comparar os valores obtidos com as lentes comerciais, por terem sido medidos com a membrana seca.

3.2.3. Transmitância

Os resultados da análise das diversas zonas do espectro ultravioleta (UV) e visível da luz encontram-se representados na Figura 29, onde se podem observar as diferenças de transmitância entre a membrana de CS/PVA (membrana 12) e a membrana de CS-LA/PVA (membrana 13). As membranas bloquearam parte do espetro da radiação UV de comprimento

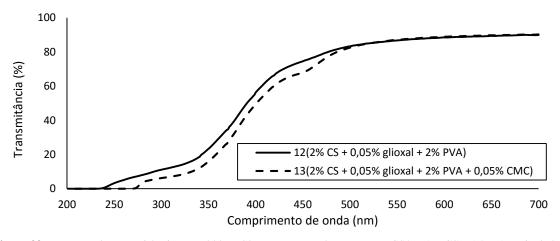


Figura 29 - Espetros de transmitância entre 200 e 700 nm, para membranas secas, CS/PVA e CS-LA/PVA, reticuladas.

de onda de 200 a 250 nm, para a membrana de CS/PVA e de 200 a 280 nm, para a membrana de CS-LA/PVA. Com o aumento do comprimento de onda, observou-se um aumento transmissão até 50%, no limite da radiação UV (400 nm). Quanto menor a transmissão da radiação UV, melhor será a proteção do olho pela lente pretendendo-se, por isso, que a transmitância seja o mais baixa possível na gama do UV. Os valores obtidos estão em concordância com os das lentes de contacto comerciais, que variam entre 38 a 58% [100], apesar de existirem até valores de transmitância mais elevados na zona UV [92]. Já na gama do visível, a membrana de CS/PVA apresenta uma transmitância que varia entre 56 e 90%, sendo a média 83%, enquanto que a membrana de CS-LA/PVA apresenta uma transmitância entre 50 e 90%, com média de 82%. A partir dos 500 nm e até aos 700 nm, as transmitâncias das membranas são coincidentes. Pode observar-se que, para comprimentos de onda a partir do azul (500 nm) e em direção ao violeta, a transmitância diminui cerca de 40% indicando que as membranas absorvem alguma luz na zona do azul/violeta. Esta diminuição é mais acentuada no caso da membrana de CS-LA/PVA, i.e., esta membrana absorve mais radiação eletromagnética na zona do azul/violeta do que a membrana de CS/PVA. Este fato é explicável devido à cor amarelada apresentada pelas membranas. Quando a luz branca (combinação das cores primárias azul, verde e vermelho) incide sobre a amostra, parte da luz é absorvida e outra parte será refletida. A cor da amostra resulta da cor da luz que esta consegue refletir. Se as membranas apresentam tons amarelados, que resultam da junção das cores verde e vermelho, quer dizer que a cor absorvida pelas membranas foi o azul. Portanto, era de prever que as membranas absorvessem radiação eletromagnética na zona do azul/violeta, dado a sua cor complementar ser o amarelo. Os valores médios da transmitância no espetro da radiação visível para estas membranas estão no limite dos valores aceitáveis para lentes de contacto, apesar dos valores na literatura terem sido determinados com lentes hidratadas. No entanto, as membranas

apresentam uma cor amarelada, o que impede a sua utilização como lentes de contacto, mas poderão ser utilizadas como inserção ocular. Poderá ser possível evitar esta cor amarela utilizando quitosano mais purificado, que é branco, em vez do utilizado, que era amarelado.

3.2.4. Análise termomecânica dinâmica

A caracterização térmica teve como objetivo a determinação dos valores de temperatura de transição vítrea ($T_{\rm g}$), tendo-se utilizado o DMTA. O valor de $T_{\rm g}$ é dado pelo valor de temperatura ao qual ocorre um pico na curva de tan δ , enquanto, simultaneamente, ocorre um decréscimo do módulo de elasticidade . Na tabela 11 encontra-se os valores das temperaturas de transição vítrea da membrana de CS/PVA, da membrana de CS-LA/PVA e da membrana de referência preparada apenas com quitosano (membrana de CS) e nas Figura 30 a 31 representam-se as curvas obtidas das respetivas membranas.

Tabela 11 - Temperaturas de transição vítrea das membranas secas de CS, de CS/PVA e de CS-LA/PVA, obtidas pela análise DMTA (teste realizado de -130 a 150 °C; taxa de aquecimento 5 °C min⁻¹; frequências de oscilação: 1 e 10 Hz).

Membrana	Composição	<i>T</i> _g (°C)
6	2% CS	30; 88-100
12	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA	54; 100
13	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA + 0,05% CMC	36-45; 84-90

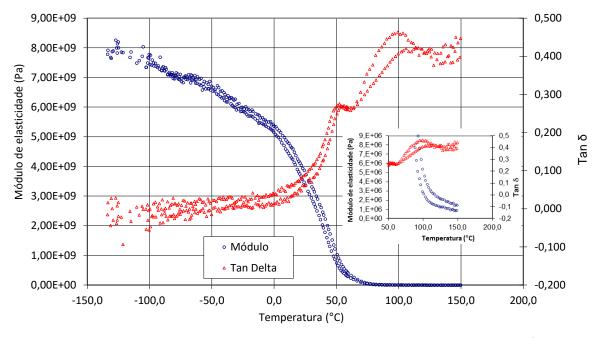


Figura 30 - Resultados da análise DMTA da membrana de CS/PVA) seca, para taxa de aquecimento 5 °C min⁻¹: variação do módulo de elasticidade e fator de perda (t*an δ*) em função da temperatura para frequências de oscilação 1 e 10 Hz. O gráfico menor representa uma ampliação do maior na zona entre 50 e 150 °C.

Pela análise do gráfico da Figura 30 é possível distinguir dois picos na curva de tan δ , para a membrana de CS/PVA (membrana 12). O primeiro corresponde a uma temperatura de transição vítrea de cerca 54 °C e, o segundo, a uma temperatura de transição vítrea de aproximadamente 100 °C. A primeira transição vítrea pode corresponder à presença de quitosano e a segunda temperatura de transição vítrea poderá corresponder à presença do polímero quitosano ou PVA [101,102].

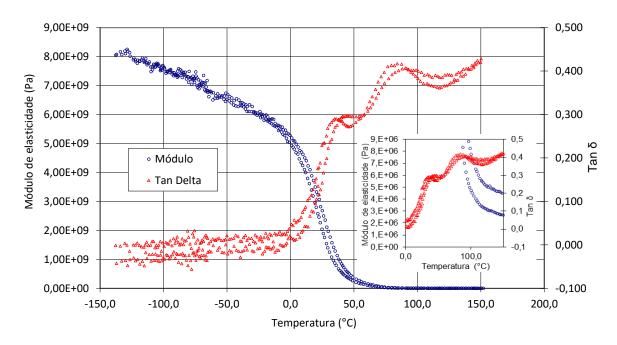


Figura 31 - Resultados da análise DMTA da membrana de CS-LA/PVA seca, para taxa de aquecimento 5 °C min⁻¹: variação do módulo de elasticidade e fator de perda (tan δ) em função da temperatura para frequências de oscilação 1 e 10 Hz. O gráfico menor representa uma ampliação do maior na zona entre 0 e 150 °C.

Para membrana de CS-LA/PVA (membrana 13, Figura 31), podem distinguir-se também duas transições vítreas, uma por volta dos 36-45 °C e outra próxima dos 84-90 °C. Comparando este resultado com o da membrana de CS/PVA (membrana 12), pode verificar-se que há uma diminuição em ambas as $T_{\rm g}$'s. Isto indica que o quitosano modificado com ácido lático apresenta uma temperatura de transição vítrea inferior à do quitosano não modificado, o que leva a crer que, naquele caso, as cadeias poliméricas não interagem tão fortemente entre si, não sendo necessário tanta energia para que as cadeias no estado vítreo adquiram mobilidade. Como já referido na Secção 1.6.5., a $T_{\rm g}$ de lentes de contacto comerciais desidratadas é superior a 100 °C. Por exemplo lentes de pHEMA, Hilafilcon A e Balafilcon B desidratadas apresentam $T_{\rm g}$'s de 116 °C, 143 °C e 124 °C, respetivamente [94]. Estes valores são muito superiores à temperatura média do olho, de aproximadamente 35 °C [103], indicando que as lentes comerciais desidratadas devem ter uma temperatura de transição vítrea superior à temperatura do olho (aliás todas as lentes de contacto são matrizes amorfas [104]). Comparando a

temperatura média do olho com a temperatura de transição vítrea da membrana de CS/PVA (~36-45 °C), constata-se que são muito próximas e a $T_{\rm g}$ da membrana de CS/PVA é bastante inferior à das lentes de contacto comerciais atrás referidas. No entanto, o valor da $T_{\rm g}$ diminuirá quando a lente for hidratada, pelo que a $T_{\rm g}$ que interessa comparar não é a de lentes desidratadas mas sim a de lentes hidratadas, que não se conseguiu encontrar na literatura. A segunda transição das membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA poderá dever-se ao polímero PVA, cuja $T_{\rm g}$ é de, aproximadamente, 88 °C [101]. Sendo esse o caso, isso implicaria que não ocorreria uma mistura molecular entre o quitosano e o PVA.

Foi também estudada a temperatura de transição vítrea de uma membrana preparada apenas com quitosano, com a mesma concentração usada na preparação das outras membranas (2% m/v), a fim de se servir como referência e comparar as $T_{\rm g}$. A análise DMTA desta membrana de CS encontra-se na Figura 32.

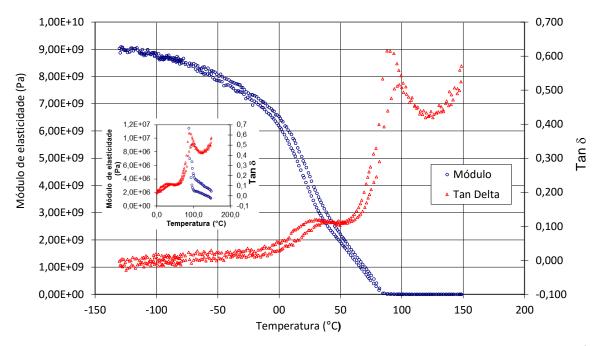


Figura 32 - Resultados da análise DMTA da membrana de CS (membrana 6) seca, para taxa de aquecimento 5 °C min⁻¹: variação do módulo de elasticidade e fator de perda (t*an* δ) em função da temperatura para frequências de oscilação 1 e 10 Hz. O gráfico menor representa uma ampliação do maior na zona entre 0 e 150 °C.

Esta membrana de CS apresenta dois picos, próximos de 30 e 88-100 °C. O resultado da primeira T_g vai de encontro ao que seria de esperar, uma vez que esta membrana, não sendo reticulada, apresentará uma T_g inferior às das membranas reticuladas. Para a segunda T_g , o valor da membrana preparada só com quitosano é muito próximo do das outras membranas, pelo que as segundas T_g 's nas membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA poderão não se dever ao PVA mas sim ao quitosano. Alternativamente, o pico do PVA poderá encontrar-se sobreposto ao do quitosano. Na literatura, a temperatura de transição vítrea, estimada por DMTA, de um filme

de quitosano, cujo solvente era o ácido acético, foi de aproximadamente 94 °C [102], enquanto que, noutro estudo, obteve-se uma $T_{\rm g}$ de 203 °C [105], havendo ainda quem afirme que a transição vítrea do quitosano não é clara [105]. Kittur *et al.* [106] não encontrou nenhuma evidência para sugerir uma $T_{\rm g}$ para o quitosano, uma vez que a temperatura a que ocorre pode ser tão elevada que a degradação do polímero impeça a sua determinação. Uma possível explicação para a $T_{\rm g}$ calculada da membrana de quitosano ser baixa pode dever-se ao facto de se usar ácido láctico na dissolução do quitosano, pois este solvente poderá funcionar como plastificante.

É importante mencionar que os valores de $T_{\rm g}$ aqui apresentados necessitam de um estudo mais aprofundado para se poder realmente afirmar que se referem à transição vítrea, recorrendo a outros métodos de análise, como a calorimetria diferencial de varrimento (DSC).

Em suma, a membrana de CS/PVA apresenta uma $T_{\rm g}$ superior à $T_{\rm g}$ da membrana de CS-LA/PVA, o quer dizer que esta membrana é mais resistente a deformações sob pressão que a membrana de CS-LA/PVA, sendo uma propriedade vantajosa no caso do manuseamento de uma lente de contacto.

O módulo de armazenamento é uma medida da energia mecânica que o material é capaz de armazenar, a análise do módulo reflete a resistência das membranas à deformação sob tensão. A Figura 33 representa a variação do módulo de armazenamento em função da temperatura.

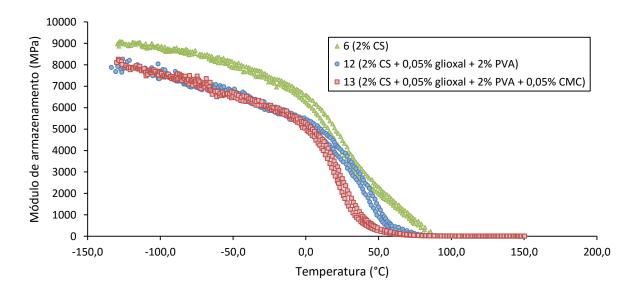


Figura 33 - Variação do módulo de armazenamento em função da temperatura, para as membranas secas 6, 12 e 13, com taxa de aquecimento 5 °C min⁻¹ e frequências de oscilação 1 e 10 Hz.

Verifica-se que o módulo de armazenamento decresce com o aumento da temperatura, apresentando em todos os casos uma transição bem definida que se inicia próximo dos 0 °C, e que as membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA apresentam um perfil muito semelhante. No

entanto, os respetivos valores do módulo de armazenamento à temperatura ambiente (25 °C) apresentam valores significativamente diferentes: para a membrana de CS/PVA tem-se módulos de armazenamento 3363 e 3726 MPa, para frequências de 1 Hz e 10 Hz, respetivamente, e para a membrana de CS-LA/PVA tem-se 2045 e 2686 MPa, para frequências de 1 e 10 Hz. À temperatura média da córnea (35 °C) os módulos de armazenamento para as respetivas membranas também são diferentes: para a membrana de CS/PVA tem-se 245 e 2686 MPa, para frequências de 1 Hz e 10 Hz, respetivamente, e para a membrana de CS-LA/PVA tem-se módulos de armazenamento de 876 e 1293 MPa, para frequências de 1 e 10 Hz. Assim, verifica-se que, tando à temperatura ambiente como à temperatura da córnea, a membrana mais rígida é a de CS/PVA, uma vez que apresenta módulos superiores, resultados que estão concordantes com as T_g 's medidas (Tabela 11). Ainda assim, comparativamente à membrana de referência (de quitosano), os valores do seu módulo de armazenamento são superiores às das restantes membranas, o que não está de acordo com o esperado, pois a primeira T_g da membrana de quitosano é mais baixa, pelo que deveria ser a que apresentaria módulos de armazenamento mais baixos.

3.3. Caracterização das partículas

Nesta secção, serão apresentados os resultados do diâmetro médio das nanopartículas de CS/PAA e das micropartículas de silicone e da morfologia das nanopartículas de CS/PAA, recorrendo à técnica de TEM.

3.3.1. Tamanho das partículas

A Tabela 12 mostra o resultado do tamanho médio e do índice de polidispersão (PDI) das partículas de CS/PAA e de silicone, com e sem fármaco, utilizadas na incorporação nas membranas.

Tabela 12 - Diâmetros médios e índices de polidispersão (PDI) das nanopartículas de CS/PAA e micropartículas de silicone, a 37 °C (erro: desvio padrão; n=4).

	Nanopartículas CS/PAA		Micropartíc	ulas silicone
	Sem fármaco Com fármaco		Sem fármaco	Com fármaco
Diâmetro médio (nm)	232 ± 4	638 ± 24	2273 ± 544	3058 ± 1245
PDI	$0,49 \pm 0,04$	$0,\!48 \pm 0,\!07$	$0,92 \pm 0,13$	$0,84 \pm 0,20$

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que todas as partículas apresentam uma distribuição de tamanhos larga, com maior variabilidade no caso das partículas de silicone. Comparando as nanopartículas de CS/PAA com e sem fármaco, verifica-se que a diferença de tamanhos é estatisticamente significativa (p = 0,0001, teste t de Student; grau de confiança de 95%). Já para as micropartículas de silicone essa diferença não é significativa (p = 0,2918, teste t de Student; grau de confiança de 95%). O aspeto da suspensão de partículas de silicone pode ser observado na Figura 34, e na Figura 35, apresenta-se o aspeto da nanoemulsão das nanopartículas de CS/PAA e das nanopartículas secas liofilizadas.



Figura 34 - Micropartículas de silicone.



Figura 35 - Nanopartículas de CS/PAA (à esquerda) e aparência das partículas de CS/PAA sujeitas ao processo de liofilização (à direita).

3.3.2. Morfologia das nanopartículas de CS/PAA

O objetivo deste estudo foi verificar a incorporação de fármaco no interior das partículas. A Figura 36 mostra micrografias de TEM das nanopartículas CS/PAA sintetizadas na ausência e presença de fármaco.

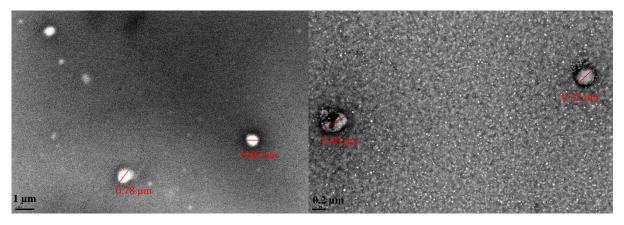


Figura 36 - Micrografias TEM das nanopartículas de CS/PAA sem fármaco (à esquerda) e com fármaco (à direita).

As imagens mostram que as partículas apresentam uma forma arredondada com um núcleo claro rodeado por uma membrana escura. Na amostra carregada com fármaco, é possível observar um núcleo cinzento. A alteração da coloração do interior das nanopartículas com e sem fármaco poderá dever-se à presença de fármaco. Contudo, não é possível afirmar se existe fármaco encapsulado devido à dificuldade na focagem das partículas sem fármaco e porque as imagens não apresentam a mesma escala. Os diâmetros destas nanopartículas não são próximos do tamanho médio das nanopartículas determinadas pelo ZetaSizer (Tabela 12), mesmo assim, estes diâmetros são acetáveis, dado o índice de polidispersão ser elevado.

3.4. Membranas carregadas com partículas

De modo a aumentar a duração da libertação de fármaco no olho foram preparadas membranas carregadas com nano e micropartículas, que continham fármaco. Esperar-se-ia que a libertação do fármaco fosse mais lenta, pois existem duas barreiras ao transporte do fármaco: a difusão através das partículas e a difusão através da matriz polimérica. A adição das partículas carregadas com fármaco foi realizada no momento da preparação das membranas. As nanopartículas de CS/PAA foram adicionadas no estado seco e as micropartículas de silicone foram adicionadas em forma de suspensão.

A Figura 37 mostra o resultado final dos sistemas de libertação de fármaco com nanopartículas de CS/PAA e micropartículas de silicone. A membrana de CS/PVA contendo



Figura 37 - Membranas de CS/PVA carregadas com nanopartículas de CS/PAA (à esquerda) e micropartículas de silicone (à direita).

micropartículas de silicone é branca e opaca. Este sistema não pode ser utilizado como lente de contacto pois impediria a visão, mas poderá ser utilizada como inserção ocular colocada no saco conjuntival superior ou inferior. A membrana de CS/PVA com nanopartículas de CS/PAA não sofreu qualquer alteração de aspeto relativamente à membrana sem partículas (membrana CS/PVA, sem partículas).

3.5. Estudo da cinética de libertação de fármaco

Para estudar a cinética de libertação de um fármaco é necessário obter o espetro de absorção do fármaco e a curva de calibração necessária à sua quantificação. Uma vez que a preparação de micropartículas de silicone necessita do emprego de uma temperatura de 60 °C durante 6 h, houve necessidade de verificar se o fármaco dexametasona resistia a este tratamento térmico. Além disto, também foi necessário verificar a estabilidade de 21-fosfato dissódico de dexametasona, a 40 °C, durante 24 h, pois é nestas condições que se dá a evaporação do solvente para formar as membranas. Esses resultados são apresentados nas Secções de 3.5.1. a 3.5.3..

3.5.1. Espetros de absorção de fármaco

A Figura 38, abaixo apresentada, ilustra os espetros de absorção da dexametasona e do sal 21-fosfato dissódico de dexametasona.

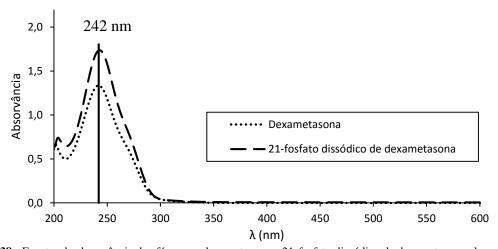


Figura 38 - Espetro de absorvância dos fármacos dexametasona e 21-fosfato dissódico de dexametasona, de concentrações 50 μg/mL, em solução de lágrimas artificiais.

Pela observação da Figura 38 é possível verificar que o comprimento de onda para o qual a absorvância é máxima toma o valor de 242 nm para ambas as formas do fármaco. Foi este o comprimento de onda utilizado para quantificar o fármaco nas amostras recolhidas do meio de libertação.

3.5.2. Curvas de calibração

As Figura 39 e 40 apresentam as curvas de calibração dos fármacos, obtidas pelo método dos mínimos quadrados, ajustando uma reta aos pontos obtidos experimentalmente.

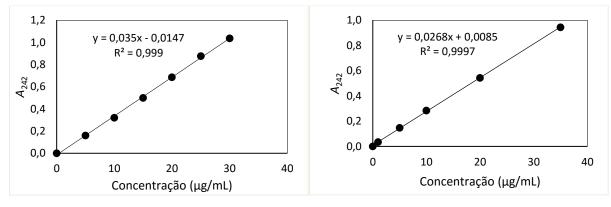


Figura 39 - Curva de calibração da dexametasona em solução de lágrimas artificiais.

Figura 40 - Curva de calibração de 21-fosfato dissódico de dexametasona em solução de lágrimas artificiais.

3.5.3. Avaliação da degradação térmica do fármaco

Para verificar se a temperatura utilizada na preparação das nanopartículas de silicone causam degradação térmica do fármaco sujeitou-se o fármaco a uma temperatura de 60 °C durante 6 h e comparou-se o espetro de absorção UV-Vis obtido com o do fármaco não sujeito as essas condições. Os espetros para a dexametasona e para o 21-fosfato dissódico de dexametasona encontram-se nas Figura 41 e 42, respetivamente.

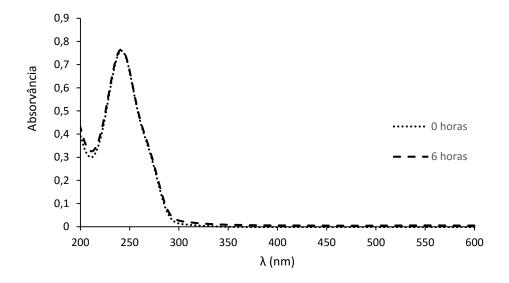


Figura 41 - Espetros de absorvância obtidos no ensaio de degradação de 30 μg/mL de dexametasona em solução de lágrimas artificiais, a 60 °C, durante 6 horas.

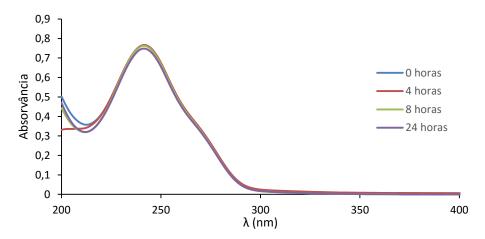


Figura 42 - Espetros de absorvância obtidos no ensaio de degradação de 30 μg/mL de 21-fosfato dissódico de dexametasona em solução de lágrimas artificiais, a 40 °C, durante 24 horas.

Como se pode observar pelas Figura 41 e 42, não existiram alterações significativas no espetro, pelo que indica que os fármacos não sofrem degradação térmica.

Nas próximas secções são apresentados os perfis de libertação de fármaco de todos os sistemas estudados, representando-se a quantidade de fármaco libertado e acumulado em função do tempo.

3.5.4. Membranas de base quitosano sem partículas

Na Figura 43, apresenta-se a quantidade de fármaco libertado ao longo do tempo para os casos em que o fármaco foi incorporado por oclusão em membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA.

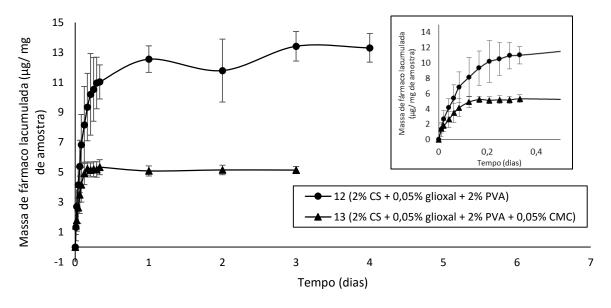


Figura 43 - Quantidade de 21-fosfato dissódico de dexametasona libertada, ao longo do tempo, em solução de lágrimas artificiais, a 37 $^{\circ}$ C (fármaco incorporado nas membranas 12 e 13 por oclusão, barras de erro: desvio padrão; n=3). O gráfico menor representa uma ampliação do maior até às 8 horas.

Admitindo que o fármaco foi distribuído uniformemente pelas membranas é possível observar que a membrana de CS-LA/PVA (membrana 13) liberta menos fármaco e atinge o equilíbrio mais cedo do que a membrana de CS/PVA (membrana 12). A membrana CS/PVA deixou de libertar fármaco ao fim de um dia, enquanto que, a membrana CS-LA/PVA deixou de o libertar ao fim de 4 horas. O facto da membrana de CS-LA/PVA permitir a libertação de fármaco num menor espaço de tempo pode ser explicado por esta membrana apresentar uma T_g (Tabela 11), muito próxima da temperatura do meio de libertação do fármaco (37 °C), pelo que, a esta temperatura, a membrana estará na transição de um estado amorfo para um estado elastomérico, onde as cadeias poliméricas exibem maior mobilidade facilitando, assim, a difusão do fármaco. Os perfis apresentados na Figura 43 correspondem a um perfil típico de uma libertação de fármaco a partir de lentes de contacto [4].

De modo a avaliar a influência do método de incorporação de fármaco foi também incorporado fármaco na membrana por *soaking*. A Figura 44 apresenta a libertação de fármaco incorporado por *soaking* para as membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA.

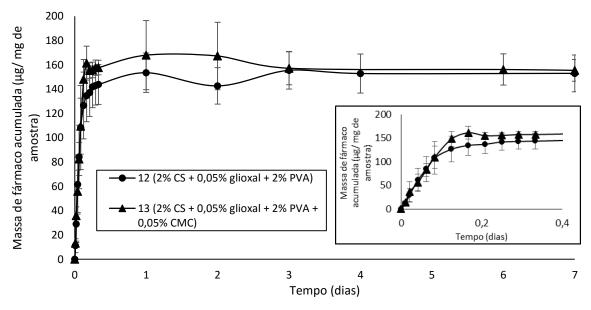


Figura 44 - Quantidade de 21-fosfato dissódico de dexametasona libertada ao longo do tempo, a partir das membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA, em solução de lágrimas, artificiais a 37 °C (fármaco incorporado nas membranas por soaking, barras de erro: desvio padrão; n = 3). O gráfico menor representa uma ampliação do maior até às 8 horas.

Pode constatar-se que ambas as membranas apresentam um perfil muito semelhante. Obteve-se uma libertação rápida nas primeiras 2/3 horas, seguida de um intervalo em que a libertação é progressivamente mais lenta, até não se observar qualquer libertação, a partir do 3° dia. Este perfil é típico de uma libertação de fármaco a partir de lentes de contacto [4]. Verificou-se, ainda, que a quantidade de fármaco libertada era uma ordem de grandeza superior

à dos sistemas preparados por oclusão do fármaco. No entanto, a concentração de fármaco na solução de polímero usada para preparar as membranas contendo fármaco introduzido por oclusão era cinco vezes inferior à utilizada na impregnação por *soaking*.

Para a análise da cinética de libertação do fármaco, os perfis de libertação das Figuras 41 e 42 foram representados de acordo com alguns modelos cinéticos utilizados na análise dos perfis de libertação de sistemas de libertação controlada de fármacos. Os escolhidos foram os modelos de Korsmeyer-Peppas, de ordem zero, de primeira ordem e de Higuchi. Os gráficos traçados a partir destes modelos podem ser consultados no Anexo B, Figs.B.1 a B.4. A qualidade do ajuste do modelo aos pontos experimentais foi avaliada a partir do valor do coeficiente de correlação da regressão linear (R²). A Tabela 13 resume os valores de R² para cada membrana e modelo estudado.

Tabela 13 - Coeficiente de correlação linear (R²) obtido através da linearização dos modelos matemáticos para o perfil de libertação de 21-fosfato dissódico de dexametasona a partir das membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA.

na		Modelo			
ıbra	Composição	Korsmeyer-	Ordem	Primeira	III ay ahi
Membrana		Peppas	Zero	Ordem	Higuchi
	O	Oclusão			
12	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA	0,9882	0,3694	0,2386	0,4184
13	2% CS + 0,05% glioxal +2% PVA	0,9782	0,7164	0,6372	0,9031
	+ 0,05% CMC				
	S	oaking			
12	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA	0,9902	0,3910	0,2407	0,7159
13	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA	0,9801	0,3688	0,2512	0,6898
	+ 0,05% CMC				

Os valores do coeficiente de correlação para as membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA, com fármaco incorporado por oclusão ou *soaking*, foram maiores para o modelo cinético de Korsmeyer-Peppas, indicando que este é o modelo que se ajusta melhor ao perfil de libertação. Para ambos os métodos de impregnação de fármaco, a membrana de CS/PVA é a que apresenta um R^2 superior. Para a avaliação do tipo de processo de transferência de fármaco do interior para o exterior da matriz recorreu-se à Equação (4) (Secção 1.4.3.) proposta por Korsmeyer e Peppas. Os valores obtidos através do estudo de libertação foram logaritmizados, representando-se log (M_t/M_∞) *versus* log(t) (Anexo B, Figs. B.1 a B.4). Através do declive

da reta obtida por regressão linear, obteve-se o valor do parâmetro n e, a partir ordenada na origem, obteve-se o valor de k (= $4(D/\pi l^2)^{1/2}$), que permitiu determinar o coeficiente de difusão (D), conhecida a espessura de transporte. As espessuras das membranas utilizadas encontram-se na Tabela 14, variando entre 0,13 e 0,27 mm. A partir do valor de n foi possível determinar o tipo de mecanismo de libertação. A Tabela 15 resume os resultados obtidos pelo modelo de Korsmeyer-Peppas.

Tabela 14 - Espessura das membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA estudadas na libertação de fármaco incorporado por oclusão e *soaking* (erro: desvio padrão; n = 3).

		Espessura (mm)	
Membrana	Composição	Oclusão	Soaking
12	2% CS + 2% glioxal + 2% PVA	$0,27 \pm 0,021$	$0,17 \pm 0,023$
13	2% CS + 2% glioxal + 2% PVA+ 0,05%	$0,13 \pm 0,026$	$0,15 \pm 0,025$
	CMC		

Tabela 15 - Valores do parâmetro *n* e mecanismo de transporte obtidos do modelo Korsmeyer-Peppas, a partir das membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA preparadas com impregnação de fármaco por oclusão e por *soaking*.

Membrana	Composição	Valor de	Mecanismo de transporte
	Oclusão		
12	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA	0,76	Anómalo (Caso II)
13	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA + 0,05% CMC	0,44	Difusão Quase Fickiana
	Soaking		
12	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA	1,14	Super Caso II
13	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA + 0,05% CMC	0,98	Anómalo (Caso II)

A partir do valor de *n*, pode afirmar-se que a membrana de CS/PVA (membrana 12), com fármaco impregnado por oclusão, não apresenta uma difusão Fickiana, apresentando um tipo de transporte anómalo, significando que as taxas de difusão do fármaco e de relaxação das cadeias poliméricas da matriz são semelhantes. Assim, neste caso, a cinética de transporte do fármaco resulta de uma combinação de dois mecanismos: difusão do fármaco e relaxação da matriz polimérica (transporte do tipo Caso II). Para a membrana de CS-LA/PVA (membrana 13), com fármaco impregnado por oclusão, a difusão é Quase Fickiana, apresentando uma taxa

de difusão muito mais baixa do que a de relaxação da matriz polimérica, mas não o suficiente para ser difusão Fickiana.

Na impregnação de fármaco por *soaking*, o transporte de fármaco da membrana de CS/PVA é do tipo Super Caso II (difusão não-Fickiana), que é caracterizado pela existência de um retardamento no arranque da libertação de fármaco e uma aceleração na parte final da libertação, antes de atingir o *plateau*. Contudo, este retardamento na parte inicial da libertação não se verificou neste sistema. Para a membrana de CS-LA/PVA (membrana 13), o transporte também não é caracterizado pela difusão de Fick, sendo um mecanismo de transporte do tipo anómalo, já muito próximo do mecanismo do tipo Caso II, significando que a velocidade de difusão do fármaco é um pouco maior do que o processo de relaxação.

A partir do modelo de Korsmeyer-Peppas, calculou-se a constante de libertação (k) e o coeficiente de difusão aparente, para cada membrana (Tabela 16). Os coeficientes de difusão são aqui designados por "aparentes", uma vez que o mecanismo que controla a libertação de fármaco não é a difusão Fickiana. Portanto, os valores servirão apenas como uma medida da taxa de libertação do fármaco a partir das membranas, permitindo compará-las.

Tabela 16 - Coeficiente de difusão aparente e constante cinética, k, obtidos através do modelo de Korsmeyer-Peppas, para o perfil de libertação de 21-fosfato dissódico de dexametasona a partir das membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA.

Membrana	Composição	Coeficiente de difusão aparente (m²/s)	k (s ⁻¹)
	Oclusão		
12	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA	$2,2\times10^{-17}$	4,0×10 ⁻⁵
13	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA + 0,05% CMC	$1,7 \times 10^{-18}$	$2,2\times10^{-5}$
	Soaking		
12	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA	1,5×10 ⁻¹⁶	1,6×10 ⁻⁴
13	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA + 0,05% CMC	$3,3\times10^{-17}$	8,9×10 ⁻⁵

O coeficiente de difusão da membrana de CS/PVA com fármaco incorporado por oclusão, bem como a constante de libertação k, são superiores aos da membrana de CS-LA/PVA, estando em concordância com a Figura 43, onde a libertação dos primeiros 60% do fármaco foi mais rápida na membrana de CS/PVA. Para as membranas com fármaco incorporado por *soaking*, o coeficiente de difusão e a constante cinética também são maiores para a membrana de CS/PVA, embora os perfis de libertação sejam muito semelhantes (Figura 44).

3.5.5. Membranas de base quitosano carregadas com partículas

Nesta secção apresentam-se os resultados dos perfis de libertação de fármaco, sendo o sistema base a membrana de CS/PVA (membrana 12). O motivo para a exclusão da membrana de CS-LA/PVA (membrana 13) deveu-se aos resultados da caracterização terem sido piores em comparação com a membrana de CS/PVA, nomeadamente o índice de refração ser inferior às lentes comerciais, a transmitância ser mais baixa, para comprimentos de onda entre 400 a 500 nm.

Micropartículas de silicone

O perfil de libertação da dexametasona a partir da membrana de CS/PVA, carregada com micropartículas de silicone, encontra-se na Figura 45.

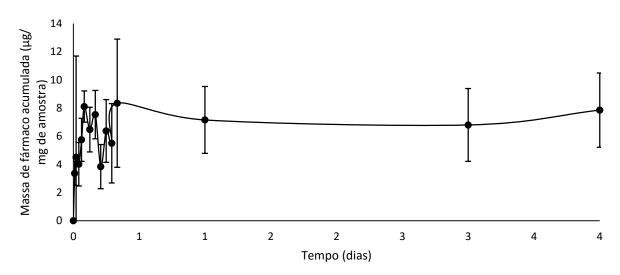


Figura 45 - Quantidade de dexametasona libertada, ao longo do tempo, em solução de lágrimas artificiais, a 37 °C, pela membrana de CS/PVA (membrana 12), carregada com partículas de silicone (barras de erro: desvio padrão; *n* = 3).

Como se pode verificar, o perfil de libertação de fármaco através das partículas de silicone apresentou-se muito irregular na fase inicial, existindo um desvio padrão elevado associado a cada ponto do gráfico. Como a introdução das partículas de silicone na solução polimérica foi feita a partir de uma suspensão dessas mesmas partículas, não é possível saber qual o rendimento de incorporação de fármaco no interior das partículas, pelo que o fármaco poderá estar apenas dissolvido no meio envolvente ou adsorvido à superfície das partículas. Assim, a libertação aqui estudada pode não se referir à libertação de fármaco através das partículas. Apesar disto, sabe-se que a dexametasona é pouco solúvel em água e, por isso, é

provável que o fármaco esteja encapsulado nas partículas de silicone. Dada a irregularidade e variabilidade do perfil de libertação de fármaco, a cinética deste sistema não foi estudada.

Nanopartículas de CS/PAA

A Figura 46 diz respeito à libertação de 21-fosfato dissódico de dexametasona a partir das membranas de CS/PVA carregadas com nanopartículas de quitosano/poli(ácido acrílico) (CS/PAA).

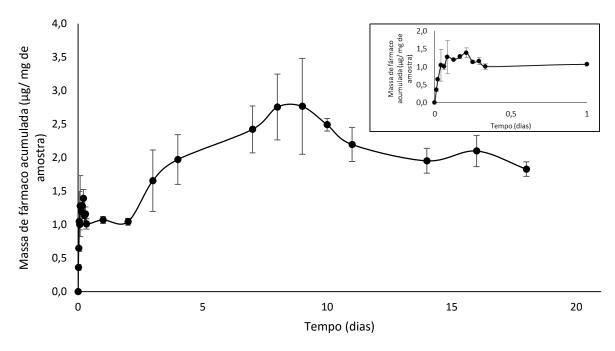


Figura 46 - Quantidade de 21-fosfato dissódico de dexametasona libertada a partir da membrana de CS/PVA (membrana 12), carregada com partículas de CS/PAA (fármaco no interior das partículas; barras de erro: desvio padrão; n=3). O gráfico menor representa uma ampliação do maior no 1º dia.

Quando o fármaco está encapsulado no interior das partículas, espera-se que haja um período de atraso na libertação. Ao contrário do que seria de esperar, ocorreu uma libertação elevada logo nas primeiras 5 horas, atingindo-se um *plateau* que durou até ao 2.º dia de libertação. A partir daí, voltou a haver libertação de fármaco até ao 9.º dia. Contudo, poderá haver uma explicação para este perfil de libertação: o fármaco poderá ter saído das partículas durante a preparação das membranas e também devido ao facto de ter havido um período de 5 dias entre a preparação da membrana e o estudo de libertação do fármaco. Este período de tempo poderá ter permitido ao fármaco ir migrando das nanopartículas para a membrana. Assim, a primeira curva poderá corresponder à libertação do fármaco que estaria na membrana e a segunda curva à libertação do fármaco que estaria no interior das nanopartículas. Uma vez

que este perfil de libertação apresentava duas partes, procurou-se tratá-las separadamente. As representações gráficas dos modelos podem ser consultadas no Anexo B, Figuras B.5 e B.6 e o valor de R² para os vários modelos encontra-se na Tabela 17.

Tabela 17 - Coeficiente de correlação linear (R²) obtido através da linearização dos modelos matemáticos para o perfil de libertação de 21-fosfato dissódico de dexametasona a partir da membrana de CS/PVA, com nanopartículas de CS/PAA (fármaco no interior das partículas).

na		Modelo			
Membrana	Composição	Korsmeyer-	Ordem	Primeira	Higyahi
Men		Peppas	Zero	Ordem	Higuchi
		Primeira Libertação (até às 6 horas)			
	20/ 53 0050/ 11 1 20/ 771		0,6816	0,5658	0,8888
12	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA	Segunda 1	Libertação	(a partir do	2° dia)
			0,9242	0,8541	0,9578

Na primeira parte do perfil de libertação, o modelo de Korsmeyer-Peppas não pôde ser testado por não haver pontos suficientes até aos 60% da libertação. Nenhum dos outros modelos se ajustou aos pontos experimentais, dado os valores de R² obtidos serem inferiores a 0,9. É possível que o modelo que não pôde ser testado (Korsmeyer-Peppas) fosse aquele que se ajustaria aos resultados. Na segunda parte do perfil de libertação, o modelo de Korsmeyer-Peppas também não pôde ser testado por existirem apenas 3 pontos até aos 60% desta parte do perfil, sendo o modelo de Higuchi o que melhor se ajustou (Tabela 17). Assim, dada a impossibilidade de testar todos os modelos considerados, nada se pôde inferir relativamente a qual dos modelos melhor descreve as duas partes da libertação.

Foi também realizado o estudo do sistema que continha o fármaco no interior das nanopartículas e na própria membrana, de modo a comparar com o sistema sem a presença de nanopartículas. A representação da cinética de libertação de 21-fosfato dissódico de dexametasona a partir da membrana CS/PVA, carregada com nanopartículas de CS/PAA, encontra-se na Figura 47.

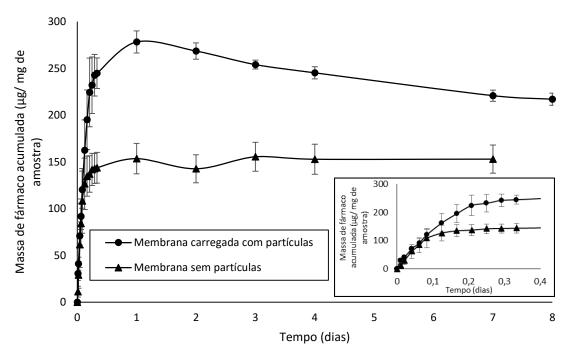


Figura 47 - Quantidade de 21-fosfato dissódico de dexametasona libertada pela membrana de CS/PVA carregada com partículas de CS/PAA (fármaco no interior das partículas e incorporado na membrana, por *soaking*; barras de erro: desvio padrão; n=3). O gráfico menor representa uma ampliação do maior no 1º dia.

No sistema carregado com partículas verifica-se uma rápida libertação de fármaco nas primeiras 3 horas, que deverá corresponder a fármaco com origem na matriz da membrana, após as quais, existe uma libertação mais lenta até às 24 horas, que poderá corresponder à saída de fármaco do interior das partículas e do interior da matriz. Terminado esse período a quantidade de fármaco decai, parecendo indicar que a membrana estará a reabsorver fármaco até conseguir atingir um equilíbrio.

Sabendo que a concentração da solução de fármaco para a incorporação nas membranas foi igual e que o tempo de submersão da lente foi o mesmo, verifica-se que a membrana com partículas tem maior capacidade de incorporação e libertação do fármaco. Assim, a presença de partículas com fármaco no interior de uma matriz que também contém fármaco permite aumentar a quantidade de fármaco libertado.

Por fim, foi realizado o ajuste dos modelos matemáticos ao sistema em estudo, tendose obtido as representações gráficas, presentes no Anexo B, Figura B.7 e os valores do coeficiente de correlação presentes na Tabela 18.

Tabela 18 - Coeficiente de correlação linear (R²) obtido através da linearização dos modelos matemáticos para o perfil de libertação de 21-fosfato dissódico de dexametasona a partir da membrana de CS/PVA, com nanopartículas de CS/PAA (fármaco no interior das partículas e incorporado na membrana).

na		Modelo			
Membrana	Composição	Korsmeyer-	Ordem	Primeira	Higuchi
Men		Peppas	Zero	Ordem	Higuciii
12	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA	0,9867	0,8948	0,3898	0,9709

Os modelos que apresentaram o coeficiente de correlação mais elevado foram o de Korsmeyer-Peppas e de Higuchi (Tabela 18). Através do declive da reta obtida por regressão linear, pelo modelo de Korsmeyer-Peppas, obteve-se o valor do parâmetro $n \cong 0,7$, em que o mecanismo de transporte associado a este valor é não Fickiano do tipo transporte anómalo. Isto significa que a cinética de transporte do fármaco é uma combinação de dois mecanismos: difusão e transporte do tipo Caso II, uma vez que as taxas de difusão e relaxação são aproximadas. O modelo de Higuchi também se poderá aplicar, neste caso, a difusão dependente da raiz quadrada do tempo, no entanto, era de esperar que o parâmetro n do modelo de Korsmeyer-Peppas fosse mais próximo de 0,5, pois é este o valor que representa o modelo de Higuchi. Os parâmetros cinéticos do modelo de Korsemeyer-Peppas encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19 - Coeficiente de difusão aparente e constante cinética, k, obtidos através do modelo de Korsmeyer-Peppas, para o perfil de libertação de 21-fosfato dissódico de dexametasona da membrana de CS/PVA, com nanopartículas de CS/PAA (fármaco no interior das partículas e incorporado na membrana).

Membrana	Composição	Coeficiente de difusão aparente (m²/s)	k (s ⁻¹)
12	2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA	2,0×10 ⁻¹⁷	2,5×10 ⁻⁵

Comparando estes parâmetros com os da membrana de CS/PVA sem partículas, com fármaco incorporado por *soaking* (Tabela 16), observa-se que o coeficiente de difusão aparente e a constante *k* da libertação da membrana com partículas são menores, concluindo que a libertação de fármaco é mais lenta a partir da membrana de CS/PVA com nanopartículas de CS/PAA.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHO FUTURO

Nesta dissertação foram preparados 15 tipos de membranas de base quitosano com concentrações de 1 e 2% (m/v) deste polímero, com o objetivo de preparar um sistema para ser usado no olho como lente de contacto ou como inserção ocular, que permita uma libertação de fármaco constante durante um período de tempo prolongado. Estudou-se o efeito do uso de um reticulante (glioxal ou glutaraldeído), da modificação do quitosano com ácido lático e da adição de PVA. As membranas com 2% de quitosano foram as que permitiram um fácil manuseio e o uso do reticulante permitiu evitar a dissolução em água, que se verificou para as membranas preparadas na ausência de reticulante. Assim, membranas preparadas com 1% de quitosano e/ou não reticuladas foram excluídas dos estudos subsequentes. Estudou-se também a influência da concentração do reticulante glioxal na absorção de água pelas membranas, concluindo-se que a melhor concentração era 0,05% (v/v). Assim, foram selecionadas apenas duas membranas para os estudos subsequentes de caracterização e incorporação de fármaco: a membrana de quitosano e PVA reticulada com glioxal (CS/PVA; membrana 12) e a membrana de quitosano modificado com ácido lático e contendo PVA, reticulada com glioxal (CS-LA/PVA; membrana 13). A caracterização das membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA revelou que, atendendo ao valor do índice de refração e da transmitância, a membrana de CS/PVA é a mais indicada para ser utilizada como lente de contacto, já que apresenta um índice de refração e uma transmitância próximos dos valores de lentes de contacto comerciais. A goniometria de ângulos de contacto mostrou que sua superfície é hidrofóbica, enquanto que a da membrana de CS-LA/PVA é hidrofílica. Na análise de DMTA verificou-se que a membrana de CS-LA/PVA apresentou uma $T_{\rm g}$ baixa, muito próxima da temperatura média da córnea (~ 35 °C), enquanto que as lentes de contacto comerciais apresentam valores de T_g bastante acima dos 35 °C. A membrana de CS/PVA apresentou uma T_g de aproximadamente 54 °C, superior à da membrana de CS-LA/PVA. O módulo de armazenamento mostrou que, à temperatura ambiente e à temperatura média da córnea, a membrana de CS/PVA é mais rígida que a de CS-LA/PVA.

Quando o fármaco foi incorporado por oclusão, os resultados mostraram libertações rápidas, sendo que o perfil de fármaco libertado a partir da membrana de CS-LA/PVA atingiu

o equilíbrio mais cedo do que a partir da membrana de CS/PVA, libertando esta última mais fármaco. Já na incorporação por soaking, a libertação foi igualmente rápida mas as membranas de CS/PVA e de CS-LA/PVA apresentaram um perfil de libertação semelhante. Foram testados os modelos matemáticos para as cinéticas de libertação, onde o modelo de Korsmeyer-Peppas foi o que se ajustou melhor a todos os perfis de libertação. O sistema com partículas de silicone apresentou um perfil de libertação irregular, não sendo possível o ajuste de um modelo matemático. Já o sistema com nanopartículas de CS/PAA, com fármaco incorporado por oclusão, apresentou um perfil de libertação com duas partes, onde não foi possível testar o modelo de Korsmeyer-Peppas. Os restantes modelos não se ajustaram aos pontos experimentais da primeira parte e o modelo de Higuchi foi o que melhor se ajustou à segunda parte do perfil de libertação. Para o sistema de nanopartículas de CS/PAA, com fármaco incorporado por oclusão e soaking, o coeficiente de correlação foi mais elevado para os modelos de Higuchi e Korsmeyer-Peppas, contudo o valor parâmetro *n* do modelo de Korsmeyer-Peppas foi diferente daquele que deveria corresponder ao modelo de Higuchi. Conclui-se ainda que a membrana com partículas de CS/PAA, com fármaco incorporado por soaking e ocluso nas nanopartículas, apresentou uma libertação mais lenta e maior do que a membrana sem partículas.

Efetuado este estudo, é possível concluir que nenhuma das membranas preparadas constitui um sistema de libertação perfeito, dado a libertação não ocorrer durante um período de tempo constante e prolongado, como inicialmente pretendido. O sistema com o tempo de libertação mais longo foi a membrana de CS/PVA com nanopartículas de CS/PAA e fármaco ocluso nestas, libertando fármaco até ao 9º dia, embora esta libertação não tenha sido contínua, pois não houve libertação a partir das 5 horas até ao 2º dia. Importa referir que a preparação destes sistemas foi feita de raiz e, por isso, seria ainda necessário estudar em separado o efeito de diversas variáveis na libertação de fármaco, como o grau de reticulação, o conteúdo de água e a espessura da membrana.

Como sugestões de trabalho futuro, de modo a aumentar-se o tempo de libertação de fármaco, poder-se-á modificar ou revestir a superfície das membranas, de modo a criar barreiras à difusão do fármaco, levando a uma libertação gradual do medicamento no olho.

Seria vantajoso repetir os estudos de libertação das membranas sem partículas, mas determinando a massa de fármaco contida nas membranas, bem como utilizando soluções de fármaco com a mesma concentração no carregamento por oclusão e por *soaking*, de modo a permitir uma comparação da eficiência de incorporação e libertação do fármaco. Também seria vantajoso comparar a libertação a partir de membranas com/sem nano/micropartículas contendo a mesma massa de fármaco.

Para uma futura abordagem destes sistemas aconselha-se a utilizar quitosano purificado ou lavá-lo previamente, de forma a este clarear e, assim, aumentar a transmitância das membranas.

Um dos fatores importantes para o uso de lentes de contacto de uso prolongado é a sua transmissibilidade ao oxigénio, por isso o estudo desta propriedade seria importante e também seria interessante verificar a influência que a hidratação da membrana pode ter nalgumas propriedades estudadas.

CAPÍTULO 5

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] C. Le Bourlais, L. Acar, H. Zia, P. A. Sado, T. Needham, and R. Leverge, "Ophthalmic drug delivery systems Recent advances," *Prog. Retin. Eye Res.*, 17, 33–58, 1998.
- [2] P. Fitzgerald and C. G. Wilson, "Polymeric systems for ophthalmic drug delivery," in *Polymeric Biomaterials*, Dumitriu S., Marcel Dekker, New York, 1994, 373–398.
- [3] L. Xinming, C. Yingde, A. W. Lloyd, S. V. Mikhalovsky, S. R. Sandeman, C. a. Howel, and L. Liewen, "Polymeric hydrogels for novel contact lens-based ophthalmic drug delivery systems: A review," *Contact Lens Anterior Eye*, 31, 57–64, 2008.
- [4] R. Galante, P. Paradiso, G. M. Moutinho, A. I. Fernandes, J. L. Mata, R. Colaço, B. Saramago, and P. Serro, "Libertação de Levofloxacina a Partir de Um Hidrogel à Base de PHEMA: Uma Contribuição para o Desenvolvimento de Lentes de Contacto Terapêuticas Contendo Fármacos," *Oftalmologia*, 36, 237–244, 2012.
- [5] X. Hu, J. Qiu, H. Tan, D. Li, and X. Ma, "Synthesis and Characterization of Cyclodextrin-containing Hydrogel for Ophthalmic Drugs Delivery," *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.*, 50, 983–990, 2013.
- [6] "Grupo Retina São Paulo." [Online]. Available: http://www.gruporetina.org.br/olho.htm. [Accessed: 18-Jul-2015].
- [7] I. A. Sogias, A. C. Williams, and V. V. Khutoryanskiy, "Why is chitosan mucoadhesive?," *Biomacromolecules*, 9, 1837–1842, 2008.
- [8] M. F. Refojo, "Application of Materials in Medice and Dentistry: Ophthalmologic Applications," in *Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine*, B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, Eds. Academic Press, California, 1996, 228–334.
- [9] K. Manish and G. T. Kulkarni, "Recent Advances in Ophthalmic Drug Delivery Systems," 4, 387–394, 2012.
- [10] R. Roithmann, T. Burman, and P. J. Wormald, "Endoscopic dacryocystorhinostomy,"

- Braz. J. Otorhinolaryngol., 78, 113–121, 2012.
- [11] I. K. Reddy, Ed., Ocular Therapeutics and Drug Delivery: A multi-disciplinary approach, 1st ed. CRC Press, Lancaster, Pennsylvania, 1995.
- [12] R. Gaudana, J. Jwala, S. H. S. Boddu, and A. K. Mitra, "Recent perspectives in ocular drug delivery," *Pharm. Res.*, 26, 1197–1216, 2009.
- [13] J. V. Forrester, A. D. Dick, P. G. McMenamin, F. Roberts, and E. Pearlman, *The Eye: Basic Sciences in Practice*, 4th ed. Elsevier, China, 2015.
- [14] D. Gulsen and A. Chauhan, "Dispersion of microemulsion drops in HEMA hydrogel: A potential ophthalmic drug delivery vehicle," *Int. J. Pharm.*, 292, 95–117, 2005.
- [15] A. Kumari, P. K. Sharma, V. K. Garg, and G. Garg, "Ocular inserts Advancement in therapy of eye diseases," *J. Adv. Pharm. Technol. Res.*, 1, 291–296, 2010.
- [16] R. M. Mainardes, M. C. C. Urban, P. O. Cinto, N. M. Khalil, M. V. Chaud, R. C. Evangelista, and M. P. D. Gremiao, "Colloidal carriers for ophthalmic drug delivery," *Curr. Drug Targets*, 6, 363–371, 2005.
- [17] K. K. Jain, "Drug Delivery Systems An Overview," *Methods Mol. Biol.*, 437, 1–50, 2008.
- [18] J. S. Henrique, R. S. Falcare, and P. S. Lopes, "Sistemas de liberação controlada," *Pharmacia Brasileira*, 56, 22, 2006.
- [19] D. Paolino, M. Fresta, P. Sinha, and M. Ferrari, "Principles of Controlled Drug Delivery," in *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*, 2nd ed., J. G. Webster, Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 2006, 437–495.
- [20] M. L. Friedberg, U. Pleyer, and B. J. Mondino, "Device drug delivery to the eye. Collagen shields, iontophoresis, and pumps," *Ophthalmology*, 98, 725–32, 1991.
- [21] F. D. S. Rouxinol, "Preparação de nanopartículas para sistemas de libertação controlada de substâncias activas usadas no tratamento de doenças oftalmológicas," Tese de mestrado em Engenharia Biomédica, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, 2009.
- [22] I. Zaki, P. Fitzgerald, J. G. Hardy, and C. G. Wilson, "A comparison of the effect of viscosity on the precorneal residence of solutions in rabbit and man," *J. Pharm. Pharmacol.*, 38, 463–466, 1986.

- [23] N. M. Davies, S. J. Fair, J. Hadgraft, and I. W. Kellaway, "Evaluation of Mucoadhesive Polymers in Ocular Drug Delivery. I. Viscous Solutions," *Pharm. Res.*, 8, 1039–1043.
- [24] J. L. Greaves and C. G. Wilson, "Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 11, 349–383, Sep. 1993.
- [25] T. Harmia, P. Speiser, and J. Kreuter, "A solid colloidal drug delivery system for the eye: encapsulation of pilocarpin in nanoparticles," *J. Microencapsul.*, 3, 3–12, Jan. 2008.
- [26] C. Losa, P. Calvo, E. Castro, J. L. Vila-Jato, and M. J. Alonso, "Improvement of Ocular Penetration of Amikacin Sulphate by Association to Poly(butylcyanoacrylate) Nanoparticles," *J. Pharm. Pharmacol.*, 43, 548–552, Aug. 1991.
- [27] P. Calvo, A. Sánchez, J. Martínez, M. I. López, M. Calonge, J. C. Pastor, and M. J. Alonso, "Polyester Nanocapsules as New Topical Ocular Delivery Systems for Cyclosporin A," *Pharm. Res.*, 13, 311–315, 1996.
- [28] C. Losa, L. Marchal-Heussler, F. Orallo, J. L. Vila Jato, and M. J. Alonso, "Design of new formulations for topical ocular administration: polymeric nanocapsules containing metipranolol," *Pharm. Res.*, 10, 80–7, Jan. 1993.
- [29] Y. Kapoor, J. C. Thomas, G. Tan, V. T. John, and A. Chauhan, "Surfactant-laden soft contact lenses for extended delivery of ophthalmic drugs," *Biomaterials*, 30, 867–878, 2009.
- [30] D. Gulsen and A. Chauhan, "Ophthalmic drug delivery through contact lenses," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 45, 2342–2347, 2004.
- [31] A. Danion, H. Brochu, Y. Martin, and P. Vermette, "Fabrication and characterization of contact lenses bearing surface-immobilized layers of intact liposomes," *J. Biomed. Mater. Res. A*, 82, 41–51, Jul. 2007.
- [32] E. J. Ellis and J. C. Salamone, "Contact lens with a hydrophilic, polyelectrolyte complex coating and method for forming same," US4168112 A, 18-Sep-1979.
- [33] Y. Wang, X. Qian, X. Zhang, W. Xia, L. Zhong, Z. Sun, and J. Xia, "Plasma surface modification of rigid contact lenses decreases bacterial adhesion," *Eye Contact lLns*, 39, 376–80, Nov. 2013.
- [34] C. C. Peng, M. T. Burke, B. E. Carbia, C. Plummer, and A. Chauhan, "Extended drug delivery by contact lenses for glaucoma therapy," *J. Control. release*, 162, 152–8, Aug. 2012.

- [35] C.-C. Peng, J. Kim, and A. Chauhan, "Extended delivery of hydrophilic drugs from silicone-hydrogel contact lenses containing vitamin E diffusion barriers," *Biomaterials*, 31, 4032–47, May 2010.
- [36] K. H. Hsu, B. E. Carbia, C. Plummer, and A. Chauhan, "Dual drug delivery from vitamin E loaded contact lenses for glaucoma therapy," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 94, 312–321, Jun. 2015.
- [37] J. F. R. Santos, R. Couceiro, A. Concheiro, J. J. Torres-Labandeira, and C. Alvarez-Lorenzo, "Poly(hydroxyethyl methacrylate-co-methacrylated-B-cyclodextrin) hydrogels: Synthesis, cytocompatibility, mechanical properties and drug loading/release properties," *Acta Biomater.*, 4, 745–755, 2008.
- [38] H. Hiratani, A. Fujiwara, Y. Tamiya, Y. Mizutani, and C. Alvarez-Lorenzo, "Ocular release of timolol from molecularly imprinted soft contact lenses," *Biomaterials*, 26, 1293–8, Apr. 2005.
- [39] H. Hiratani, Y. Mizutani, and C. Alvarez-Lorenzo, "Controlling drug release from imprinted hydrogels by modifying the characteristics of the imprinted cavities," *Macromol. Biosci.*, 5, 728–33, Aug. 2005.
- [40] K. P. S. Kumar, D. Bhowmik, G. Harish, S. Duraivel, and B. Pragathi, "Ocular Inserts: A Novel Controlled Drug Delivery System," *Pharma Innov.*, 1, 1–16, 2012.
- [41] P. W. J. Morrison and V. V Khutoryanskiy, "Advances in ophthalmic drug delivery," *Ther. Deliv.*, 5, 1297–1315, 2014.
- [42] P. M. A. Coimbra, "Preparação e caracterização de sistemas de libertação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural," Tese de Doutoramento, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, 2010.
- [43] W. W. Yang and E. Pierstorff, "Reservoir-Based Polymer Drug Delivery Systems," *J. Lab. Autom.*, 17, 50–58, 2012.
- [44] M. R. Shaik, M. Korsapati, and D. Panati, "Polymers in Controlled Drug Delivery Systems," *Int. J. Pharma Sci.*, 2, 112–116, 2012.
- [45] A. Siew, "Controlling Drug Release Through Osmotic Systems," *Pharm. Technol.*, 37, 40–44, 2013.
- [46] D. L. Wise, Ed., Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology. CRC Press, USA, 2000.

- [47] M. L. Noble, "Drug Delivery Systems." [Online]. Available: http://www.uweb.engr.washington.edu/research/tutorials/drugdelivery.html. [Accessed: 04-Jul-2015].
- [48] M. A. Meyers, P.-Y. Chen, A. Y.-M. Lin, and Y. Seki, "Biological materials: Structure and mechanical properties," *Prog. Mater. Sci.*, 53, 1–206, 2008.
- [49] F. Shahidi, J. K. V. Arachchi, and Y. J. Jeon, "Food applications of chitin and chitosans," *Trends Food Sci. Technol.*, 10, 37–51, 1999.
- [50] Y. Pranoto, S. K. Rakshit, and V. M. Salokhe, "Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin," *LWT Food Sci. Technol.*, 38, 859–865, 2005.
- [51] M. J. Alonso and A. Sánchez, "The potential of chitosan in ocular drug delivery," *J. Pharm. Pharmacol.*, 55, 1451–1463, 2003.
- [52] J. F. Fundo, M. a C. Quintas, and C. L. M. Silva, "Influence of film forming solutions on properties of chitosan / glycerol films," in *ICEF 11 11th International Congress on Engineering and Food: Food Process Engineering in a Changing World (Proceedings)*, 2011, 963–964.
- [53] W. G. Markey, L. M. Bowman, and M. V. W. Bergamini, "Contact lenses made of chitosan," in *Chitin and chitosan: sources, chemistry and biochemisty, physical properties and applications*, G. Skjak-Braek, P. Antonsen, and P. Sanford, Eds. Elsevier Applied Science, London, 1989, 713–717.
- [54] K. N. Sall, J. K. Kreter, and R. H. Keates, "The effect of chitosan on corneal wound healing," *Ann. Ophthalmol.*, 19, 31–3, Jan. 1987.
- [55] O. Felt, A. Carrel, P. Baehni, P. Buri, and R. Gurny, "Chitosan as tear substitute: a wetting agent endowed with antimicrobial efficacy," *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 16, 261–70, Jun. 2000.
- [56] O. Felt, P. Furrer, J. M. Mayer, B. Plazonnet, P. Buri, and R. Gurny, "Topical use of chitosan in ophthalmology: Tolerance assessment and evaluation of precorneal retention," *Int. J. Pharm.*, 180, 185–193, 1999.
- [57] I. Henriksen, K. L. Green, J. D. Smart, G. Smistad, and J. Karlsen, "Bioadhesion of hydrated chitosans: An in vitro and in vivo study," *Int. J. Pharm.*, 145, 231–240, 1996.
- [58] A. M. De Campos, A. Sánchez, R. Gref, P. Calvo, and M. J. Alonso, "The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa," *Eur. J. Pharm. Sci.*, 20, 73–81, 2003.

- [59] G. Di Colo, Y. Zambito, S. Burgalassi, a. Serafini, and M. F. Saettone, "Effect of chitosan on in vitro release and ocular delivery of ofloxacin from erodible inserts based on poly(ethylene oxide)," *Int. J. Pharm.*, 248, 115–122, 2002.
- [60] I. Genta, B. Conti, P. Perugini, F. Pavanetto, A. Spadaro, and G. Puglisi, "Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir," *J. Pharm. Pharmacol.*, 49, 737–42, Aug. 1997.
- [61] A. E. De Salamanca, Y. Diebold, M. Calonge, C. García-Vazquez, S. Callejo, A. Vila, and M. J. Alonso, "Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: Toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47, 1416–1425, 2006.
- [62] A. M. De Campos, A. Sánchez, and M. J. Alonso, "Chitosan nanoparticles: A new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A," *Int. J. Pharm.*, 224, 159–168, 2001.
- [63] J. Dong and G. D. Haugstad, "Tribology study of PVA contact lens in ionic aqueous environments." Institute of Technology, University of Minnesota, Minneapolis.
- [64] Eastman Chemical Company, "Butvar® polyvinyl butyral resin: Properties and uses." [Online]. Available: http://www.butvar.com/pdfs/en/butvar_properties_and_uses.pdf.
- [65] P. Holister, J.-W. Weener, C. R. Vas, and T. Harper, "Nanoparticles Technology White Papers," *Científica*, 3, 1–11, 2003.
- [66] M. L. Hans and a. M. Lowman, "Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting," *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 6, 319–327, 2002.
- [67] S. K. Sahoo and V. Labhasetwar, "Nanotech approaches to drug delivery and imaging," *Drug Discov. Today*, 8, 1112–1120, 2003.
- [68] R. C. Nagarwal, S. Kant, P. N. Singh, P. Maiti, and J. K. Pandit, "Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery," *J. Control. Release*, 136, 2–13, 2009.
- [69] A. Ludwig, "The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 1595–639, Nov. 2005.
- [70] P. M. B. de S. Coelho, "Desenvolvimento de formulações de libertação modificada de ranitidina," Tese de Doutoramento, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, 2007.

- [71] N. A. Peppas and L. Brannon-Peppas, "Water diffusion and sorption in amorphous macromolecular systems and foods," *J. Food Eng.*, 22, 189–210, Jan. 1994.
- [72] J. Crank, *The Mathematics of Diffusion*, 2nd ed. Oxford University Press, Bristol, 1975.
- [73] S. Dash, P. N. Murthy, L. Nath, and P. Chowdhury, "Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems," *Acta Pol. Pharm.*, 67, 217–23, 2010.
- [74] P. L. Ritger and N. A. Peppas, "A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices," *J. Control. Release*, 5, 37–42, Jun. 1987.
- [75] C. M. Lopes, J. M. S. Lobo, and P. Costa, "Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrifílicos," *Rev. Bras. Ciências Farm.*, 41, 143–154, 2005.
- [76] P. J. C. Da Costa, "Avaliação in vitro da lioequivalência de formulações farmacêuticas," *Rev. Bras. Ciências Farm.*, 38, 141–153, 2002.
- [77] P. Stoica, "Model-order selection: a review of information criterion rules," *IEEE Signla Process. Mag.*, 21, 36–47, 2004.
- [78] Sigma Aldrich, "Dexamethasone 21-phosphate disodium salt ≥98%." [Online]. Available: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d1159?lang=pt®ion=PT. [Accessed: 14-Jul-2015].
- [79] Sigma Aldrich, "Dexamethasone powder, BioReagent, suitable for cell culture, ≥97%."
 [Online]. Available: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d4902?lang=pt®ion=PT.
 [Accessed: 21-Jul-2015].
- [80] DrugBank, "Dexamethasone." [Online]. Available: http://www.drugbank.ca/drugs/DB01234. [Accessed: 07-Aug-2015].
- [81] MedicinaNET, "Dexametasona." [Online]. Available: http://www.medicinanet.com.br/bula/1849/dexametasona.htm. [Accessed: 07-Aug-2015].
- [82] Q. Yang, F. Dou, B. Liang, and Q. Shen, "Studies of cross-linking reaction on chitosan fiber with glyoxal," *Carbohydr. Polym.*, 59, 205–210, Jan. 2005.
- [83] V. L. Gonçalves, M. C. M. Laranjeira, V. T. Fávere, and R. C. Pedrosa, "Effect of

- crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium," *Polímeros*, 15, 6–12, Mar. 2005.
- [84] E. Marin, J. Rojas, and Y. Ciro, "A review of polyvinyl alcohol derivatives: Promising materials for pharmaceutical and biomedical applications," *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 8. Academic Journals, 674–684, 29-Jun-2014.
- [85] M. Joullié and K. Lassen, "Evolution of amide bond formation," *Arkivoc*, 8, 189–250, 2010.
- [86] M. A. Marcus, K. J. Hadcock, D. S. Gibson, M. E. Herbrand, and F. V. Ignatovich, "Precision interferometric measurements of refractive index of polymers in air and liquid," in *SPIE Optifab*, 2013, 88841L.
- [87] N. A. Brennan, N. Efron, B. A. Weissman, and M. G. Harris, "Clinical application of the oxygen transmissibility of powered contact lenses," *CLAO J.*, 17, 169–72, Jul. 1991.
- [88] E. A. Vogler, "Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces," *Adv. Colloid Interface Sci.*, 74, 69–117, Feb. 1998.
- [89] D. Jain, E. Carvalho, and R. Banerjee, "Biodegradable hybrid polymeric membranes for ocular drug delivery," *Acta Biomater.*, 6, 1370–9, Apr. 2010.
- [90] F. Yañez, L. Martikainen, M. E. M. Braga, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, C. M. M. Duarte, M. H. Gil, and H. C. de Sousa, "Supercritical fluid-assisted preparation of imprinted contact lenses for drug delivery," *Acta Biomater.*, 7, 1019–30, Mar. 2011.
- [91] G. M. Bruinsma, M. Rustema-Abbing, J. de Vries, B. Stegenga, H. C. van der Mei, M. L. van der Linden, J. M. M. Hooymans, and H. J. Busscher, "Influence of Wear and Overwear on Surface Properties of Etafilcon A Contact Lenses and Adhesion of Pseudomonas aeruginosa," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43, 3646–3653, Dec. 2002.
- [92] M. Lira, "Uso de lentes de contacto: deterioração das suas propriedades e alterações fisiológicas associadas," Tese de doutoramento em Ciências, Universidade do Minho, 2007.
- [93] P. Paradiso, R. Galante, L. Santos, A. P. Alves de Matos, R. Colaço, A. P. Serro, and B. Saramago, "Comparison of two hydrogel formulations for drug release in ophthalmic lenses," *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, 102, 1170–80, Aug. 2014.
- [94] F. Fornasiero, F. Krull, J. M. Prausnitz, and C. J. Radke, "Steady-state diffusion of water through soft-contact-lens materials," *Biomaterials*, 26, 5704–16, Oct. 2005.

- [95] Y. Hu, X. Jiang, Y. Ding, H. Ge, Y. Yuan, and C. Yang, "Synthesis and characterization of Chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles," *Biomaterials*, 23, 3193–3201, 2002.
- [96] A. P. Vieira, P. Ferreira, J. F. J. Coelho, and M. H. Gil, "Photocrosslinkable starch-based polymers for ophthalmologic drug delivery," *Int. J. Biol. Macromol.*, 43, 325–332, 2008.
- [97] S. L. McArthur, K. M. McLean, H. a W. St. John, and H. J. Griesser, "XPS and surface-MALDI-MS characterisation of worn HEMA-based contact lenses," *Biomaterials*, 22, 3295–3304, 2001.
- [98] A. N. Bashkatov and E. A. Genina, "Water refractive index in dependence on temperature and wavelength: a simple approximation," in *Saratov Fall Meeting 2002: Optical Technologies in Biophysics and Medicine IV*, 2003, 393–395.
- [99] C. M. T. Alves, "Influência da degradação termo-oxidativa nas propriedades das lentes de contacto," Dissertação de Mestrado em Optometria Avançada, Universidade do Minho, 2012.
- [100] L. Moore and J. T. Ferreira, "Ultraviolet (UV) transmittance characteristics of daily disposable and silicone hydrogel contact lenses," *Contact Lens Anterior Eye*, 29, 115–122, Jul. 2006.
- [101] O. W. Guirguis and M. T. H. Moselhey, "Thermal and structural studies of poly (vinyl alcohol) and hydroxypropyl cellulose blends," *Nat. Sci.*, 4, 57–67, 2012.
- [102] A. Lazaridou and C. G. Biliaderis, "Thermophysical properties of chitosan, chitosan—starch and chitosan—pullulan films near the glass transition," *Carbohydr. Polym.*, 48, 179–190, May 2002.
- [103] M. Tká, J. Živ, and P. Foffová, "A Reference for Human Eye Surface Temperature Measurements in Diagnostic Process of Ophthalmologic Diseases," 406–409, 2011.
- [104] J. Bergin, "Contact Lens Polymers: A technical overview of the development, manufacturing, and future of contact lenses," Department of Chemical Engineering State University of New York, Buffalo, 2000.
- [105] K. Sakurai, "Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends," *Polymer (Guildf).*, 41, 7051–7056, Sep. 2000.
- [106] F. S. Kittur, K. V. Harish Prashanth, K. Udaya Sankar, and R. N. Tharanathan, "Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry," *Carbohydr. Polym.*, 49, 185–193, Aug. 2002.

ANEXOS

Anexo A - Partículas de CS/PAA e de silicone

Tabela A.1 - Concentrações e respetivas absorvâncias utilizadas na obtenção das curvas de calibração da dexametasona e de 21-fosfato dissódico de dexametasona.

Dexametasona			21-Fosfato dissódico de dexametasona	
Solução	C (µg/mL)	A 242	C (µg/mL)	A_{242}
-	0	0	0	0
1	5	0,1601	1	0,0348
2	10	0,3204	5	0,1467
3	15	0,4986	10	0,2847
4	20	0,6850	20	0,5430
5	25	0,8762	35	0,9439
6	30	1,0367	-	-

$Anexo \ B-Ajuste \ do \ perfil \ de \ libertação \ do \ fármaco \ aos \ modelos \\ matemáticos$

Membrana de CS/PVA (membrana 12: 2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA), fármaco incorporado por oclusão:

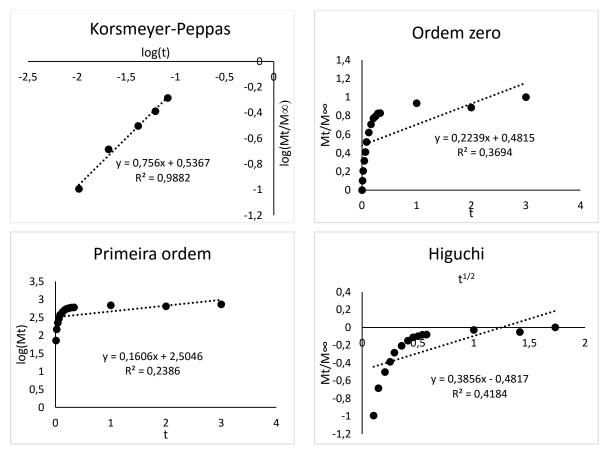


Figura B.1 - Representação gráfica dos modelos de Korsmeyer-Peppas, ordem zero, primeira ordem e de Higuchi para a membrana de CS/PVA, fármaco incorporado por oclusão.

Membrana de CS/PVA (membrana 12: 2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA), fármaco incorporado por *soaking*:

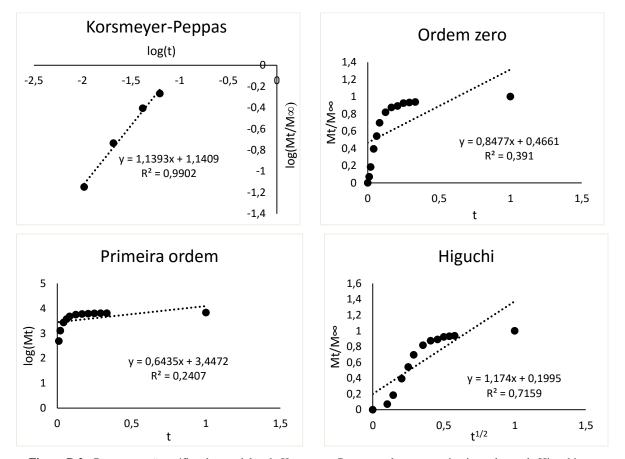


Figura B.2 - Representação gráfica dos modelos de Korsmeyer-Peppas, ordem zero, primeira ordem e de Higuchi para a membrana de CS/PVA, fármaco incorporado por *soaking*.

Membrana de CS-LA/PVA (membrana 13: 2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA + 0,05% CMC), fármaco incorporado por oclusão:

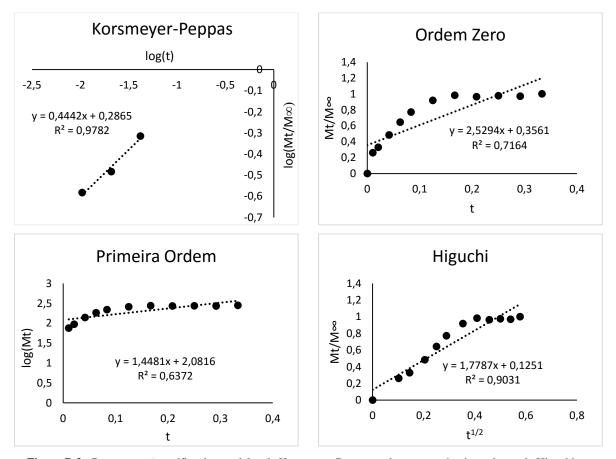


Figura B.3 - Representação gráfica dos modelos de Korsmeyer-Peppas, ordem zero, primeira ordem e de Higuchi para a membrana de CS-LA/PVA, fármaco incorporado por oclusão.

Membrana de CS-LA/PVA (membrana 13: 2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA + 0,05% CMC), fármaco incorporado por *soaking*:

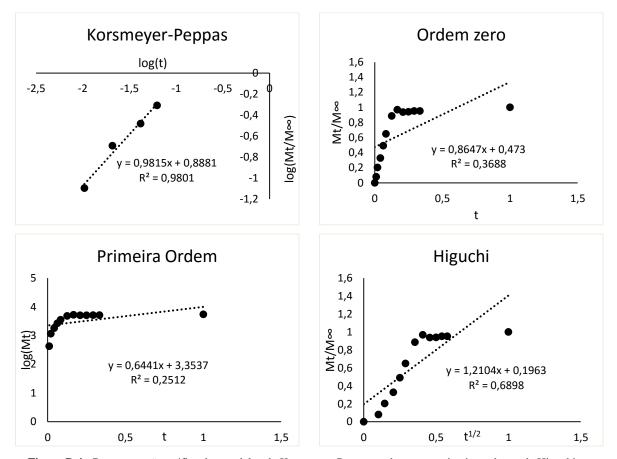


Figura B.4 - Representação gráfica dos modelos de Korsmeyer-Peppas, ordem zero, primeira ordem e de Higuchi para a membrana de CS-LA/PVA, fármaco incorporado por *soaking*.

 Membrana de CS/PVA (membrana 12: 2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA) carregada com nanopartículas de CS/PAA, fármaco no interior das partículas:

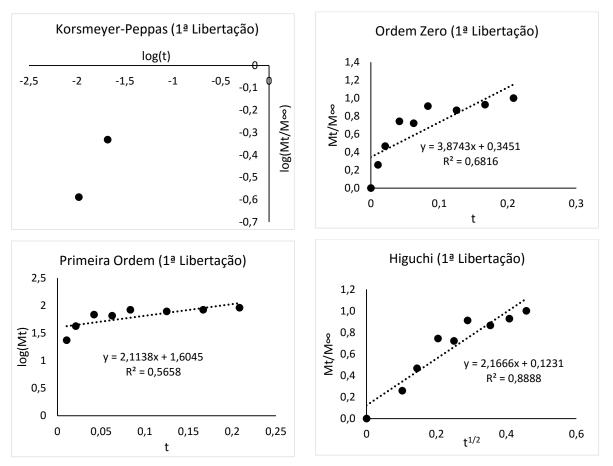


Figura B.5 - Representação gráfica dos modelos de ordem zero, primeira ordem e de Higuchi para a 1ª libertação de fármaco da membrana de CS/PVA, carregada com nanopartículas de CS/PAA (fármaco no interior das partículas). ¹

¹ O modelo de Korsmeyer-Peppas não foi testado, pois não existiram pontos suficientes (até aos 60%), para testá-lo.

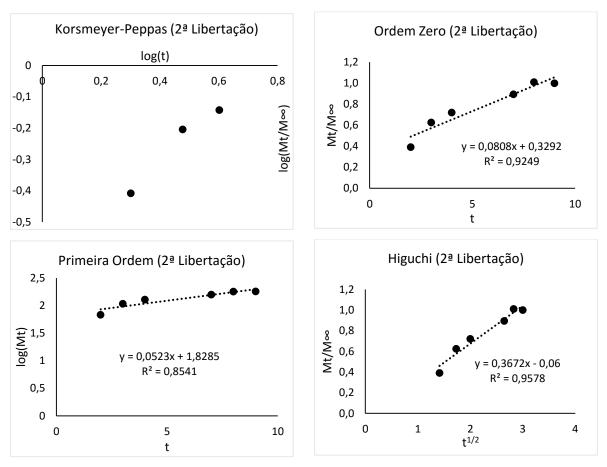


Figura B.6 - Representação gráfica dos modelos de ordem zero, primeira ordem e de Higuchi para a 2ª libertação de fármaco da membrana de CS/PVA, carregada com nanopartículas de CS/PAA (fármaco no interior das partículas). ¹

 $^{^{1} \ \}mathrm{O} \ \mathrm{modelo} \ \mathrm{de} \ \mathrm{Korsmeyer}\text{-Peppas} \ \mathrm{n\~{a}o} \ \mathrm{foi} \ \mathrm{testado}, \ \mathrm{pois} \ \mathrm{n\~{a}o} \ \mathrm{existiram} \ \mathrm{pontos} \ \mathrm{suficientes} \ \mathrm{(at\'{e}} \ \mathrm{aos} \ 60\%), \ \mathrm{para} \ \mathrm{test\'{a}-lo}.$

Membrana de CS/PVA (membrana 12: 2% CS + 0,05% glioxal + 2% PVA) carregada com nanopartículas de CS/PAA (fármaco no interior das partículas e incorporado na membrana por *soaking*):

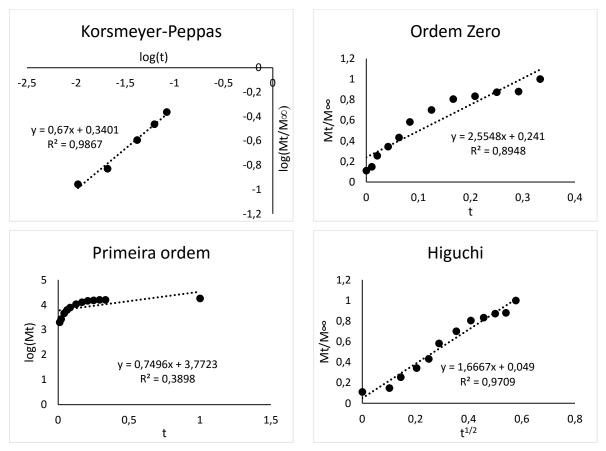


Figura B.7 - Representação gráfica dos modelos de Korsmeyer-Peppas, ordem zero, primeira ordem e de Higuchi para a membrana de CS/PVA carregada com nanopartículas de CS/PAA (fármaco no interior das partículas e incorporado na membrana por *soaking*).