



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Paula Sofia Dias de Oliveira

**OTIMIZAÇÃO DO PERFIL DE LIBERTAÇÃO DE  
FÁRMACOS DE UM INSERTO OCULAR DE  
BASE POLIMÉRICA**

**Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia  
Química, especialização em Biosistemas, orientada pelo Doutor  
Marcos João Mota Leite Machado Mariz e pela Doutora Patrícia de  
Jesus Pinto Alves e apresentada ao Departamento de Engenharia  
Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade  
de Coimbra.**

outubro de 2021



Paula Sofia Dias de Oliveira

**OTIMIZAÇÃO DO PERFIL DE LIBERTAÇÃO DE FÁRMACOS  
DE UM INSERTO OCULAR DE BASE POLIMÉRICA**

**Dissertação submetida à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de  
Coimbra para atribuição do grau de Mestre em Engenharia Química**

**Supervisores:**

Dr. Marcos Mota Leite Machado Mariz

Dra. Patrícia de Jesus Pinto Alves

Coimbra, outubro de 2021

1 2 9 0



**UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA**



# Agradecimentos

Começo por expressar a minha gratidão por aqueles que foram os cinco melhores e mais desafiantes anos da minha vida até então, na cidade que será para sempre casa, Coimbra! Se há uns anos atrás pensaria ser possível estar a escrever isto, hoje afirmo que só foi possível por me ter cruzado com pessoas tão especiais, às quais dedico as seguintes breves e delicadas palavras de agradecimento.

Aos meus pais, os verdadeiros pilares da vida. Pelo apoio incondicional, por todas as aprendizagens, pelas oportunidades que sempre me proporcionaram, pelo amor que nunca deixaram de mostrar...Muito Obrigado por sempre quererem o melhor para mim. A vocês dedico este trabalho!

Ao meu irmão, pela imensa paciência, pela dedicação e preocupação que sempre mostrou, mas especialmente, por nunca me ter falhado. Ensinou-me a crescer, como pessoa e estudante, e hoje não poderia estar mais grata por tudo aquilo que fez e continua a fazer por mim. Não poderia deixar também uma palavra de agradecimento à Margarida, por todo o companheirismo e ajuda a que sempre se prestou. Obrigado pela hospitalidade, principalmente pela secretária, onde hoje escrevo estas palavras, certamente trará grandes recordações.

Agradeço de forma especial ao meu eterno e inigualável orientador, Dr. Marcos Mariz. Começo por dizer que foi um prazer enorme partilhar esta última etapa académica, não poderia ter sido de outra forma. Obrigado pela oportunidade e confiança, pela partilha de conhecimento, dedicação e empenho que sempre mostrou. Por nunca me deixar desanimar mesmo quando a síntese dos copolímeros teimava em testar a resiliência de “uma mulher do Norte”. Foi e será um exemplo de dedicação e trabalho.

Uma palavra de agradecimento à Dra. Patrícia Alves por toda a ajuda e disponibilidade.

Às miúdas do B31, pela contagiante boa disposição e incentivo que sempre mostraram. Um agradecimento especial à Marta, por me ter feito sentir integrada desde o início e por toda a ajuda e confiança transmitida.

À minha querida bisavó Teresa, obrigado pela constante preocupação e presença, sem ti não seria a mesma coisa.

Termino agradecendo àqueles que foram parte da minha família ao longo destes últimos 5 anos, os meus eternos amigos (Dani, Hugo, Sofia, Lopes, Paredes, Zé, Vitor, Marona, Vanessa, Coutinho, Salgueiro, Jackson, Vasco, Cajó, Gariso). Obrigado pela amizade, pelo companheirismo, pelas partilhas de vitórias e derrotas. Acredito que, tal como eu, nunca nos vamos esquecer do melhor que Coimbra nos deu, amigos para a vida.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

**Paula Oliveira**

(Polly)

# Resumo

O glaucoma é considerado a segunda causa mais comum de cegueira a nível mundial. Hoje em dia, apesar de ainda não existir cura nem forma de reverter a visão perdida, existem medicamentos capazes de atenuar e retardar a progressão da doença, como o caso dos colírios. Apesar da sua facilidade de aplicação, exigem uma administração sistemática ao longo do dia, onde apenas 5 % da dose instalada é retida pela córnea. Acrescenta-se o facto da necessidade de sucessivas instilações diárias, provocarem no paciente um incumprimento da posologia correta. Os sistemas de libertação controlada de fármacos, como os insertos oculares, surgem em prol da melhoria da eficácia do tratamento. Apresentam vantagens substanciais, permitindo manter o nível terapêutico adequado, a uma taxa de libertação controlada, durante um período de tempo definido. Desta forma, é maximizada a relação dose-eficácia, diminuindo consideravelmente as dosagens diárias necessárias.

Um dos objetivos da presente dissertação foi avaliar a cinética de libertação do Cloridrato de Dorzolamida, através de um inserto ocular insolúvel, composto por copolímero de PCL/PEG (sintetizado segundo o mecanismo reacional de polimerização por abertura de anel). O fármaco é imobilizado homogeneamente na matriz polimérica, através de uma mistura física. O estudo da libertação baseou-se na avaliação do perfil cinético, durante 7 dias, quando os insertos foram submetidos em meios com diferentes valores de pH (6, 7, 8 e 9, de acordo com o pH do filme lacrimal). Os perfis apresentaram uma libertação superior a 90 % e de acordo com a Lei de Fick, excetuando o inserto inserido na solução com pH 9, onde após 24 horas se encontrava desfeito.

Os polímeros e copolímeros sintetizados foram submetidos a uma análise RMN, onde se verificou que a utilização de uma maior quantidade de PEG, resulta num peso molecular do copolímero menor. Por fim, foi avaliada a interação entre os sistemas polímero-polímero e polímero- fármaco, nomeadamente a solubilidade do fármaco na matriz polimérica, através de uma análise térmica de DSC. Os resultados obtidos revelaram uma alteração no comportamento térmico individual dos homopolímeros, quando submetidos à interação química entre eles, sendo que uma maior quantidade de PEG, conduz a uma curva térmica do copolímero mais próxima do estado amorfo. O cloridrato de dorzolamida, apresentou ser uma estrutura amorfa, não sendo solúvel na matriz polimérica.

**Palavras-Chave:** glaucoma, inserto ocular, libertação controlada, polietilenoglicol, policaprolactona



# Abstract

Glaucoma is considered the second most common cause of blindness worldwide. Today, although there is still no cure or way to reverse vision loss, there are medications that can attenuate and slow the progression of the disease, such as eye drops. Despite their ease of application, they require systematic administration throughout the day, where only 5% of the installed dose is retained by the cornea. In addition, the need for successive daily instillations causes the patient not to comply with the correct dosage. Controlled drug release systems, such as ocular inserts, are being used to improve treatment effectiveness. They have substantial advantages, allowing the appropriate therapeutic level to be maintained, at a controlled release rate, for a defined period of time. In this way, the dose-efficacy relationship is maximized, considerably reducing the necessary daily dosages.

One of the objectives of the present dissertation was to evaluate the release kinetics of Dorzolamide Hydrochloride, through an insoluble ocular insert, composed of PCL/PEG copolymer (synthesized according to the ring opening polymerization reaction mechanism). The drug is homogeneously immobilized in the polymeric matrix by physical mixing. The release study was based on the evaluation of the kinetic profile, during 7 days, when the inserts are submitted in media with different pH value (6, 7, 8 and 9, according to the pH of the tear film). The profiles showed a release higher than 90% and according to Fick's Law, except for the insert inserted in the solution with pH 9, which were disaggregated after 24 hours.

The synthesized polymers and copolymers were subjected to NMR analysis, where an inverse proportionality between the percentage of PEG and the final molecular weight of the copolymer was found, i.e., a higher amount of PEG implies a lower molecular weight of the copolymer. Finally, the interaction between the polymer-polymer and polymer-drug systems, namely the solubility of the drug in the polymer matrix, was evaluated using a DSC thermal analysis. The results obtained revealed a change in the individual thermal behavior of the homopolymers when subjected to chemical interaction between them, with a greater amount of PEG, leading to a thermal curve of the copolymer closer to the amorphous state. The dorzolamide hydrochloride, showed to be an amorphous structure, not being soluble in the polymer matrix.

**Keywords:** glaucoma, eye insert, controlled release, polyethylene glycol, polycaprolactone



# Índice

Agradecimentos .....	v
Resumo .....	vii
Abstract .....	ix
Índice .....	xi
Lista de Figuras .....	xv
Lista de Tabelas .....	xvii
Lista de Símbolos e Abreviaturas .....	xix
Capítulo 1 .....	1
Contextualização e Objetivos .....	1
<b>1.1 Enquadramento</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 O Glaucoma</b> .....	<b>2</b>
Humor Aquoso .....	3
Pressão Intraocular (PIO) .....	4
1.2.1 Tipos de Glaucoma .....	4
Formas de tratamento .....	5
<b>1.3 Objetivos</b> .....	<b>7</b>
Capítulo 2 .....	9
Estado da Arte .....	9
<b>2.1 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos</b> .....	<b>9</b>
2.1.1 Sistemas Sólidos de Liberação Controlada de Fármacos Oculares .....	11
2.1.1.1 O <i>InEye</i> <sup>®</sup> .....	14
<b>2.2 Utilização de Polímeros em Sistemas de Liberação Controlados</b> .....	<b>15</b>
2.2.1 Policaprolactona .....	15
2.2.2 Polietilenoglicol .....	17
2.2.3 Copolímeros de polietilenoglicol-policaprolactona .....	18
<b>2.3 Fármaco - Cloridrato de Dorzolamida</b> .....	<b>19</b>
Cloridrato de Dorzolamida .....	19
<b>2.4 Avaliação da Solubilidade de Fármacos na Matriz Polimérica</b> .....	<b>20</b>
Capítulo 3 .....	23
Materiais e Métodos .....	23
<b>3.1 Síntese Polimérica</b> .....	<b>23</b>
3.1.1 Síntese de policaprolactona .....	23

3.1.2 Síntese de copolímeros policaprolactona-poli(etilenoglicol).....	23
<b>3.2 Técnicas de Caracterização Polimérica.....</b>	<b>24</b>
3.2.1 Calorimetria Diferencial de Varrimento .....	24
3.2.2 Ressonância Magnética Nuclear .....	24
<b>3.3 Preparação de Insertos Oculares .....</b>	<b>25</b>
3.3.1 Imobilização do Fármaco na Matriz polimérica .....	25
Determinação da Quantidade de Fármaco .....	25
Mistura Física.....	25
3.3.2 Insertos Oculares .....	26
<b>3.4 Estudo da Cinética de Liberação .....</b>	<b>27</b>
3.4.1 Preparação dos meios de dissolução .....	27
3.4.2 Teste de Liberação de Fármaco.....	27
Curva Padrão .....	28
<b>3.5 Modelagem matemática - Análise da cinética de liberação.....</b>	<b>28</b>
<b>Capítulo 4.....</b>	<b>31</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Análise RMN dos copolímeros .....</b>	<b>31</b>
Determinação do peso molecular dos copolímeros.....	34
<b>4.2 Análise térmica- DSC .....</b>	<b>38</b>
Homopolímeros .....	38
Copolímeros .....	40
Fármaco- Cloridrato de Dorzolamida .....	41
Polímero + fármaco .....	42
<b>4.3 Cinética de Liberação - Teste Piloto.....</b>	<b>43</b>
Caso de Estudo I – Adsorção do fármaco na matriz polimérica .....	44
Caso de Estudo II – Interferência da formulação (% de PEG 600).....	45
Caso de Estudo III – Estabilidade do fármaco .....	46
Caso de Estudo IV- Interferências espectrais .....	47
<b>4.4 Cinética de Liberação do Fármaco em diferentes meios de dissolução .....</b>	<b>49</b>
4.4.1 Meio de dissolução com pH 7 .....	49
4.4.2 Meio de dissolução com pH 6, 8 e 9 .....	52
<b>Capítulo 5.....</b>	<b>55</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Conclusão Geral .....</b>	<b>55</b>
<b>5.2 Trabalhos Futuros.....</b>	<b>56</b>

<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>59</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>65</b>
<b>Anexo A: Descrição das propriedades físico-químicas dos reagentes utilizados.....</b>	<b>65</b>
<b>Anexo B: Cálculos complementares do Caso de Estudo IV- Interferências espectrais.</b>	<b>67</b>
<b>Anexo C: Resultados análise térmica de DSC .....</b>	<b>69</b>



# Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Regulação do humor aquoso. Adaptado[15] .....	3
<b>Figura 2.</b> Danificação do nervo ótico em consequência do aumento da PIO, provocado pelo bloqueio do canal de drenagem do humor aquoso. ....	4
<b>Figura 3.</b> Efeito na concentração do fármaco, de acordo com o método de administração de medicamento, ao longo do tempo [21]. ....	9
<b>Figura 4.</b> Representação do Ineye® com formato hemisférico de 3,5mm. ....	14
<b>Figura 5.</b> Representação da estrutura molecular da PCL. ....	15
<b>Figura 6.</b> Síntese de PCL por ROP de $\epsilon$ -caprolactona. ....	17
<b>Figura 7.</b> Representação da estrutura molecular do PEG.....	17
<b>Figura 8.</b> Reação de copolimerização, onde cada molécula de PCL está ligada covalentemente ao grupo terminal hidroxila de uma molécula de PEG (reação de condensação), dando origem a um copolímero anfifílico por reação de condensação [16]. ....	18
<b>Figura 9.</b> Estrutura química do Cloridrato de Dorzolamida.....	20
<b>Figura 10.</b> Curva resultante de uma análise DSC de um polímero semi-cristalino, evidenciando a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura e entalpia de recristalização ( $T_c$ e $\Delta H_c$ , respetivamente), temperatura e entalpia de fusão ( $T_m$ e $\Delta H_f$ ) e o início de degradação. A azul um evento exotérmico e a laranja um evento endotérmico. Adaptado [56].....	21
<b>Figura 11.</b> Imobilização do fármaco na matriz polimérica, através da mistura física, recorrendo a agitação e temperatura. ....	26
<b>Figura 12.</b> Preparação de um inserto ocular, a partir da mistura física, utilizando discos de silicone com 3,5 mm de diâmetro, submetidos a temperatura (45°C) para fundir e dar origem ao inserto. ....	26
<b>Figura 13.</b> Curva de calibração referente ao Cloridrato de Dorzolamida (248 nm). ....	28
<b>Figura 14.</b> Em cima apresenta-se a estrutura química da $\epsilon$ -caprolactona, seguindo-se do respetivo espetro $^1\text{H-RMN}$ obtido[16]. ....	31
<b>Figura 15.</b> Em cima apresenta-se a estrutura química da PCL, seguindo-se do respetivo espetro $^1\text{H-RMN}$ obtido. O pico representado a laranja corresponde à $\epsilon$ -caprolactona residual, que não reagiu.....	32
<b>Figura 16.</b> Em cima apresenta-se a estrutura química do copolímero PCL/PEG, seguindo-se dos espetros $^1\text{H-RMN}$ de amostras do copolímeros sintetizado, com 25,50 e 75 % de PEG na composição final. ....	34

<b>Figura 17.</b> Ilustração simplificativa da proporção entre a quantidade de PEG e PCL nos copolímeros.....	37
<b>Figura 18.</b> Efeito da percentagem de PEG 600 no peso molecular final do copolímero PCL/PEG.....	37
<b>Figura 19.</b> Termograma referente à PCL sintetizada, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min.....	39
<b>Figura 20.</b> Termograma referente ao PEG 600, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min. ....	39
<b>Figura 21.</b> Termogramas referentes aos copolímeros PCL/PEG, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min.....	40
<b>Figura 22.</b> Termograma referente ao cloridrato de dorzolamida, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min.....	41
<b>Figura 23.</b> Termograma referente à mistura do copolímero 25/75 %(m/m) de PCL/PEG com DZ, a uma taxa de aquecimento de 10°C/min. ....	42
<b>Figura 24.</b> Perfil cinético de libertação de DZ, através de um inserto contendo 22,5 % de PEG, durante 14 dias. ....	44
<b>Figura 25.</b> Variação da % da perda de DZ, de acordo com diferentes % (mássica) de PEG no copolímero.....	46
<b>Figura 26.</b> Perfil cinético de libertação de DZ ao longo do tempo: a azul um inserto constituído por 15 % PEG, a verde com 19 % PEG e a laranja com 22,5 % PEG.....	50
<b>Figura 27.</b> Perfil cinético de libertação de DZ, durante 7 dias, de um inserto constituído por copolímero PCL/PEG (com 22,5 % PEG), num meio de dissolução com pH 7. No gráfico, é apresentada a equação de linearidade referente aos primeiros tempos de libertação.....	50
<b>Figura 28.</b> Resultado 24 horas após os insertos serem colocados numa solução de pH 9. À esquerda uma solução de pH 9 pura (onde inicialmente são inseridos os insertos); os restantes frascos correspondem a uma solução 24 h após a colocação do inserto. ....	52
<b>Figura 29.</b> Perfil cinético de libertação de DZ, durante 7 dias, de um inserto constituído por copolímero PCL/PEG (22,5 % PEG), num meio de dissolução com pH 6 (roxo), pH 8 (laranja) e pH 7 (cinzento).....	53
<b>Figura B30.</b> Varrimento de onda para o polímero (22,5%PEG) a) amostra não filtrada; b) amostra filtrada.....	67
<b>Figura B31.</b> Varrimento de comprimento de onda para a solução pH 7 a) amostra não filtrada; b) amostra filtrada. ....	67

# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Insetos oculares solúveis e insolúveis, atualmente no mercado e em desenvolvimento. ....	12
<b>Tabela 2.</b> Breve descrição de exemplos de implantes oculares existentes [31]. ....	13
<b>Tabela 3.</b> Exponente difusional, $n$ , em função do mecanismo de libertação e forma geométrica. ....	29
<b>Tabela 4.</b> Valores obtidos na análise RMN, do peso molecular da PCL e dos copolímeros sintetizados e a percentagem de PEG e PCL no copolímero final. ....	36
<b>Tabela 5.</b> Resultados da abs e da perda do fármaco obtida, durante 7 dias, para $T_{amb}$ e $T_{37^{\circ}C}$ ( $f=10$ ). ....	47
<b>Tabela 6.</b> Valores da absorvância obtidos, através do varrimento de comprimento de onda individual, para o polímero e solução, de acordo com o valor do comprimento de onda fixo do DZ. ....	48
<b>Tabela 7.</b> Percentagem de fármaco perdido, considerando os resultados da abs do polímero e da solução. ....	48
<b>Tabela 8.</b> Valores obtidos dos parâmetros cinéticos, consoante o valor do pH do meio. ....	54



# Lista de Símbolos e Abreviaturas

$T_c$	Temperatura de recristalização (°C)
$T_g$	Temperatura de transição vítrea (°C)
$T_m$	Temperatura de fusão (°C)
$H_c$	Entalpia de Recristalização ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
$H_f$	Entalpia de Fusão ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
$^1\text{H-RMN}$	Ressonância Magnética Nuclear de próton
abs	absorvância
DZ	Cloridrato de Dorzolamida
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (calorimetria diferencial de varrimento)
f	Fator de Diluição
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAAP	Glaucoma Ângulo Aberto Primário
GAFP	Glaucoma Angulo Fechado Primário
IAC	Inibidor da Anidrase Carbónica
$M_n$	Peso Molecular
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCL	Policaprolactona
PEG	Polietilenoglicol
PGA	Poli (ácido glicérico)
PLA	Poliácido Láctico
PIO	Pressão Intraocular
$R^2$	Coefficiente de Determinação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROP	<i>Ring Opening Polymerisation</i> (polimerização por abertura do anel)
SLC	Sistema de Liberação Controlada



# Capítulo 1

## Contextualização e Objetivos

### 1.1 Enquadramento

Num mundo concebido sobre a capacidade de ver, onde se acredita que mais de 80 % de toda a informação captada é transportada até ao cérebro através do sistema visual, a importância de manter uma visão saudável torna-se uma prioridade ao longo da vida. A visão é um dos cinco sentidos que permite ao ser humano apreender, interagir e diferenciar tudo o que o rodeia, sendo por isso um critério fundamental para manter o bem-estar e qualidade de vida [1].

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) pelo menos 2,2 mil milhões de pessoas, correspondente a mais de um quarto da população total mundial, apresentam deficiências visuais, onde grande parte dos indivíduos possuem idade superior a 50 anos, pelo que o envelhecimento da população representa uma repercussão no aumento do número de casos de problemas oculares [2].

A administração oftálmica de medicamentos é um dos grandes desafios enfrentados pelos farmacologistas, dada a complexa anatomia estrutural do olho. A distribuição de medicamentos aos tecidos-alvo é desafiante, na medida em que é necessário contornar as barreiras protetoras do olho, sem causar danos permanentes nos tecidos [3].

A forma de dosagem convencional de medicamentos oculares, mais comumente utilizada para o tratamento de várias doenças, como o caso do glaucoma, é a instilação tópica de gotas. Este método, já utilizado na época de Cleópatra, perfaz hoje em dia cerca de 90 % das formulações oftálmicas comercializadas [3,4] A facilidade de administração, os custos acessíveis, a simplicidade de formulação e a compatibilidade com o paciente, são motivos que explicam a elevada percentagem de utilizações. Todavia, contrariamente ao uso dos medicamentos orais, a eficiência terapêutica deste método está diretamente dependente do uso e dosagem correta do colírio, sendo o desempenho e a capacidade de instilar corretamente afetados por vários fatores, como a idade, a acuidade visual e comorbidades [5,6].

Parte da dose administrada topicamente é eliminada da área pré-córnea e, apenas 20 % é retida [7,8]. A biodisponibilidade de medicamento ocular é relativamente baixa, onde este se mistura com o filme lacrimal e, apenas 5% penetra na córnea, devido às restrições anatómicas e fisiológicas, como o caso da drenagem nasolacrimal e o lacrimejamento induzido, dificultando assim a obtenção de uma concentração ótima no local de ação [3]. Por outro lado, a grande desvantagem inerente, observada particularmente entre paciente diagnosticados com doenças crônicas, passa pela necessidade da administração sistemática ao longo do dia, de maneira a manter um nível terapêutico contínuo e sustentado, o que resulta numa dose maciça e imprevisível de medicamento e num incumprimento da posologia correta [9]. Dessa forma, a concentração intraocular da medicação atinge um pico sempre que se procede à instilação, sendo que o nível do fármaco diminui rapidamente, verificando-se um perfil exponencial com o tempo, caracterizado por flutuações, podendo mesmo ser ultrapassado o limite tóxico [10].

Nas últimas décadas, devido à necessidade de se desenvolverem novos sistemas de distribuição oculares de fármacos, seguros, eficazes e igualmente compatíveis com o paciente, o estudo e desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de fármacos oculares tem progredido, no sentido de superar todas as barreiras físicas e químicas, focando em manter os níveis de concentração dos medicamentos adequados, diminuindo consideravelmente a frequência de aplicações necessárias [6].

## 1.2 O Glaucoma

O conceito de glaucoma tem evoluído nos últimos 100 anos, desde a sua primeira abordagem na era de Hipócrates. Atualmente, o termo não se refere apenas a uma só doença, mas a uma designação genérica de um grupo de doenças que diferem na sua avaliação clínica, fisiopatologia e tratamento [11].

Considerada a segunda causa mais comum de cegueira a nível mundial, depois das cataratas, é responsável pelo maior índice de cegueira irreversível, afetando mais de 70 milhões de indivíduos em todo o mundo [12].

Trata-se de um conjunto de distúrbios caracterizados por uma neuropatia ótica progressiva, conhecida pela danificação e perda irreversível de células ganglionares da retina. Estas, por sua vez, constituem a única saída de informação visual da retina, dado que os seus axónios se unem, formando o nervo ótico, responsável pela transmissão da informação sensorial até ao cérebro [13,14]. Em consequência desta degeneração, ocorre uma redução da camada de fibras nervosas

da retina, resultando em alterações estruturais no nervo ótico, que precedem a deterioração funcional do campo visual [12].

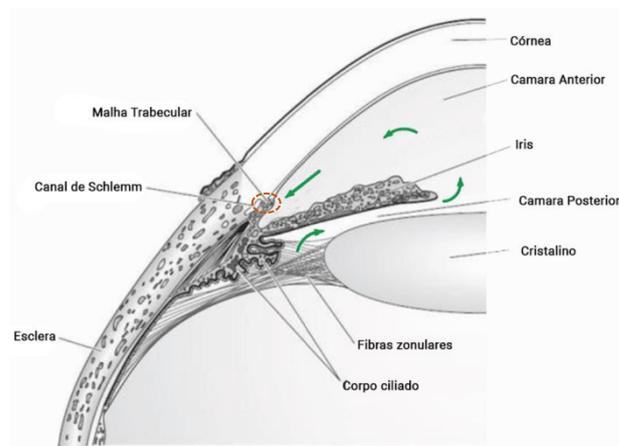
Conhecida como a “doença silenciosa”, o glaucoma pode permanecer assintomático, desenvolver-se gradualmente, com sintomas mínimos ou inexistentes numa fase inicial, afetando a visão periférica e, conservando a visão central. Num estágio posterior, aquando do aparecimento de sintomas, a perda de visão é considerável, alterando a qualidade de vida dos pacientes. Dadas estas características, existe assim uma grande probabilidade de o número de afetados ser realmente superior àquele que é conhecido [12,13].

### **Humor Aquoso**

O humor aquoso é um fluido transparente que preenche a câmara anterior do olho (espaço entre o cristalino e a córnea, Figura 1), cuja taxa de produção é cerca de  $2,5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  [15]. A sua composição assemelha-se à composição plasmática, constituída principalmente por cerca de 95 % de água e sais dissolvidos, apresentando assim resistência à difusão de fármacos hidrofóbicos [15–17].

Além da importante função de hidratação das estruturas avasculares (como a córnea e o cristalino) e o fornecimento de nutrientes, este fluido é ainda responsável pelo suporte da câmara anterior, conferindo a forma ao polo anterior do globo ocular.

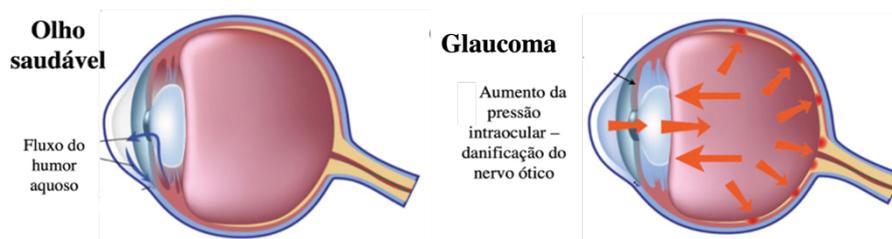
De modo a preservar as propriedades óticas, é necessário assegurar um equilíbrio entre a produção do fluido, através do corpo ciliado, e a sua drenagem, Figura 1 [17]. Esta, por sua vez, pode ser feita por duas vias: convencionalmente através dos poros da malha trabecular e do canal Schlemm, onde cerca de 90 % do fluido produzido é drenado; ou através da saída uveoscleral, onde apenas escoo 10 % do fluxo total. Uma anomalia no equilíbrio do humor aquoso pode resultar em graves deficiências oculares [18].



**Figura 1.** Regulação do humor aquoso. Adaptado[15]

### **Pressão Intraocular (PIO)**

Ainda que a etiologia do glaucoma não esteja bem estabelecida, do ponto de vista fisiopatológico a elevada PIO, dada como pressão exercida pelos fluidos intraoculares nas camadas do globo ocular, é reconhecida consensualmente como o principal fator modificável. Contudo, nem sempre se trata de uma característica indicativa da doença, podendo os pacientes com glaucoma apresentarem uma tensão ocular normal [13]. Esta varia entre 10 e 21 mm Hg, e é controlada de acordo com um equilíbrio dinâmico entre a produção do humor aquoso e a sua drenagem. Para que a pressão intraocular se mantenha constante, e dentro dos limites admissíveis, o humor aquoso produzido necessita de ser drenado, na mesma proporção. De entre os muitos fatores que podem influenciar o aumento da PIO, a resistência ao escoamento é o fator mais importante [19]. Assim, quando a facilidade de escoamento do humor aquoso é comprometida, ocorre um aumento da pressão intraocular, em consequência da acumulação do fluido (resultante do bloqueio do canal de drenagem), originando a danificação do nervo ótico, Figura 2.



*Figura 2. Danificação do nervo ótico em consequência do aumento da PIO, provocado pelo bloqueio do canal de drenagem do humor aquoso.*

#### **1.2.1 Tipos de Glaucoma**

O glaucoma é dividido essencialmente em duas categorias principais, de acordo com a morfologia do ângulo da câmara anterior (onde ocorre a drenagem aquosa): glaucoma de ângulo aberto e glaucoma de ângulo fechado [20]. Contudo, outra diferenciação importante para a categorização da doença, assim como para considerações terapêuticas, é entre glaucoma primário, onde geralmente não existem doenças preexistentes, e glaucoma secundário que está associado a distúrbios adjacentes [21].

O glaucoma de ângulo aberto primário (GAAP), compreende a maioria dos casos e é tipicamente caracterizado por um aumento lento e progressivo da PIO, geralmente assintomático na fase inicial da doença, provocando apenas uma diminuição do campo visual periférico (pode demorar muito tempo a ser detetada pelo paciente) [19].

No glaucoma de ângulo fechado primário (GAFP), devido ao mecanismo de bloqueio pupilar, onde o humor aquoso é impedido de fluir para a câmara anterior, ocorre o bloqueio completo do canal de drenagem, resultando num ângulo anatomicamente fechado. Na maioria dos casos, este tipo de glaucoma resultante de um aumento súbito da pressão intraocular, ocorre espontaneamente e está associada a dor ocular intensa e visão turva repentina [19,20].

### **Formas de tratamento**

Apesar dos grandes avanços científicos levados a cabo nos últimos anos, atualmente não existe cura para o glaucoma nem forma de reverter a visão perdida, ressaltando assim a importância do diagnóstico e do tratamento precoce. O principal objetivo do tratamento passa por retardar a progressão da doença, prevenindo a perda funcional da visão, preservando a qualidade de vida dos pacientes. O tratamento deve ser sempre feito mediante uma avaliação individualizada, consoante o estágio e riscos de progressão da doença, assim como a compatibilidade com o paciente.

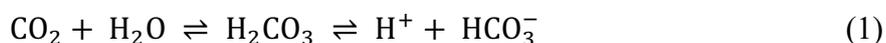
A terapia cirúrgica provou ser um método altamente eficaz na diminuição da PIO. No entanto, para além de estar associada a algumas complicações e riscos, como a possibilidade de perfuração do globo ocular, a formação de cataratas e distorções visuais, trata-se de um procedimento irreversível, pelo que é impossível voltar ao estado original do olho, não sendo considerada como tratamento primário para a doença. A cirurgia a laser (trabeculoplastia), utilizada como primeira tentativa para redução da PIO em 1973, por *Krasnov*, utiliza o laser para atingir a malha trabecular de maneira a alterar os espaços da malha e possibilitar o aumento do escoamento do humor aquoso. Embora seja visto como um tratamento eficiente no início, a eficácia deste método tende a diminuir ao longo do tempo [22,23].

Ao longo dos anos, muitos medicamentos foram estudados por forma a reduzir a PIO, diminuindo assim o humor aquoso no olho. Os fármacos, administrados geralmente nos estágios iniciais da doença assim como após as cirurgias, podem ser misturados com excipientes para a produção de formas farmacêuticas semi-sólidas, no caso dos géis (compostos hidrofílicos que prolongam o contacto com a córnea, dadas as propriedades muco adesivas), e das pomadas. Embora mantenham um maior tempo de contacto do medicamento comparativamente com o

uso de colírios líquidos, podem causar visão turva e aderência das pálpebras após aplicação [12].

Após a administração tópica do colírio, ocorre uma mistura da formulação oftálmica com o fluido lacrimal, de maneira a penetrar na córnea. Este trata-se de um fluido de elevada importância na manutenção da integridade dos tecidos subjacentes, responsável pela nutrição da córnea, fornecimentos de oxigênio, proteção da superfície contra agentes patogênicos e lubrificação da interface entre a pálpebra e a córnea [17]. Por se tratar de um fluido diretamente exposto a constantes variações de ambiente, apresenta características diferentes, nomeadamente no valor do pH. Para além de ser uma função individualizada, variando de pessoa para pessoa, regista ainda valores diferentes ao longo do dia, apresentando uma mudança de ácido para alcalino. O simples ato de pestanejar provoca uma ligeira mudança ácida, verificando-se também um decréscimo no valor durante a noite, devido à acumulação de  $\text{CO}_2$  (subproduto do metabolismo da córnea). O **pH normal do filme lacrimal** será próximo de **7,2** e, mesmo em condições de doença, permanece num intervalo entre **5,2** e **8,6** [24,25].

O filme lacrimal, ligeiramente alcalino, estabiliza através de um sistema tampão de bicarbonato. Quando o pH do meio está acima do seu  $\text{pK}_a$ , o ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) degrada-se em  $\text{H}^+$  e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), de acordo com a Equação 1 [15,16].



Quando são administrados colírios ácidos, o pH da superfície ocular é reduzido, retomando o estado estacionário, através do lacrimejamento induzido pela irritação das substâncias ácidas dos colírios, onde as lágrimas diluem o ácido e, em cerca de 20 a 40 minutos, o pH retorna aos valores normais [16].

### 1.3 Objetivos

A presente dissertação, inserida no Projeto *InEye*<sup>®</sup>, envolve a preparação de um inserto ocular de base polimérica, biocompatível, desenvolvido para conceder uma libertação controlada de fármacos, para o tratamento de patologias oculares, neste caso o glaucoma. Pretende-se uma formulação, com base na composição terapêutica dos colírios utilizados convencionalmente, que proporcione uma libertação contínua e controlada do fármaco, durante todo o período de ação estipulado (7 dias).

A cinética de libertação de fármacos immobilizados em matrizes poliméricas, depende de vários fatores, como o processo de imobilização do fármaco e a sua solubilidade, quer no polímero, quer no meio aquoso onde será libertado. O estudo engloba a síntese do polímero e a imobilização do fármaco na matriz polimérica, onde o sistema polímero/fármaco será posteriormente caracterizado nos parâmetros críticos, nomeadamente na solubilização do fármaco na matriz polimérica, através de análise de DSC, e na estrutura química da matriz, através de análises de RMN.

Como já mencionado, o filme lacrimal apresenta diferentes valores de pH. Ao longo deste trabalho, é avaliado o impacto no comportamento da cinética de libertação do fármaco, através de insertos, quando são submetidos em meios com diferentes valores de pH.



# Capítulo 2

## Estado da Arte

### 2.1 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos

Desde o surgimento no início dos anos 70, o interesse por parte da comunidade científica no que diz respeito ao desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, SLCs, tem progredindo ao longo dos últimos anos. O sucesso dos primeiros SLCs levou a avanços tecnológicos promissores, oferecendo vantagens substanciais, contornando as limitações farmacocinéticas das formas convencionais de dosagem [26]. Estes definem-se como um dispositivo que visa a administração e veiculação de uma ou mais substâncias terapêuticas no corpo, a uma taxa controlada, durante um período de tempo predefinido. Contrariamente à administração convencional (que exige sucessivas administrações), é possível manter o nível terapêutico adequado, assegurando a concentração do fármaco acima da concentração mínima eficaz e abaixo da concentração mínima tóxica, Figura 3. Desta forma, é conseguida uma extensão da duração da ação e biodisponibilidade do fármaco, maximizando a relação dose-eficácia, permitindo ainda a redução do risco de sub e/ou sobredosagem, assim como o potencial para efeitos colaterais adversos reduzidos [26,27].

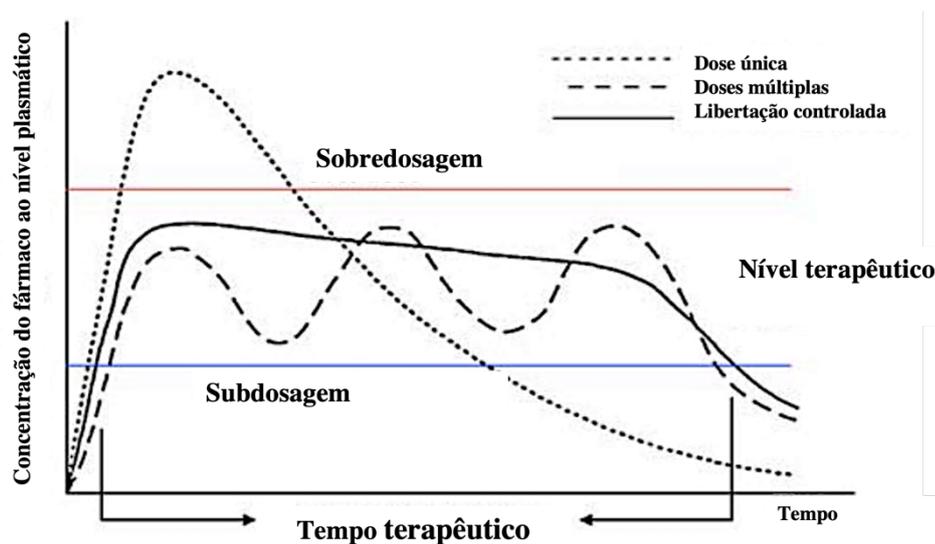


Figura 3. Efeito na concentração do fármaco, de acordo com o método de administração de medicamento, ao longo do tempo [21].

Acrescenta-se o facto de os SLCs contribuírem para uma maior adesão do paciente, uma vez que é reduzida substancialmente a frequência de dosagem, minimizando assim as flutuações *in vivo* da concentração do fármaco. Permitem ainda minimizar a degradação e perdas do fármaco, evitando os possíveis efeitos secundário [28].

O desenvolvimento de um SLC é altamente dependente de um amplo conjunto de fatores, dos quais se ressaltam as propriedades físico-químicas do fármaco, o tempo de contacto com o meio biológico, as características do sistema portador e o seu comportamento perante as condições fisiológicas a que é submetido [16]. São maioritariamente constituídos por uma estrutura polimérica biocompatível, isto é, a sua utilização *in vivo* não surte qualquer tipo de reação adversa por parte do organismo. Podem ser classificados de acordo com a sua origem como polímeros naturais, tal como o colagénio, a celulose e o quitosano, bem como sintéticos, no caso do PLA, PGA e da PCL. A vantagem na utilização de polímeros cuja origem depende do Homem, é que em consequência da diversidade de composições, permite uma alargada gama de propriedades únicas e distintas para os polímeros, adequados à aplicação desejada. Para além disso, alguns polímeros de origem natural apresentam algumas limitações como antigenicidade e o risco de infeção viral [27]. Os polímeros podem ser biodegradáveis ou não biodegradáveis, sendo que os materiais biodegradáveis, quando introduzidos no corpo, não necessitam de serem removidos. O polímero degrada-se continuamente *in vivo*, transformando-se num polímero com menor peso molecular, sendo os produtos de degradação metabolizados e eliminados. A taxa de degradação dos materiais poliméricos é influenciada por fatores como: [27]

- Fatores físico-químicos (como o caso do pH);
- Mecanismo de degradação (hidrólise química, enzimática);
- Fatores físicos (forma e tamanho da rede polimérica) e morfologia (material amorfo, semicristalino, cristalino);

No entanto, a utilização de polímeros não biodegradáveis permite garantir a inexistência de produtos de degradação, que podem ser considerados tóxicos, e um melhor controlo na libertação dos fármacos, uma vez que a porosidade e espessura da matriz não sofrem grandes modificações, tornando deste ponto de vista a utilização de polímeros não biodegradáveis mais atrativa.

Para além de ser importante compreender as interações polímero-fármaco, para uma análise do perfil de libertação dos fármacos através de um SLC, é necessário ter em conta diversos aspetos que interferem no comportamento da cinética, como as características do meio de libertação, a localização do fármaco na matriz polimérica, assim como o tempo de difusão do fármaco.

### 2.1.1 Sistemas Sólidos de Libertação Controlada de Fármacos Oculares

Com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade dos fármacos, assim como colmatar certas lacunas na terapia de patologias oculares, têm sido desenvolvidos dispositivos de distribuição controlada de fármacos, que visam assegurar a concentração mínima necessária, por longos períodos de tempo. De acordo com o modo de aplicação, os dispositivos sólidos oculares podem ser classificados em **insertos oculares** (processo não invasivo, passivo de ser executado pelo paciente) ou **implantes** (necessitam de procedimentos médico).

#### *Insertos Oculares*

A história dos insertos oculares remonta ao século XIX, onde foram utilizados os primeiros insertos insolúveis. Consistiam em soluções de sulfato de atropina e cloridrato de pilocarpina, impregnadas em filtros de papel, colocados posteriormente sob a pálpebra. Os antecessores dos atuais insertos solúveis, denominavam-se de “*lamellae*”, e consistiam em gelatina glicerinada que continha diferentes fármacos oftálmicos. Porém, dada a falta de esterilidade, a sensação de desconforto provocada no paciente e a necessidade de um sistema com maior controlo na libertação dos fármacos, estas criações nunca foram consideradas uma opção vantajosa para o tratamento, surgindo então a necessidade de uma investigação mais promissora para este tipo de sistemas [29].

Atualmente, os insertos são de natureza sólida ou semi-sólida, colocados facilmente no saco conjuntival e podem ser classificados, de acordo com a natureza do(s) polímero(s) que os constitui, como **solúveis** ou **insolúveis**. Relativamente ao inserto solúvel, trata-se de um dispositivo polimérico cujo fármaco se encontra disperso ou dissolvido em toda matriz, que sofre dissolução gradual durante a libertação do fármaco, não sendo necessário a sua posterior remoção. No entanto, a velocidade de degradação (hidrolítica ou enzimática) varia consoante a taxa de produção e remoção do fluído lacrimal, assim como da concentração de enzimas, pelo

que este sistema é mais suscetível a variações na cinética de libertação dos fármacos. No caso dos insertos insolúveis, a taxa de degradação está altamente dependente das interações entre o fármaco e o polímero, sendo por isso possível manipular a cinética de libertação [16,29]. Por se tratar de dispositivos oculares, estes devem cumprir certos requisitos como a biocompatibilidade com o tecido do olho, serem esterilizáveis, não tóxicos, não carcinogénicos, assim como não mutagénicos [9]. Apesar das várias vantagens, a utilização deste tipo de dispositivos acarreta certas desvantagens como a possibilidade de migração indesejada do inserto, devido a movimentos no olho, a perda involuntária durante o sono ou a esfregar o olho e a possível sensação de corpo estranho/desconforto [30].

Existem diversos tipos de insertos oculares no mercado e em desenvolvimento, como os exemplos apresentados na Tabela 1, com uma breve descrição de cada dispositivo.

*Tabela 1. Insertos oculares solúveis e insolúveis, atualmente no mercado e em desenvolvimento.*

<b>Tipo</b>	<b>Nome</b>	<b>Ano</b>	<b>Descrição</b>
<b>Solúvel</b>	Lacrisert <sup>®</sup>	1978	Dispositivo à base de hidroxipropilcelulose, usado no tratamento da síndrome do olho seco (alternativa à lágrima artificial) [30].
	<i>Collagen Shield</i>	1977,1978	Composto por tecido escleral suíno. É um substituto da lágrima artificial com libertação de gentamicina [29].
	SODI <sup>®</sup> *	1976	Copolímero de acrilamida, acrilatos de etila e N-vinil pirolidona, aplicado para libertação de pilocarpina e vários antibióticos [29].
<b>Insolúveis</b>	Minidisc	1985	Inserido na pálpebra e pode ser tanto hidrofóbico como hidrofílico, permitindo a libertação de fármacos solúveis e insolúveis [29][30].
	Ocufit <sup>®</sup>	1992	Dispositivo formado por silicone e impregnado com tetraciclina, cujo tamanho e forma se adequam ao fórnix conjuntival [16].
	Ocusert <sup>®</sup>	1975,1980	Dispositivo composto por 3 camadas: 2 externas à base de acetato de etila e uma interna com pilocarpina imobilizada em alginato [29][16].
	Lentes de contacto	-	Capacidade em simultâneo de libertar fármacos durante um longo período de tempo e corrigir a visão. Absorvem fármacos solúveis em água quando imersos em soluções e, posteriormente são colocadas no olho para uma libertação prolongada [29].

\*SODI<sup>®</sup> - Soluble Ophthalmic Drug Insert.

Quando o fármaco se encontra disperso ou dissolvido homogeneamente na matriz polimérica, denomina-se de **sistema matricial** (monolítico), tratando-se geralmente de sistemas solúveis – a matriz incha, devido à difusão do solvente, promovendo a libertação das cadeias poliméricas e a consequente libertação do fármaco que se encontra solubilizado, sendo que, a taxa de libertação pode não ser constante. Por sua vez, quando o fármaco se encontra num reservatório interno, revestido por uma membrana polimérica semipermeável denomina-se de **sistema de reservatório** – cujo controlo da libertação do fármaco é efeito através da membrana, sendo possível obter taxas de ordem zero (constante) [16,30].

### **Implantes**

Os implantes oculares são uma forma farmacêutica de administração intraocular, pelo que a sua utilização implica a intervenção médica, sendo por isso considerado um procedimento invasivo. O desenvolvimento destes sistemas foi desencadeado pela necessidade de administrar fármacos diretamente no local de ação, permitindo não só reduzir a eliminação dos fármacos, através do sistema de drenagem lacrimal, como solucionar a baixa biodisponibilidade provocada pela presença da córnea (barreira físico-química). De acordo com os polímeros utilizados na sua formulação, os implantes podem ser classificados como biodegradáveis e não biodegradáveis, sendo que neste último caso, é necessário a realização de uma segunda cirurgia para extração do implante [29]. Na Tabela 2, são apresentados e descritos alguns exemplos de implantes oculares existentes atualmente.

*Tabela 2. Breve descrição de exemplos de implantes oculares existentes [31].*

	<b>Descrição</b>
<b>Vitrasert®</b>	Implante não biodegradável aprovado pela FDA em 1996, específico para o tratamento de um tipo de retinite, cuja libertação pode durar até 8 meses. Utiliza álcool polivinílico (PVA) e etileno vinil acetato (EVA).
<b>Ozurdex®</b>	Dispositivo biodegradável, utilizado para o tratamento de uveíte e o edema macular (causado pela diabetes), aprovado em 2009 pela FDA. Composto por uma matriz de ácido poli (lático-co-ácido-glicólico) (PLGA), com um tempo de ação até 6 meses.
<b>Retisert®</b>	Foi o segundo implante não biodegradável aprovado pela FDA. Direcionado ao tratamento da uveíte, revestido com camadas de PVA e silicone. A libertação do fármaco é feita por cerca de 2 anos e 6 meses.

### 2.1.1.1 O *InEye*<sup>®</sup>

O *InEye*<sup>®</sup> (Figura 4), dispositivo inventado e patenteado por um grupo de investigadores da Universidade de Coimbra, trata-se de um inserto ocular insolúvel biocompatível, onde o fármaco é imobilizado na matriz polimérica, constituída por polietilenoglicol (PEG) e policaprolactona (PCL) (polímeros estudados na seção 2.2). O dispositivo foi desenvolvido para colmatar as várias limitações associadas aos diferentes métodos convencionais de tratamento de doenças oculares, e é colocado na fórnice conjuntival (inferior ou superior), pelo que a sua colocação pode ser feita pelo próprio paciente. Apresenta diferentes formas (esferas/hemisférios), diâmetro e arquiteturas (monolíticas/em camada), que são ajustados de modo a obter o perfil ideal de distribuição do fármaco e reduzir o deslocamento ou a remoção do próprio inserto. A libertação do fármaco pode ocorrer sob um perfil de acordo com a Lei de Fick ou linear, ao longo de períodos de vários meses [32]. As quantidades de fármacos imobilizados no inserto são estabelecidas com base na duração do tratamento e na dose diária recomendada, sendo que a capacidade máxima de fármaco possível de incorporar, depende da solubilidade do fármaco no polímero fundido, assim como do tamanho do inserto.



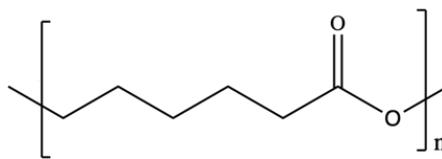
*Figura 4. Representação do Ineye<sup>®</sup> com formato hemisférico de 3,5mm.*

Pretende-se assim, o desenvolvimento de um dispositivo adequado a cada patologia ocular, capaz de proporcionar uma libertação de um ou mais fármacos na quantidade, taxa e duração necessários, melhorando a eficácia do tratamento assim como da qualidade de vida dos pacientes.

## 2.2 Utilização de Polímeros em Sistemas de Liberação Controlados

### 2.2.1 Policaprolactona

A policaprolactona (PCL), inserida na classe dos polímeros sintéticos biodegradáveis, foi utilizada em dispositivos de liberação controlada de fármacos na década de 70. Trata-se de um poliéster hidrofóbico alifático, composto por unidades de repetição de hexanoato, Figura 5, que tem despertado grande interesse ao longo dos últimos anos [33].



*Figura 5. Representação da estrutura molecular da PCL.*

Apresenta baixa temperatura de transição vítrea,  $T_g = -60\text{ }^\circ\text{C}$ , e temperatura de fusão ( $T_m$ ) na gama entre  $59\text{-}64\text{ }^\circ\text{C}$ , de acordo com a estrutura cristalina e o peso molecular. É um polímero com caracter semicristalino, cujo grau de cristalinidade pode atingir os 60 %, com tendência a diminuir com o aumento do peso molecular [33,34] Relativamente à solubilidade, à temperatura ambiente a PCL é altamente solúvel em solventes como o clorofórmio, diclorometano, benzeno e tolueno. Em composto como a acetona, acetato de etilo e dimetilformamida, apresenta baixa solubilidade, sendo insolúvel em água, álcoois e éter dietílico [34,35].

A degradação da PCL quando esta é aplicada em SLCs, é mediada através da hidrólise de ligações ésteres. Em geral, a degradação completa é relativamente lenta (2-3 anos), em meio biológico com um fluido intersticial em constante mudança [34]. A taxa de degradação é influenciada por fatores como o grau de cristalinidade, o peso molecular, assim como as características do meio onde o polímero se encontra inserido. Neste último caso, a taxa de degradação em meio alcalino é mais rápida comparativamente com o meio ácido. [36][37] No entanto, no caso concreto da utilização da PCL no InEye<sup>®</sup>, como a degradação do polímero é relativamente lenta, e a utilização do inserto não pressupõe um período terapêutico tão alargado, a taxa e as condições de degradação não vão afetar a PCL, pelo que se pode considerar que esta não é biodegradável.

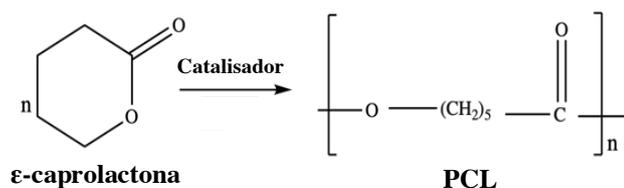
Caracterizada por excelentes propriedades, como a biodegradabilidade, a biocompatibilidade, a não toxicidade e, como referido a taxa de degradação lenta, a PCL aprovada pela FDA para aplicações no corpo humano, tem assumido um papel importante na área biomédica e de biomateriais. É um dos polímeros mais promissores utilizados nos sistemas de libertação controlada de fármacos, sendo que a capacidade de mistura com outros polímeros permite manipular a cinética de degradação, facilitando assim certos ajustes nas suas propriedades finais, face às diferentes aplicações [33].

A PCL é também vulgarmente utilizada em suturas cirúrgicas (sutura *Monocryl*<sup>®</sup> - sintética e absorvível, composta por fibras de copolímeros de PCL e PGA (poli (ácido glicólico)), patenteada por *Ethicon Inc*) e em engenharia de tecidos, nomeadamente na produção de suportes (*scaffolds*). No entanto, devido à elevada cristalinidade deste polímero, ocorre uma diminuição da biodegradabilidade e compatibilidade, principalmente em tecidos moles. Uma alternativa que visa solucionar as dificuldades em algumas aplicações, como a hidrofiliabilidade e a taxa de degradação, passa pela copolimerização da PCL com outros polímeros [38,39].

### Síntese da PCL

A PCL pode ser sintetizada através de duas vias distintas: a condensação do ácido 6-hidroxihexanóico e a polimerização por abertura do anel (ROP, do inglês “*Ring Opening Polymerisation*”) de  $\epsilon$ -caprolactona, um éster cíclico. Neste último caso, Figura 6, obtém-se polímeros com um peso molecular mais elevado e uma polidispersividade mais baixa, sendo deste modo o método de síntese mais utilizado [34]. No caso da reação de policondensação, para além de serem necessários longos tempos de reação, que pode levar à ocorrência indesejável de reações secundárias e a efeitos prejudiciais no peso molecular, necessita ainda de elevadas temperaturas [40].

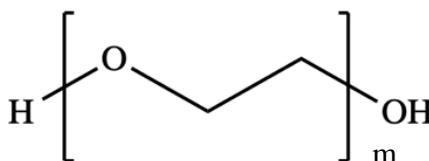
Relativamente à síntese da PCL através da ROP, existem quatro mecanismos principais: aniónicos, catiónicos, por ativação do monómero ou coordenação-inserção (forma mais comum). Esta última reação necessita da presença de um catalisador, que por sua vez irá definir o tipo de reação. Os sistemas catalíticos podem ser baseados em metal, enzimáticos e orgânicos. Grande parte dos compostos à base de metal utilizados pertencem ao grupo dos metais pobres, mais frequentemente os catalisadores à base de alumínio e estanho. Dada a sua eficácia, disponibilidade no mercado, facilidade de manuseamento e solubilidade numa variedade de solventes, os catalisadores à base de estanho, nomeadamente o octanoato de estanho, têm sido amplamente utilizados na ROP de  $\epsilon$ -caprolactona [34,35].



*Figura 6. Síntese de PCL por ROP de  $\epsilon$ -caprolactona.*

### 2.2.2 Polietilenoglicol

O polietilenoglicol (PEG) é um poliéter hidrofílico sintético, cuja unidade de repetição é o óxido de etileno, Figura 7. Apresenta elevada solubilidade em água e em grande parte dos solventes orgânicos, incluindo o tolueno, cloreto de metileno, etanol e acetona. É insolúvel em hexano e éter etílico [41].



*Figura 7. Representação da estrutura molecular do PEG.*

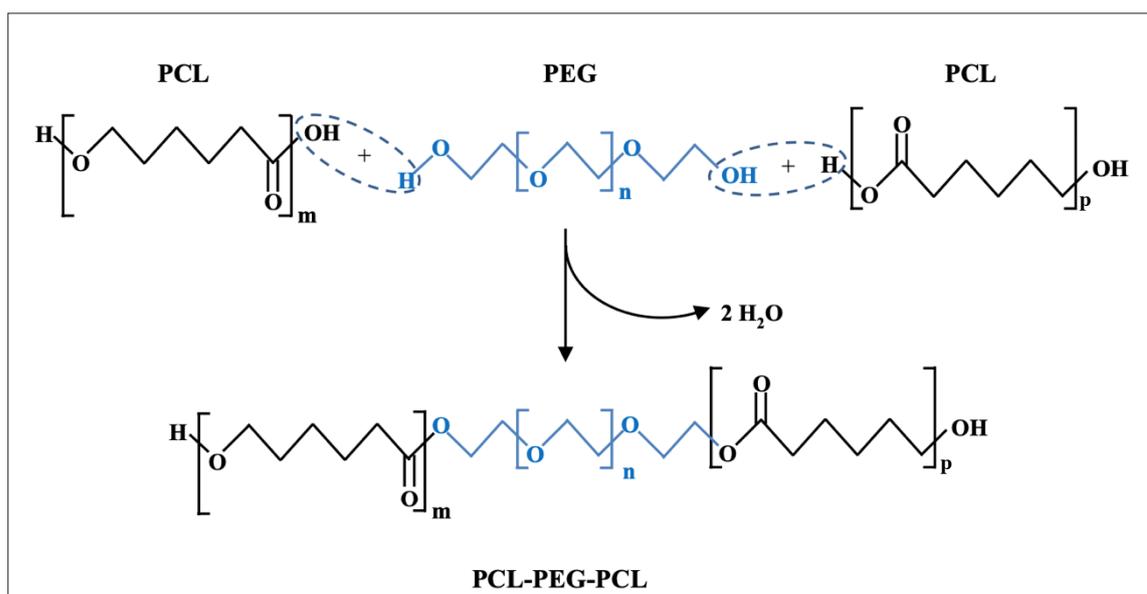
Sintetizado, geralmente, através da polimerização aniônica do óxido de etileno, iniciada pelo ataque nucleofílico do íon hidróxido (OH<sup>-</sup>). Exibe uma ampla gama de pesos moleculares, entre 400-50 000 g.mol<sup>-1</sup>, sendo denominado de “monodisperso” quando o tamanho da cadeia e o peso molecular são definidos, ou por outro lado, e mais frequentemente, “polidisperso”, quando existe uma distribuição gaussiana de pesos moleculares e comprimentos de cadeia [40,42]. Aprovado pela FDA para aplicações internas no corpo humano, atendendo às propriedades físicas e químicas como a biocompatibilidade, a não toxicidade, ausência de imunogenicidade, assim como a elevada capacidade de hidratação, o PEG torna-se um polímero atrativo para aplicações farmacêuticas e biomédicas. É o caso dos sistemas de libertação controlada de fármacos e dos hidrogéis utilizados na regeneração de tecidos [43].

Todavia, a utilização do PEG apresenta também algumas desvantagens, como o facto do polímero não ser biodegradável, a baixa cristalinidade e a possibilidade de degradação quando submetido a tensão. No entanto, e à semelhança da PCL, estas limitações podem ser contornadas através da formação de copolímeros com outros monómeros [40,41].

### 2.2.3 Copolímeros de polietilenoglicol-policaprolactona

A síntese de **copolímeros**, caracterizados por possuírem duas ou mais sequências de monómeros, permite manipular e melhorar várias propriedades individuais dos polímeros, colmatando certas limitações na sua utilização. A copolimerização em bloco da PCL (poliéster hidrofóbico) com o PEG (poliéter hidrofílico), origina um copolímero anfifílico biocompatível, onde o PEG atua como iniciador, formando ligações ésteres com duas moléculas da PCL, como ilustrado na Figura 8. A reação de condensação é caracterizada pela junção de duas moléculas acompanhada pela eliminação de uma molécula pequena, geralmente água.

As propriedades finais do copolímero podem ser manipuladas com base na proporção entre o PEG e a  $\epsilon$ -caprolactona, como é o caso da hidrofiliicidade que, conseqüentemente, alterará as características da matriz do copolímero. Desta forma, torna-se também possível solubilizar tanto fármacos hidrofóbicos como hidrofílicos [16].



*Figura 8. Reação de copolimerização, onde cada molécula de PCL está ligada covalentemente ao grupo terminal hidroxila de uma molécula de PEG (reação de condensação), dando origem a um copolímero anfifílico por reação de condensação [16].*

## 2.3 Fármaco - Cloridrato de Dorzolamida

A terapia médica para o tratamento do glaucoma sofreu diversas alterações ao longo dos anos, à medida que novos medicamentos se tornaram disponíveis para o uso clínico. Diversas classes farmacológicas são atualmente utilizadas para o tratamento da doença, como é o caso dos inibidores da anidrase carbónica e os  $\beta$ -bloqueadores, específicos para a diminuição da formação de humor aquoso [44].

### Cloridrato de Dorzolamida

A dorzolamida, inventada por *Thomas H.Maren* e comercializada em 1995 como o sal cloridrato em solução aquosa de colírio (Cloridrato de Dorzolamida, DZ), Figura 9, é frequentemente utilizada para o tratamento do glaucoma [49]. Trata-se de um inibidor da anidrase carbónica (IAC), que quando colocado no olho, impede a ação da enzima anidrase carbónica, responsável pela catálise reversível de  $H_2O$  e  $CO_2$ , para formar bicarbonato ( $HCO_3^-$ ), e iões de hidrogénio ( $H^+$ ), de acordo com a Equação 1. A presença de iões de  $HCO_3^-$ , provoca o movimento de  $Na^+$  e de água para o olho. Desta forma, se a reação não ocorrer, há uma diminuição do transporte de água e, conseqüentemente da produção de humor aquoso. Regista-se uma redução da PIO de 18-22% [50,51].

A dorzolamida é relativamente estável em soluções aquosas e possui dois valores de pKa: 6,4 e 8,5. Apresenta-se na forma catiónica em pH abaixo de 6,4, na forma aniónica quando o pH está acima de 8,5 e, na sua forma não ionizada em pH entre 6,4 e 8,5. Estudos *in vivo*, demonstram que o efeito da redução da PIO da dorzolamida é maior quando os medicamentos são aplicados em soluções de colírios ligeiramente ácidas (pH 4,4 e 4,9), ou básicas (pH 9,9-9,1), comparativamente com as típicas soluções de colírio neutras (pH 7,1) [49].

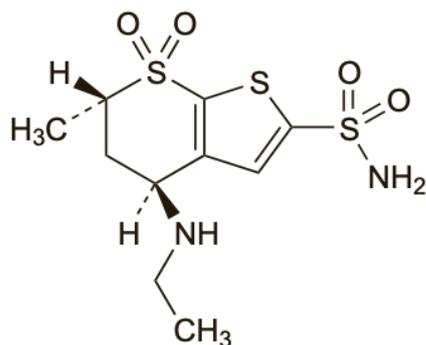


Figura 9. Estrutura química do Cloridrato de Dorzolamida.

## 2.4 Avaliação da Solubilidade de Fármacos na Matriz Polimérica

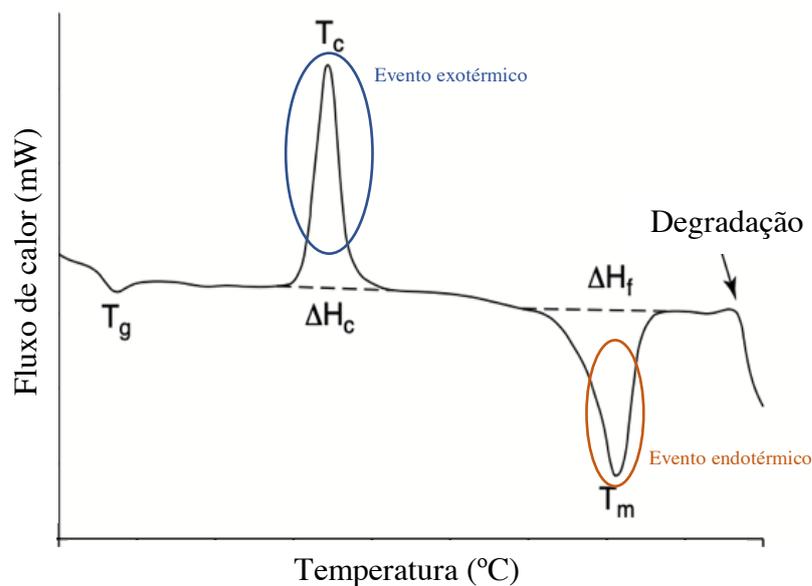
O estudo da solubilidade, parâmetro introduzido por *Hildebrand* e *Hansen*, é uma propriedade-chave no delineamento dos sistemas de libertação controlada, para que a resposta farmacológica desejada seja atingida. Quando se trata de sistemas monolíticos, a quantidade de fármaco dispersa é limitada pela solubilidade do fármaco no polímero fundido, sendo as características dos sistemas poliméricos, controlados por difusão, amplamente determinadas pela solubilidade e difusividade do fármaco na matriz polimérica [52].

De maneira a avaliar o tipo de interação que se estabelece entre o fármaco e a matriz polimérica, recorre-se frequentemente a métodos térmicos, como a **Calorimetria Diferencial de Varrimento** (DSC, do inglês “*Differential Scanning Calorimetry*”), técnica frequentemente utilizada na indústria farmacêutica. Tal deve-se à capacidade de o método fornecer informação acerca dos efeitos do calor associados a alterações físicas e químicas, como as transições de fase, temperaturas de fusão, de transição vítrea e de degradação, bem como a determinação das entalpias. Possibilita também a identificação de polimorfismo e o estudo da compatibilidade entre constituintes das formulações farmacêuticas [53,54]. A utilização desta técnica para a medição quantitativa da solubilidade de fármacos dispersos em matrizes poliméricas foi primeiramente descrita por *Theeuwes et al.* (1974) [52].

A DSC trata-se de uma técnica bem estabelecida que se baseia num modelo padrão, onde é medida a diferença de energia fornecida à amostra em estudo em relação a um material referência, enquanto submetidos a um aumento da temperatura, a uma taxa predeterminada e constante, medindo o fluxo de calor envolvido no processo. Quando uma amostra sofre uma

transformação, esta irá absorver ou libertar calor. Sempre que a temperatura da amostra não coincidir com a do material referência, o equipamento faz variar o fornecimento de calor, mantendo nula a diferença de temperatura [53]. A elevada sensibilidade instrumental a alterações na estrutura dos compostos, aliada à capacidade de efetuar varrimentos numa ampla gama de temperaturas e velocidades, tornam esta técnica amplamente utilizada nos estudos de caracterizações de compostos/formulações. Ademais, são necessárias poucas quantidades de amostra (no estado sólido ou líquido), a qual pode ser sujeita a sucessivos ciclos de aquecimento/arrefecimento [55].

Uma curva típica de uma análise DSC de um polímero semi-cristalino, Figura 10, representa o fluxo de calor (miliwatts) em função da temperatura (°C) [56].



**Figura 10.** Curva resultante de uma análise DSC de um polímero semi-cristalino, evidenciando a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura e entalpia de recristalização ( $T_c$  e  $\Delta H_c$ , respetivamente), temperatura e entalpia de fusão ( $T_m$  e  $\Delta H_f$ ) e o início de degradação. A azul um evento exotérmico e a laranja um evento endotérmico. Adaptado [56]

O estudo da miscibilidade e homogeneidade de misturas binárias entre sistemas fármaco-polímero, baseia-se na temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), indicando se os sistemas são miscíveis ou imiscíveis. Assim, misturas miscíveis apresentam uma só  $T_g$ , resultante de um valor intermédio entre a molécula de fármaco e polímero individualmente, comprovando uma mistura quimicamente homogênea. No caso de misturas imiscíveis, a  $T_g$  dos componentes puros não altera com a composição da mistura, indicando assim um sistema de duas fases [57].

O estudo da solubilidade de fármacos é um dos parâmetros de maior importância para que seja alcançada a concentração sistêmica pretendida. Segundo *Florence et. al.*, a solubilidade é dada “como a capacidade de uma substância no estado sólido, líquido ou gasoso, designada por soluto, se dissolver num solvente, formando uma solução homogênea do soluto no solvente” [58]. Como já mencionado, um dos maiores desafios farmacológicos reside na obtenção de uma boa biodisponibilidade. Os fármacos sólidos podem existir em mais do que uma forma, exibindo diferentes propriedades físico-químicas, como a solubilidade e a velocidade de dissolução. A análise DSC permite identificar o fenómeno de polimorfismo, isto é, a capacidade de um composto cristalizar em várias estruturas distintas. A presença de polimorfos numa estrutura interfere na solubilidade comprometendo, por consequência, a biodisponibilidade, alterando a velocidade de dissolução [59]. Uma estrutura amorfa, caracterizada por uma desordem no arranjo molecular, apresenta propriedades interessantes, do ponto de vista termodinâmico, como os níveis de energia mais elevados e uma maior mobilidade molecular, conferindo melhores propriedades em termos de solubilidade, cinética e dissolução. No entanto, este estado de maior energia implica uma menor estabilidade química e termodinâmica [58].

# Capítulo 3

## Materiais e Métodos

### 3.1 Síntese Polimérica

#### 3.1.1 Síntese de policaprolactona

A PCL foi obtida através de um processo de polimerização em massa, por abertura do anel (ROP) do monómero  $\epsilon$ -caprolactona (99% da *TCI*, Japão), catalisada por um material à base de metal no estado sólido, o estanho.

A reação foi preparada num frasco reacional, onde se começou por colocar um agitador magnético revestido com estanho, de modo a aumentar a área de contacto do catalisador com o reagente. Por cada grama de polímero que se pretende obter, são necessárias 0,4 g de catalisador. Posteriormente, com o auxílio de uma micropipeta, pesaram-se 2,0 g de  $\epsilon$ -caprolactona numa balança analítica, para o frasco reacional. A solução foi pré-aquecida numa estufa (*J.P Selecta*), a cerca de 65 °C, durante 15 minutos. Por fim, foi colocada num banho termostático, sob agitação (100 rpm) e mantida a 130 °C, durante 12 horas. A etapa de pré-aquecimento da reação permite evitar a degradação térmica da  $\epsilon$ -caprolactona (que ocorre a temperaturas superiores a 70 °C), uma vez que se fosse colocada diretamente no banho de óleo, o aquecimento seria mais lento.

#### 3.1.2 Síntese de copolímeros policaprolactona-polietilenoglicol

Para a síntese de copolímeros policaprolactona-polietilenoglicol (PCL/PEG), seguiu-se o mesmo procedimento descrito em 3.1.1, incluindo agora no processo de polimerização em massa PEG de peso molecular 600 g.mol<sup>-1</sup> (*Merck* Alemanha). Assumindo um peso final de reagentes igual a 2,0 g, sintetizaram-se copolímeros utilizando diferentes proporções mássicas: 85%  $\epsilon$ -caprolactona / 15% PEG, 81%  $\epsilon$ -caprolactona / 19% PEG; 77,5%  $\epsilon$ -caprolactona / 22,5% PEG, 75%  $\epsilon$ -caprolactona / 25% PEG; 50%  $\epsilon$ -caprolactona / 50% PEG; 25%  $\epsilon$ -caprolactona / 75% PEG e 22,5%  $\epsilon$ -caprolactona / 77,5% PEG.

Todas as reações foram realizadas sem qualquer solvente – polimerização na massa – não sendo por isso necessário a etapa de extração e purificação, um processo obrigatório quando se utiliza solventes e o produto final se destina a aplicações biomédicas.

Todos os processos de síntese foram realizados no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (DEQ-FCTUC).

## **3.2 Técnicas de Caracterização Polimérica**

### **3.2.1 Calorimetria Diferencial de Varrimento**

As análises térmicas de Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) foram realizadas no CIEPQPF-DEQ, no equipamento *Q100*, da *TA Instruments*. As amostras, com cerca de 2 a 10 mg, foram submetidas a um aquecimento de 10 °C/min, numa gama de temperatura entre 20 e 220 °C. Estes valores têm em conta as temperaturas de degradação dos polímeros e do fármaco utilizados, cujos resultados foram obtidos em análises de TGA, realizadas e descritas em trabalhos anteriores. Os resultados foram analisados através do *software Universal Analysis 2000*, *TA Instruments*.

### **3.2.2 Ressonância Magnética Nuclear**

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), fornecem informação acerca da estrutura e composição química de uma amostra. Esta técnica, aplicada para avaliar a estrutura química e peso molecular dos polímeros e copolímeros sintetizados, foi realizada no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (L-RMN) do Departamento de Química da Universidade de Coimbra, através de um espectrómetro *Bruker Avance III 400 MHz* de 9.4 Tesla. Para isso, recolheram-se as amostras poliméricas, com cerca de 11 mg e dissolveram-se em 1 mL de clorofórmio deuterado, CDCl<sub>3</sub> (99,8%, da Sigma-Aldrich, EUA). Os espetros <sup>1</sup>H RMN resultantes da análise foram processados através do *software MestreNova* da *Mestrelab Research S.L.*

### 3.3 Preparação de Insetos Oculares

#### 3.3.1 Imobilização do Fármaco na Matriz polimérica

Para a preparação dos insetos, procedeu-se a uma imobilização física do fármaco, DZ, por oclusão na matriz polimérica. Primeiramente, foi determinada a quantidade do fármaco necessária imobilizar por inserto, tendo em conta o período terapêutico de ação, para posteriormente proceder à mistura física com o polímero.

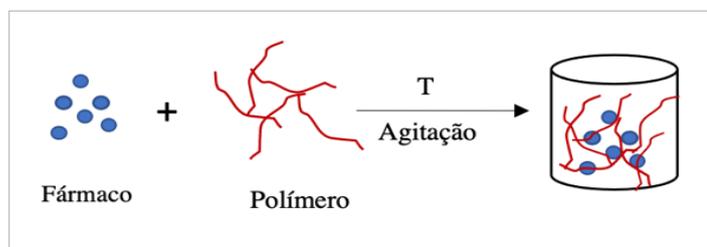
##### Determinação da Quantidade de Fármaco

De forma a determinar a quantidade de fármaco necessária imobilizar por inserto, teve-se como base a formulação terapêutica do COSOPT<sup>®</sup>, um dos colírios comercialmente vendidos utilizado no tratamento do glaucoma, contendo DZ. Relativamente à sua composição quantitativa, cada mL de solução contém 22,26 mg de DZ. A sua utilização pressupõe a administração de uma gota, duas vezes ao dia. Sabendo que cada mL de solução contém aproximadamente 24 gotas, o volume de cada gota será de 42  $\mu$ L [60]. Para a quantificação do fármaco, teve-se ainda em conta que apenas 20 % da dose instilada é retida. Assim, e considerando um período de libertação de 7 dias, são necessárias imobilizar **2,618 mg de DZ**, por inserto.

##### Mistura Física

Sintetizado o copolímero 77,5 / 22,5 (% m/m) PCL/PEG e, determinadas as quantidades de fármaco a utilizar, procedeu-se à sua imobilização na matriz polimérica, através de uma preparação física, Figura 11. Tendo em conta que cada inserto deverá ser constituído por aproximadamente 20 mg de polímero, preparou-se num frasco reacional, uma mistura inicial total com 50 mg e a quantidade equivalente de fármaco. Posteriormente, colocou-se o frasco numa placa de aquecimento a 60 °C, com agitação, durante sensivelmente uma hora. Por fim, colocou-se o frasco à temperatura ambiente para que a mistura solidifique. Uma vez que é pretendido um sistema matricial monolítico, é importante assegurar a homogeneidade da mistura, garantindo que a quantidade de fármaco em cada inserto é aproximadamente a mesma. Para isso, é fundamental verificar a estabilidade do fármaco na mistura. Caso não se obtenha

uma mistura homogênea, com o auxílio de uma espátula, mexe-se vigorosamente a solução, ainda líquida (60 °C), até que arrefeça à temperatura ambiente. Desta forma, à medida que o polímero solidifica, o fármaco deixa de precipitar, e fica homogeneamente distribuído por toda a matriz polimérica.



*Figura 11. Imobilização do fármaco na matriz polimérica, através da mistura física, recorrendo a agitação e temperatura.*

### 3.3.2 Insertos Oculares

Os insertos oculares foram obtidos a partir da formulação resultante da mistura física, apresentando uma geometria hemisférica e de diâmetro igual a 3,5 mm. Para tal, foram utilizados discos de silicone, funcionando como base para conceber aos insertos a forma do diâmetro pretendido. Tendo em conta que cada inserto deverá apresentar um peso final de aproximadamente 22,7 mg (correspondente à quantidade total de polímero e fármaco), com a mistura à temperatura ambiente, pesou-se a respetiva quantidade para o disco de silicone. Posteriormente, levou-se o disco à estufa para fundir a mistura e dar forma ao inserto, a uma temperatura de cerca de 45 °C e por um curto intervalo de tempo (inferior a um minuto), de modo a evitar que o polímero fique demasiado líquido e o que o fármaco não se deposite junto do disco. Por último, e já à temperatura ambiente, o inserto é separado do disco tendo sempre cuidado para não o danificar. Na Figura 12 está demonstrado um esquema simplificado do processo de preparação, assim como do resultado final dos insertos.



*Figura 12. Preparação de um inserto ocular, a partir da mistura física, utilizando discos de silicone com 3,5 mm de diâmetro, submetidos a temperatura (45°C) para fundir e dar origem ao inserto.*

## 3.4 Estudo da Cinética de Liberação

### 3.4.1 Preparação dos meios de dissolução

Para o estudo da cinética de liberação do fármaco, consideraram-se quatro meios de dissolução diferentes, com base nas variações do pH do filme lacrimal. Como já mencionado, o pH normal será próximo de 7,2 e, mesmo em condição de doença, permanece num intervalo entre 5,2 e 8,6. Tendo em conta os valores apresentados, foram preparadas quatro soluções tampão de pH 6, 7, 8 e 9. Para tal, dissolveram-se em água ultrapura saquetas pré-preparadas de cada pH, consoante indicação do fabricante (*BDH Limited Poole England*).

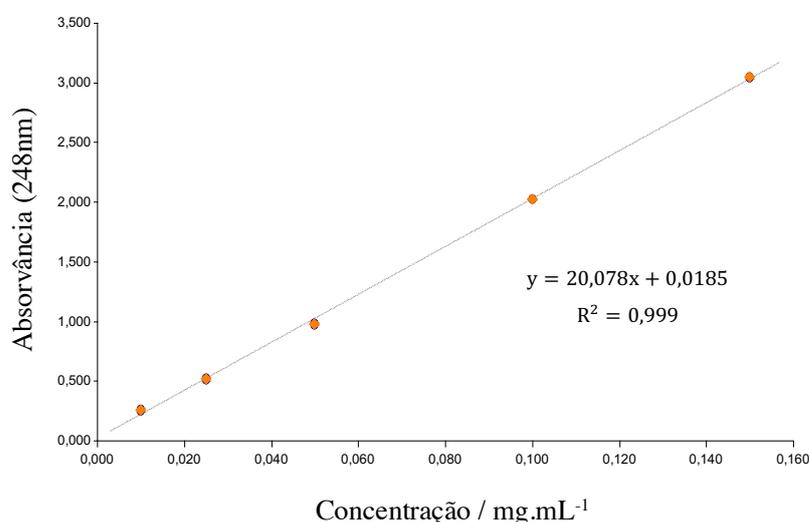
### 3.4.2 Teste de Liberação de Fármaco

Inicialmente, cada inserto foi colocado em frascos individuais que continham a solução, cuja quantidade variava consoante o tempo de permanência do inserto na solução. Atendendo à taxa de renovação do fluido lacrimal e, garantindo as *sink conditions*, de maneira a assegurar que o volume utilizado seria sempre superior ao volume onde se atingiria a saturação, utilizou-se para 24 horas cerca de 3 mL de solução. Os frascos que continham os insertos foram colocados numa estufa a 37 °C. Após o tempo estipulado de permanência em solução (1, 2 ou 3 dias), cada inserto foi transferido do meio onde estava inserido para um novo meio, com as mesmas características. Este procedimento repetiu-se para cada inserto, até serem completados os 7 dias de liberação estipulados inicialmente. Os testes foram feitos em triplicado, de maneira a comparar os resultados obtidos e a verificar os possíveis desvios de resultados dentro do mesmo valor de pH.

A avaliação da cinética de liberação baseia-se na quantificação de fármaco libertado através do inserto e presente em cada solução, ao longo do tempo. Para isso, recorre-se à utilização de um leitor de placas, Synergy™ HTX (Software Gen5, BioTek), onde através da leitura da absorvância de cada solução, é possível determinar a concentração de fármaco. O resultado é analisado através de um gráfico tempo vs percentagem de liberação cumulativa.

### Curva Padrão

Para converter os valores da absorvância em concentração, é necessário recorrer a uma curva de calibração, que relaciona linearmente a concentração do fármaco (x) com a absorvância (y). Desta forma, utilizaram-se amostras de diferentes concentrações conhecidas, através do método de diluições, a partir de uma concentração inicial. As absorvâncias foram lidas para um comprimento de onda fixo ( $\lambda_{DZ} = 248\text{nm}$ ) e relacionadas com a concentração, de modo a se obter a reta padrão, Figura 13. Esta reta permitem determinar a concentração de fármaco presente em cada solução final, nos testes de libertação.



*Figura 13. Curva de calibração referente ao Cloridrato de Dorzolamida (248 nm).*

### **3.5 Modelação matemática - Análise da cinética de libertação**

A cinética de libertação de fármacos em materiais poliméricos, depende essencialmente de três fatores: a **difusão** do fármaco na matriz polimérica; o **inchaço e relaxamento** das cadeias poliméricas; a **degradação** da matriz polimérica, por dissolução ou degradação do polímero. De notar que todos estes fatores estão relacionados entre si, na medida em que tanto a difusão do fármaco, assim como a degradação do polímero são favorecidas pelo intumescimento do polímero.

A penetração do solvente no sistema matricial é o primeiro processo de inchaço do polímero. Consequentemente, há um aumento da mobilidade das cadeias poliméricas, favorecendo assim o transporte do fármaco dissolvido. Por sua vez, o aumento do volume vazio provocado pela libertação do fármaco e a degradação do polímero, facilita o intumescimento do polímero [16].

A modelação matemática assume um papel importante para a compreensão do comportamento da cinética de libertação de fármacos. Um modelo elaborado por *Ritger* e *Peppas*, em 1987, descreve de forma simplificada os mecanismos de libertação de fármacos a partir de sistemas poliméricos, utilizando uma equação semi-empírica, Equação 2 [61][62].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (2)$$

Onde  $\frac{M_t}{M_\infty}$  representa a quantidade de fármaco libertado num período de tempo  $t$ ;  $k$  corresponde a uma constante cinética, que incorpora as características estruturais e geométricas do dispositivo, e  $n$  é o expoente difusional que indica o tipo de mecanismo de libertação. Este modelo apenas é válido para uma análise da cinética nos primeiros 60 % de libertação [61][62]. Para a determinação dos valores de  $n$  e  $k$ , recorre-se à logaritmização da equação anterior, obtendo-se assim a Equação 3:

$$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \log(k) + n \log(t) \quad (3)$$

Os valores do expoente difusional,  $n$ , descrito na literatura, variam consoante o mecanismo de libertação e geometria, e encontram-se descritos na Tabela 3 [61].

**Tabela 3.** Exponente difusional,  $n$ , em função do mecanismo de libertação e forma geométrica.

Plana	Cilíndrica	Esférica	Mecanismo
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anómalo <sup>†</sup>
1,0	0,89	0,85	Caso II*

\*Caso II ou transporte controlado por relaxamento- ocorre quando o processo de difusão é mais rápido do que o processo de relaxamento das cadeias do polímero. Assim, a difusão passa a ser controlada pela cinética de relaxamento e não segundo a lei de Fick.

<sup>†</sup>No transporte anómalo ou não Fickiana, envolve a sobreposição de ambos os fenómenos, mecanismo Fickiano e Caso II.

Quando  $n=1$ , a taxa de libertação do fármaco é independente do tempo, correspondendo a uma cinética de libertação de ordem zero.

Para além do modelo descrito, *Peppas e Sahlin*, em 1989, na tentativa de quantificar as contribuições relativas dos dois fenómenos responsáveis pela libertação, difusão e relaxamento das cadeias, desenvolveram um modelo que descreve a cinética de libertação controlada através dos dois mecanismo. Assim, e de acordo com a Equação 2, obtém-se:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \quad (4)$$

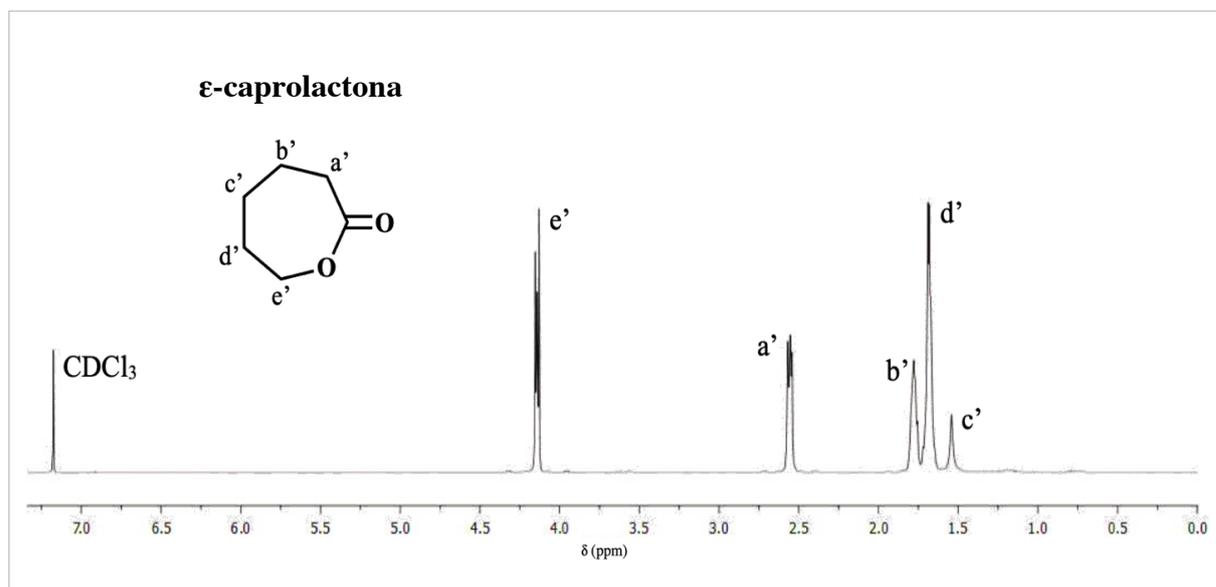
Onde  $m$  corresponde ao expoente de difusão para um dispositivo de qualquer forma geométrica, para um comportamento puramente Fickiano, que exhibe uma libertação controlada. O primeiro termo da equação diz respeito ao contributo Fickiano e o segundo ao contributo do relaxamento das cadeias do polímero [63].

# Capítulo 4

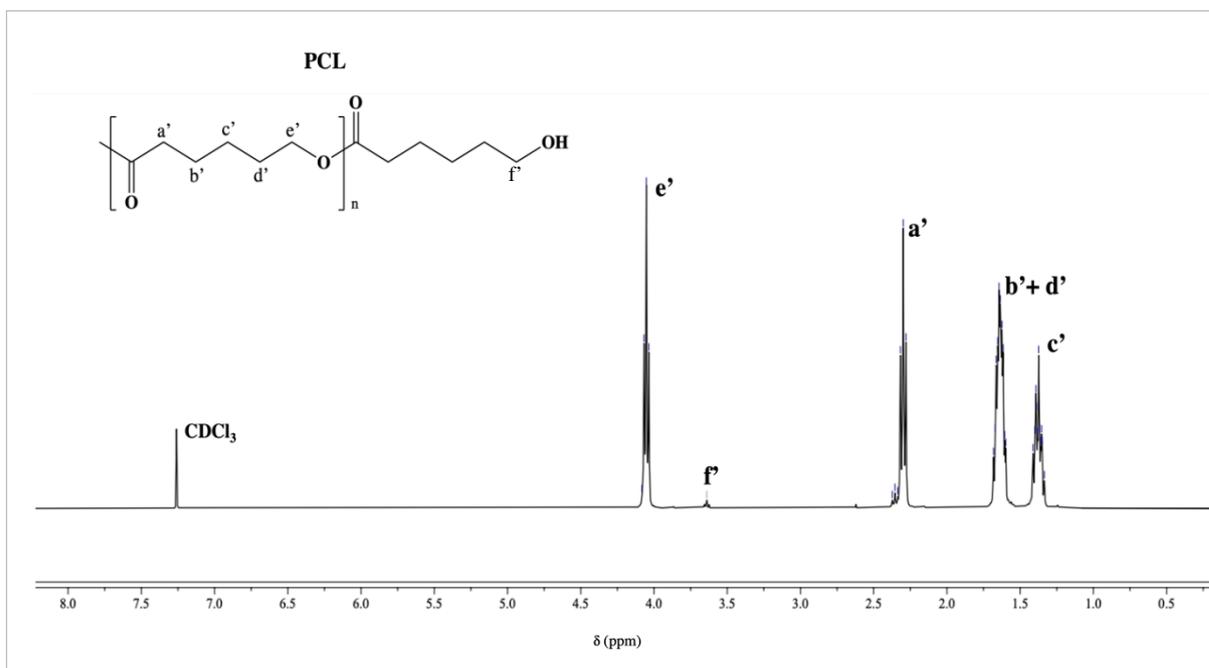
## Resultados e Discussão

### 4.1 Análise RMN dos copolímeros

A técnica de RMN permite, através dos espectros  $^1\text{H}$ -RMN, identificar as estruturas químicas da PCL e dos copolímeros sintetizados, assim como determinar o peso molecular e a quantidade percentual de PEG e PCL presente no copolímero final. Os resultados foram avaliados através do *software* MestReNova. Os espectros resultantes da análise apresentam vários picos, de acordo com os átomos de hidrogénio existentes nas moléculas. De notar que, o pico característico referente ao solvente utilizado (clorofórmio deuterado) está situado em 7,260 ppm. Como referência e para efeito de cálculo, foi utilizado o espectro  $^1\text{H}$ -RMN relativo à  $\epsilon$ -caprolactona, Figura 14, realizado em trabalhos anteriores [16]. O resultado obtido pela análise RMN da amostra da PCL sintetizada encontra-se apresentado na Figura 15.



**Figura 14.** Em cima apresenta-se a estrutura química da  $\epsilon$ -caprolactona, seguindo-se do respetivo espectro  $^1\text{H}$ -RMN obtido [16].



**Figura 15.** Em cima apresenta-se a estrutura química da PCL, seguindo-se do respetivo espetro <sup>1</sup>H-RMN obtido. O pico representado a laranja corresponde à ε-caprolactona residual, que não reagiu.

Pela comparação entre as **Figura 14** (monómero) e **15** (polímero) verifica-se que, após ocorrer a polimerização, há alterações no sinal (a'), referente ao grupo metilo próximo do átomo de oxigénio do grupo cetona, verificando-se um deslocamento menor quando comparado com o mesmo sinal no espetro do monómero – de 2,5 a 2,2 ppm. Há medida que ocorre a reação, o pico (a') referente ao monómero vai desaparecendo, aumentando o respetivo pico no espetro do polímero. Este, apresenta um tamanho muito pequeno, uma vez que corresponde à quantidade de ε-caprolactona residual, que não reagiu. Através desta diferença, é possível determinar a taxa de conversão do monómero em polímero, dada pela razão entre a área do pico (a') correspondente ao espetro da PCL e o somatório entre a área do mesmo pico correspondentes aos dois componentes, como demonstrado na Equação 5.

$$\text{conv} = \frac{A_{a'PCL}}{A_{a'PCL} + A_{a'CL}} \quad (5)$$

Desta forma, foi conseguida uma **conversão** de **99,74 %**.

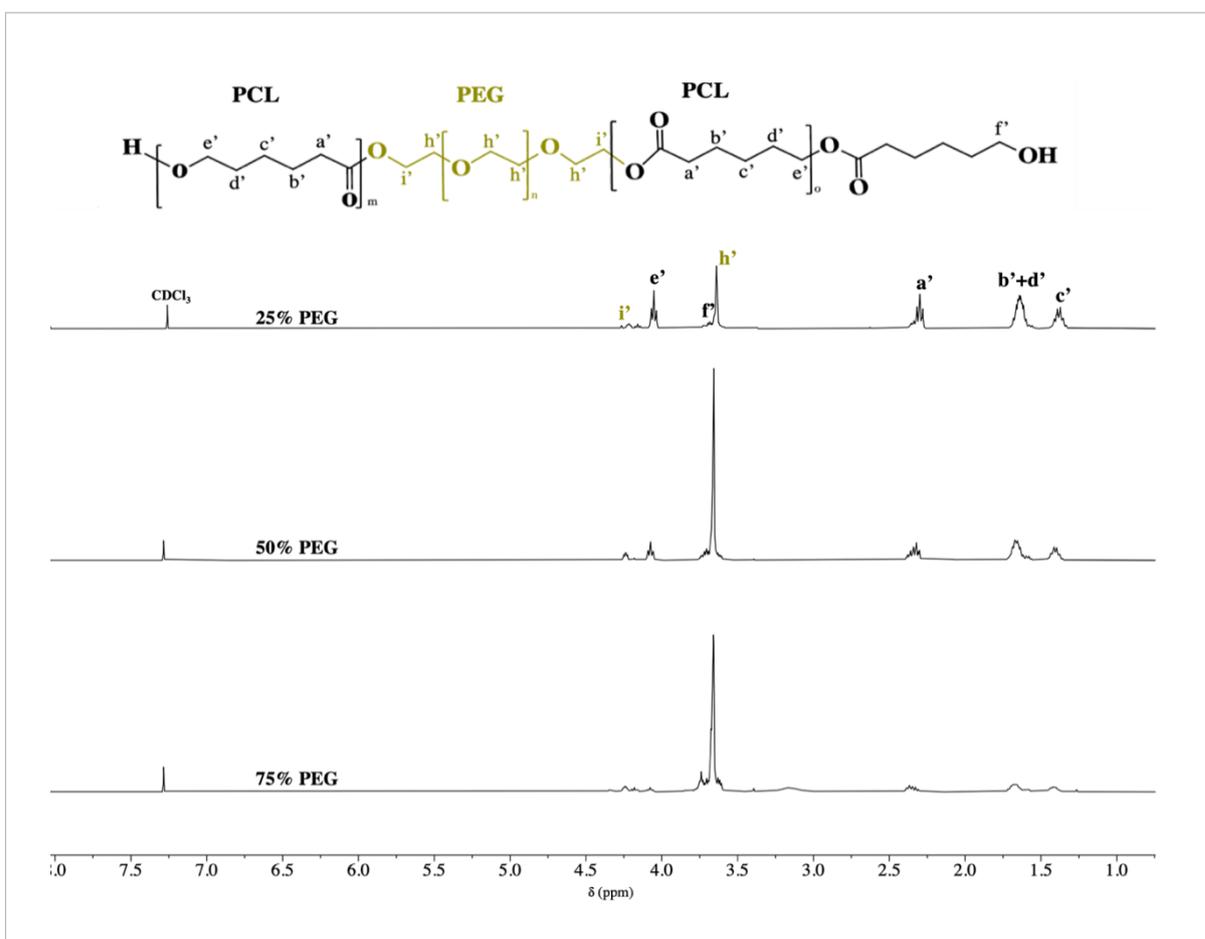
Os picos associados aos prótons da molécula PCL, apresentados no espectro da **Figura 15**, foram identificados tendo por base dados da literatura [64]. O sinal (f'), correspondente a um deslocamento de 3,6 ppm, diz respeito à ligação de prótons dos grupos metilo aos grupos terminais hidroxilo, demonstrando a abertura do anel do monómero.

O peso molecular da PCL sintetizada é determinado pelo somatório do peso molecular das unidades de repetição e do peso das cadeias terminais ( $Mn_{term}$ - isto é, a massa molecular de  $\epsilon$ -CL e a massa molecular de um hidrogénio, assumindo um valor de  $115 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Por sua vez, o peso molecular das unidades de repetição é dado pelo produto entre o peso molecular da  $\epsilon$ -caprolactona, a conversão e o grau de polimerização (dado pela razão entre os sinais (a') e (f')). Assim, o peso molecular da PCL é determinado de acordo com a Equação 6:

$$Mn_{PCL} = \left( Mn_{\epsilon-CL} \times conv \times \frac{A_{a'PCL}}{A_{f'}} \right) + Mn_{term} \quad (6)$$

A PCL sintetizada apresenta um peso molecular de **4530 g.mol<sup>-1</sup>**

As amostras dos copolímeros com 25, 50 e 75 % de PEG, de peso molecular  $600 \text{ g.mol}^{-1}$ , foram sintetizadas nas condições padrão inicialmente referidas: 12 horas de reação, a  $130 \text{ }^\circ\text{C}$ , cuja razão catalisador/reagentes é 2/5 e a quantidade total de monómeros igual a 2 g. Na Figura 16, encontram-se os espectros resultantes da análise RMN dos copolímeros sintetizados.



**Figura 16.** Em cima apresenta-se a estrutura química do copolímero PCL/PEG, seguindo-se dos espetros  $^1\text{H}$ -RMN de amostras do copolímeros sintetizado, com 25,50 e 75 % de PEG na composição final.

Na **Figura 16**, é possível identificar os sinais correspondentes à presença de átomos de hidrogénio no monómero, nomeadamente o sinal ( $\text{h}'$ ), e o sinal ( $\text{i}'$ ) referente à ligação terminal com a molécula da PCL. De acordo com a quantidade percentual de PEG presente no copolímero, estes sinais são alterados, verificando-se um aumento da área do sinal atribuído ao pico ( $\text{h}'$ ), relativamente aos sinais da PCL, com o aumento da percentagem de PEG no copolímero.

### Determinação do peso molecular dos copolímeros

O peso molecular é considerado uma característica crítica dos polímeros, sendo que as propriedades dos copolímeros variam, dependendo do tamanho das suas cadeias poliméricas: copolímeros com baixo peso molecular apresentam taxas de degradação mais rápidas, interferindo assim na cinética de libertação dos fármacos imobilizados na matriz polimérica.

O peso molecular dos copolímeros é dado pelo somatório entre o peso molecular individual dos polímeros constituintes. Dado que, o peso molecular do PEG é conhecido ( $M_{n,PEG} = 600 \text{ g.mol}^{-1}$ ), este será uma referência para a determinação do peso molecular da PCL. Considerando o grau de polimerização do PEG dado como o quociente entre o seu peso molecular e a massa molar da unidade de repetição ( $44 \text{ g.mol}^{-1}$ ) e, assumindo que uma unidade de PEG é constituída por 4 átomos de hidrogénio, é possível determinar o número total de hidrogénios, por cada molécula de PEG, de acordo com a Equação 5.

$$n_H = \frac{M_{n,PEG}}{MM_{PEG}} \times 4 \quad (5)$$

O peso molecular da PCL, foi determinado através do produto entre a razão das áreas dos sinais dos prótons (e') e (h'), correspondente à PCL e ao PEG, o grau de polimerização anteriormente definido e, pela massa molar da unidade de repetição ( $114 \text{ g.mol}^{-1}$  no caso da  $\epsilon$ -caprolactona). Uma vez que o valor do sinal (e') corresponde a dois átomos de hidrogénios, é necessário dividir o resultado por metade, de modo a se obter o número total de unidade de repetição da PCL por cada unidade de PEG. Em suma, o peso molecular da PCL pode ser determinado segundo a Equação 6.

$$Mn_{PCL} = 2 \left( \frac{M_n}{MM} \right)_{PEG} \times \frac{A_{e'}}{A_{h'}} \times M_{u.r.} \quad (6)$$

Para a determinação da razão PCL/PEG, recorre-se ao quociente entre o somatório das áreas dos sinais referentes a cada espécie. A percentagem de cada polímero na composição final do copolímero, é determinada pelo quociente entre a soma das áreas dos sinais referentes a cada espécie e o total dos picos do copolímero, como exemplificado na Equação 7. A determinação da percentagem de PEG segue a mesma metodologia.

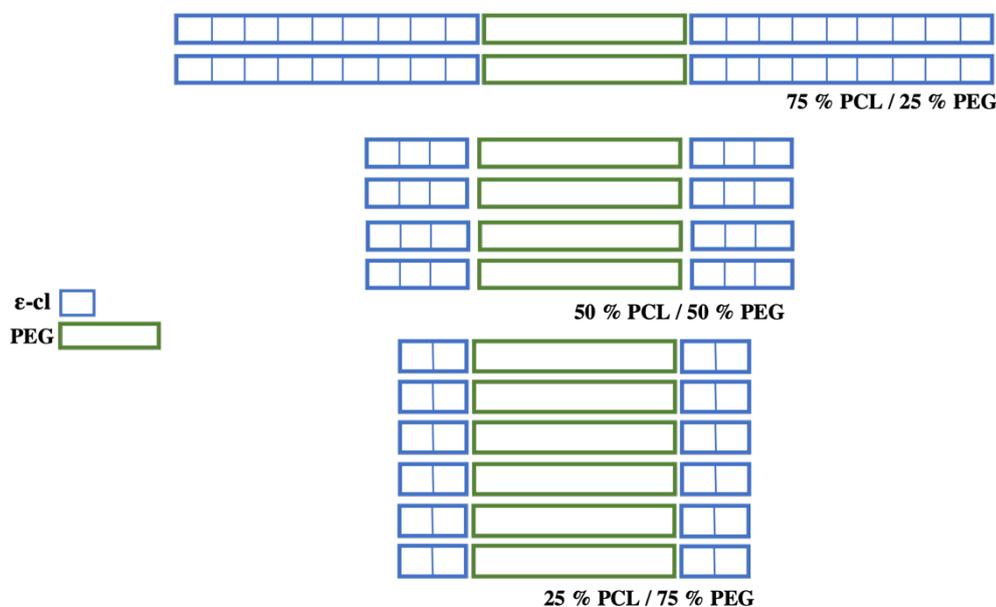
$$\%_{PCL} = \frac{A_{a'} + A_{b'} + A_{c'} + A_{d'} + A_{e'}}{A_{a'} + A_{b'} + A_{c'} + A_{d'} + A_{e'} + A_{h'} + A_{i'}} \quad (7)$$

Deste modo, foi determinado o peso molecular de cada copolímero sintetizado, assim como a razão PCL/PEG e as respetivas percentagens. Os resultados encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4.** Valores obtidos na análise RMN, do peso molecular da PCL e dos copolímeros sintetizados e a percentagem de PEG e PCL no copolímero final.

% PCL/PEG	$M_{n,PCL}/$ g.mol <sup>-1</sup>	PCL/PEG	% PCL	% PEG	$M_n/$ g.mol <sup>-1</sup>
<b>75/25</b>	2456	4,10	80,4	19,6	3056
<b>50/50</b>	573	1,20	54,6	45,4	1173
<b>25/75</b>	111	0,48	29,0	71,0	711

Os resultados de RMN apresentados na **Tabela 4**, demonstram uma quase proporcionalidade inversa relativamente ao peso molecular obtido e à percentagem de PEG utilizada, isto é, copolímeros com pesos moleculares mais elevados são conseguidos quando é utilizada uma menor percentagem de PEG. Isto pode facilmente ser explicado se forem tidos em conta dois fatores: - o peso molecular da molécula de PEG (600 g.mol<sup>-1</sup>), bastante inferior ao peso molecular obtido da PCL (4530 g.mol<sup>-1</sup>); - o peso molecular da unidade de repetição de PEG (44 g.mol<sup>-1</sup>), é menor comparativamente com a  $\epsilon$ -caprolactona (114 g.mol<sup>-1</sup>). Na **Figura 17**, está apresentado um esquema que permite uma melhor compreensão visual relativamente à quantidade de PEG existente no copolímero, face à disponibilidade de moléculas de  $\epsilon$ -caprolactona. Neste caso, quanto maior a quantidade de PEG na mistura reacional, mais sítios ativos existem, no entanto menor será a quantidade de monómeros  $\epsilon$ -caprolactona disponíveis para formar as cadeias. Tendo o PEG um peso molecular muito menor que a PCL, copolímeros com maior percentagem de PEG irão apresentar menor peso molecular final, comparativa com os copolímeros onde a quantidade de PCL predomina.

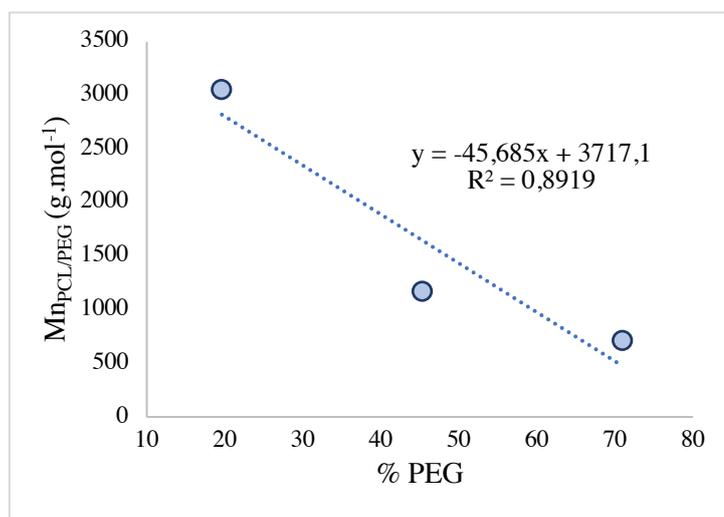


**Figura 17.** Ilustração simplificada da proporção entre a quantidade de PEG e PCL nos copolímeros.

É importante considerar que a percentagem inicial de PEG corresponde à quantidade misturada com  $\epsilon$ -caprolactona, antes de ser realizada a reação. Já a percentagem determinada através da análise RMN, representa a quantidade de PEG presente no copolímero final, após ocorrer a reação, podendo ser notadas diferenças no valor, relativamente à quantidade inicial. Uma percentagem de PEG final superior pode ser justificada pela incerteza associada aos cálculos da conversão  $\epsilon$ -caprolactona, assim como pela possível degradação térmica deste monómero. A análise térmica de DSC feita à  $\epsilon$ -caprolactona, em estudos anteriores, demonstrou que esta sofre a principal degradação na gama de temperaturas de 70 a 140 °C, incluindo assim a temperatura utilizada na síntese dos copolímeros [16].

Em 1989, *Andruzzi et al.*, descobriram que a quantidade de PEG presente nos copolímeros é inversamente proporcional ao seu peso molecular final, confirmando os resultados obtidos. Assim, uma boa correlação linear permite controlar o peso molecular de um copolímero, alterando corretamente a percentagem de PEG [65].

Todavia, através da **Figura 18**,



**Figura 18.** Efeito da percentagem de PEG 600 no peso molecular final do copolímero PCL/PEG.

verifica-se que não se obteve uma boa linearidade nos valores obtidos pela análise RMN, relativos ao peso molecular dos copolímeros em função da percentagem de PEG, registrando-se um valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,8911. O declive negativo da linha de tendência confirma a proporcionalidade inversa entre as duas variáveis.

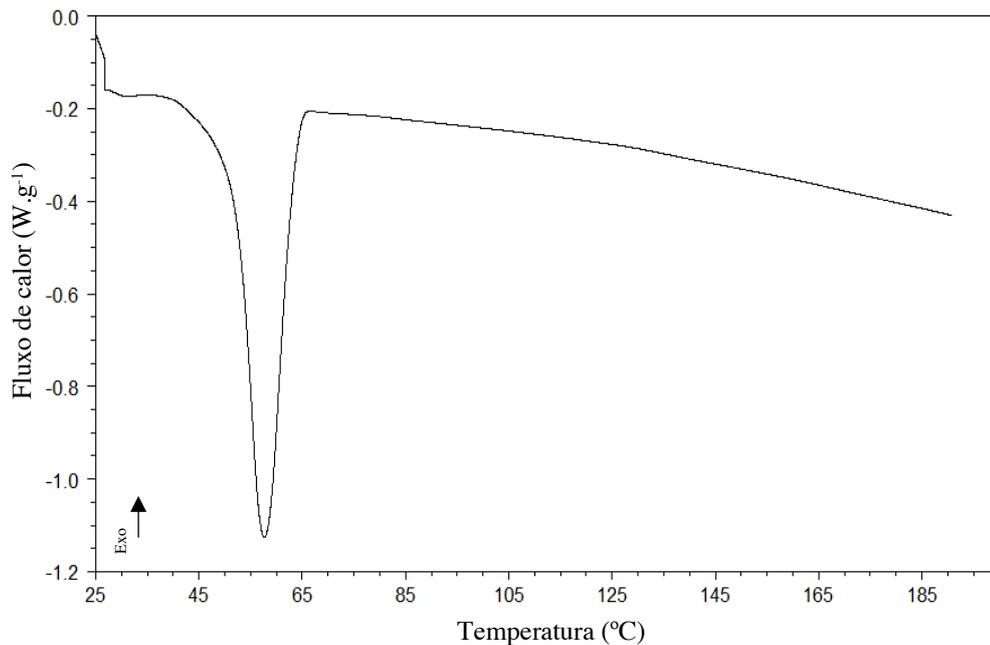
## **4.2 Análise térmica- DSC**

As características de libertação de fármacos, através de sistemas poliméricos de libertação controlada, são amplamente determinadas pela solubilidade do fármaco na matriz polimérica. Contudo, a quantificação da solubilidade de qualquer substância dentro de uma matriz polimérica não se trata de um processo simples [52]. A caracterização térmica por DSC, permite obter informações acerca do estado cristalino dos polímeros e dos fármacos, bem como das interações entre os dois compostos.

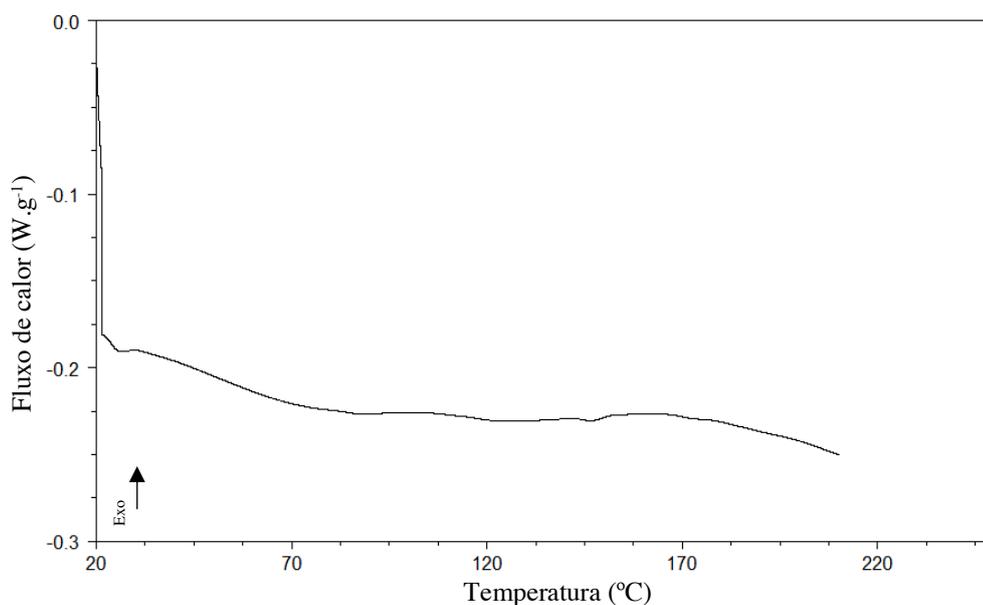
Os polímeros e copolímeros sintetizados, assim como o fármaco utilizado, foram sujeitos a uma análise DSC. Os resultados são apresentados através de um gráfico conhecido como termograma, que relaciona o fluxo de calor ( $W.g^{-1}$ ) em função da temperatura, correspondentes a um processo de aquecimento.

### **Homopolímeros**

Na Figura 19 e 20 estão apresentados os termogramas dos homopolímeros da PCL sintetizada e do PEG, respetivamente, submetidos a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.



**Figura 19.** Termograma referente à PCL sintetizada, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min.



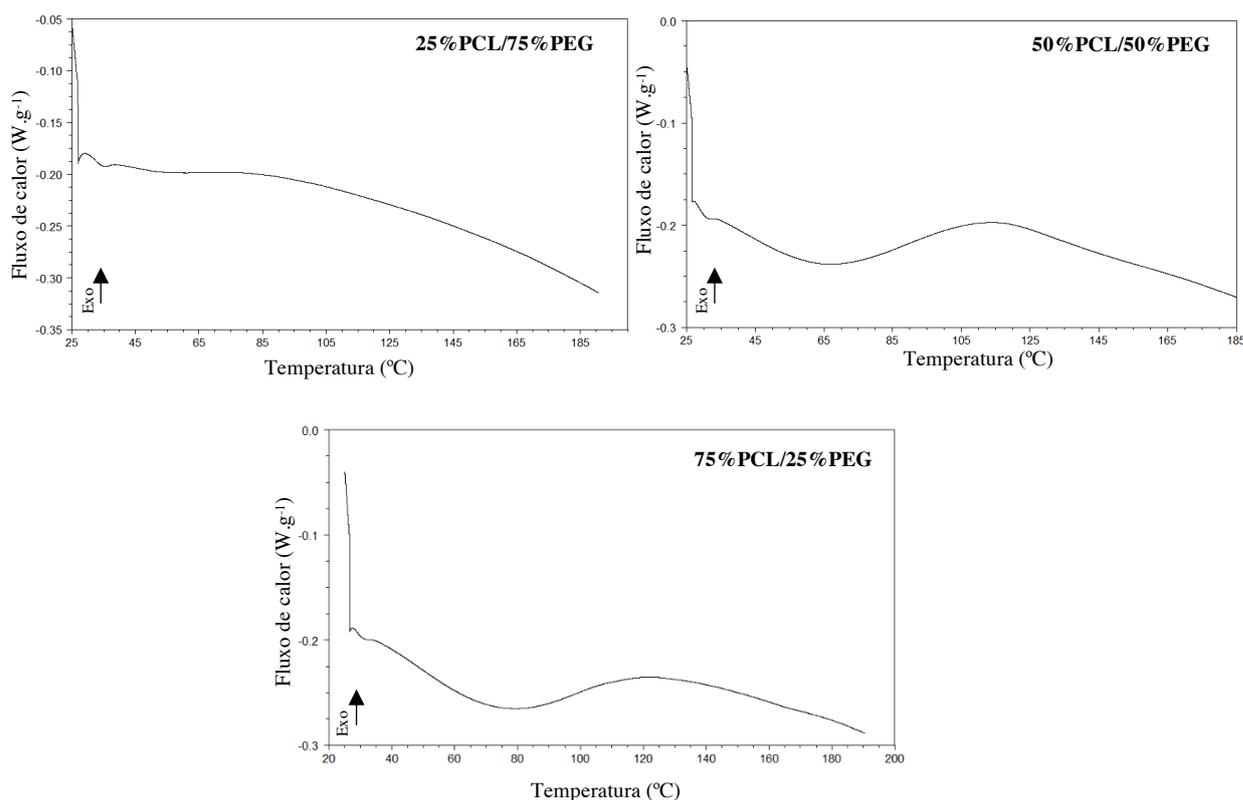
**Figura 20.** Termograma referente ao PEG 600, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

No termograma referente à PCL sintetizada, **Figura 19**, está evidenciado um pico endotérmico acentuado, correspondente à temperatura de fusão ( $T_m = 58\text{ °C}$ ) – temperatura à qual, durante o aquecimento, desaparecem as regiões cristalinas com a fusão, atingindo-se a energia necessária para que seja possível quebrar as forças intermoleculares entre as cadeias, destruindo o empacotamento da estrutura. A PCL é assim definida como uma estrutura semi-

crystalina, onde as cadeias poliméricas se encontram próximas e organizadas. Ao invés, através da curva térmica do PEG, **Figura 20**, é possível concluir que se trata de uma estrutura amorfa, não apresentando uma temperatura de fusão, sendo caracterizada pela ausência de transições de fase com o aumento da temperatura. As estruturas amorfas, contrariamente a estruturas cristalinas, são caracterizadas por um arranjo desordenado das moléculas.

### Copolímeros

Os copolímeros sintetizados foram submetidos à análise térmica de DSC, por forma a avaliar o impacto de cada segmento do copolímero no comportamento térmico global do copolímero. Os termogramas resultantes da mistura química entre os polímeros, encontram-se na Figura 21, cuja taxa de aquecimento foi de 10 °C/min. Os gráficos estão identificados no canto superior direito com as percentagens mássicas utilizadas de cada polímero.



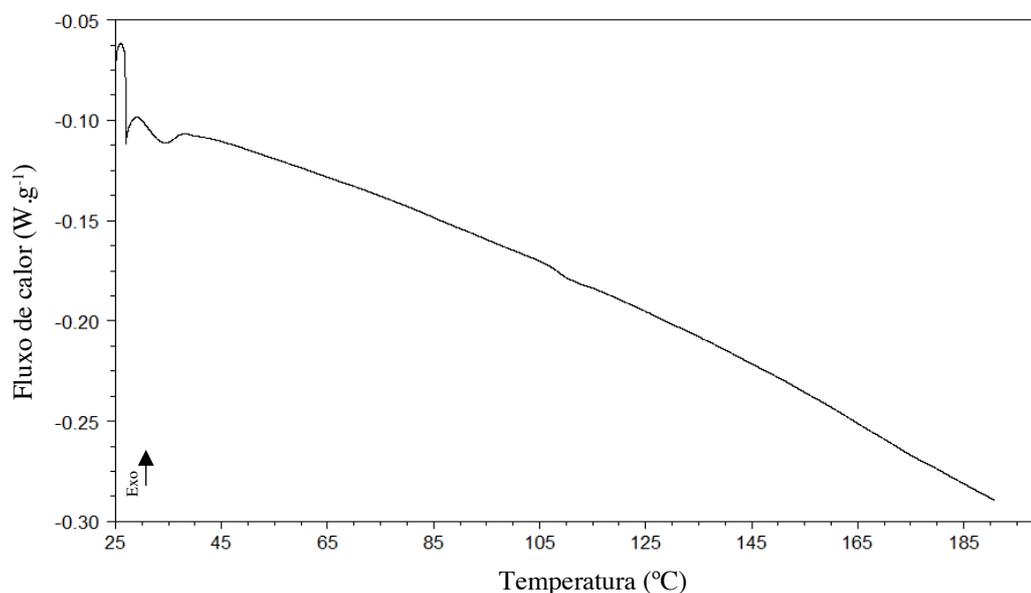
**Figura 21.** Termogramas referentes aos copolímeros PCL/PEG, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

A análise dos gráficos da **Figura 21**, baseou-se particularmente na avaliação do comportamento apresentado pela curva térmica obtida em cada copolímero. À primeira instância, é possível constatar que, ocorreram mudanças significativas nos termogramas, comparativamente com o resultado obtido no homopolímero da PCL (Figura 19). A presença do PEG influenciou o comportamento térmico individual da PCL, isto é, a mistura química entre os polímeros resultou numa perda do pico endotérmico de fusão acentuado, indicativo de uma natureza cristalina. De acordo com os gráficos, quanto maior a percentagem de PEG, maior a tendência que a curva térmica do copolímero apresenta para descrever um estado amorfo, desaparecendo, por consequência, o pico de fusão da PCL. Um copolímero composto por 25/75 (% m/m) de PCL/PEG, pressupõe um comportamento térmico bastante semelhante ao termograma do PEG puro, dado que o PEG prevalece em maior quantidade na estrutura, concebendo ao copolímero um comportamento mais amorfo.

### **Fármaco- Cloridrato de Dorzolamida**

Como já referido, os fármacos sólidos podem apresentar-se em mais do que uma forma sólida, exibindo diferentes propriedades físico-químicas, como é o caso da solubilidade. Através da análise de DSC, é possível identificar o fenómeno de polimorfismo. A presença de polimorfos interfere na solubilidade comprometendo, por consequência, a biodisponibilidade, alterando a velocidade de dissolução [59].

O fármaco utilizado, cloridrato de dorzolamida, foi submetido a uma análise térmica de DSC, Figura 22, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.



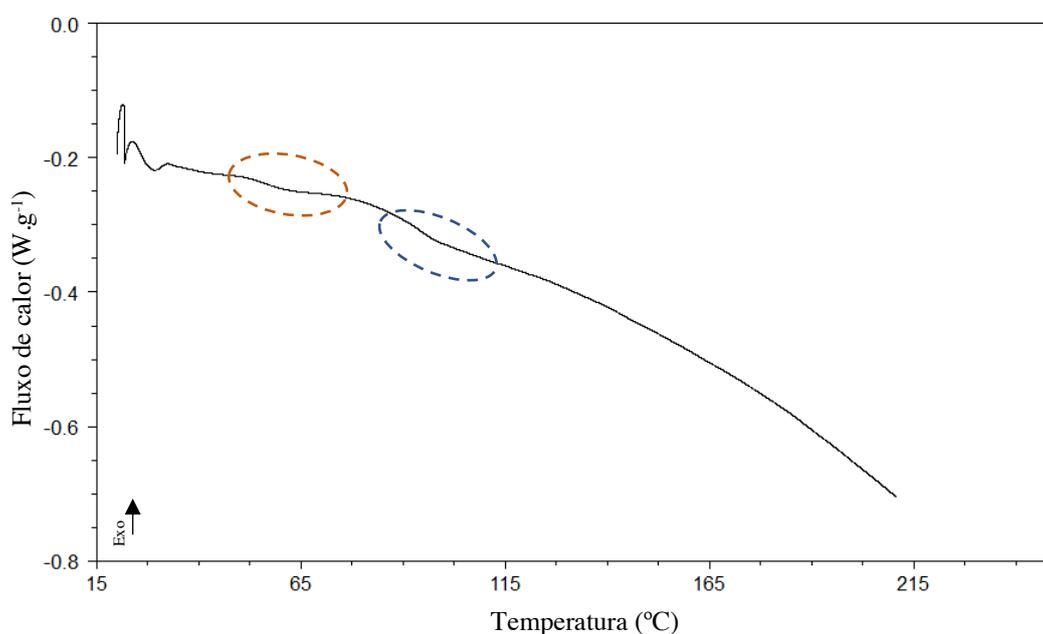
**Figura 22.** Termograma referente ao cloridrato de dorzolamida, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

Na **Figura 22**, não foi detetado nenhum evento térmico, facto este que indica que o cloridrato de dorzolamida apresenta uma estrutura amorfa, verificando-se apenas uma ligeira alteração na curva por volta dos 105 °C. As estruturas amorfas apresentam propriedades interessantes em termos de solubilidade e cinética de dissolução, isto é, encontram-se em estados de energia mais elevados, apresentando uma maior mobilidade molecular.

A utilização de formas amorfas dos fármacos pode ser uma abordagem útil no incremento da solubilidade, devido ao aumento da mobilidade no sistema, comparativamente com as formas cristalinas. No entanto, são caracterizados por uma menor estabilidade química e térmica, comparativamente com as estruturas cristalinas.

### Mistura Física: Polímero + fármaco

De modo a avaliar as interações entre o fármaco e o polímero, como a solubilidade, procedeu-se ao estudo térmico de uma amostra resultante da mistura física entre o copolímero e o fármaco. A proporção mássica utilizada entre copolímero-fármaco foi de 10:3, tendo sido utilizado o copolímero composto por 75 % de PEG. Na Figura 23, está representado o termograma resultante da mistura do fármaco com o copolímero.



**Figura 23.** Termograma referente à mistura do copolímero 25/75 % (m/m) de PCL/PEG com DZ, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.

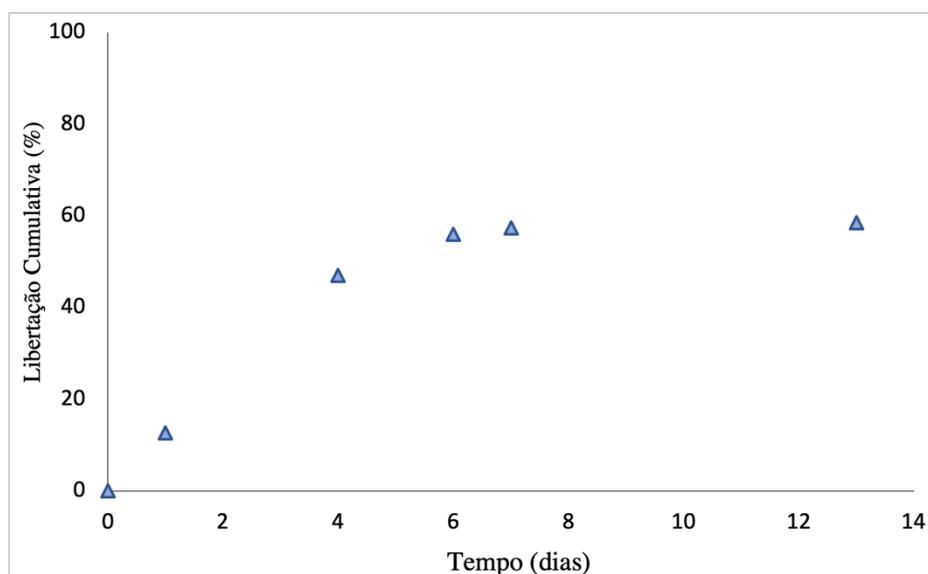
A **Figura 23** fornece informações importantes acerca da solubilidade do fármaco na matriz do copolímero. O termograma da mistura do copolímero com o cloridrato de dorzolamida mostrou ser possível distinguir as alterações térmicas associados a cada componente: a laranja, está representada uma ligeira alteração revelada no termograma individual do copolímero (Figura 21); a alteração da curva representada a azul corresponde a um comportamento característico do cloridrato de dorzolamida, como é possível observar na análise feita ao fármaco individual (Figura 22).

Apesar de não existirem eventos térmicos evidentes, o facto de se poder observar um detalhe característico do copolímero e outro que está presente no termograma referente ao fármaco, demonstra que não existe interferência mútua do comportamento térmico, permitindo assim concluir que o fármaco não se encontra solubilizado na matriz polimérica. Caso contrário, seria de esperar que as alterações exibidas nos termogramas individuais, fossem atenuadas aquando da mistura, dando origem a uma curva com um novo comportamento, não sendo possível identificar as modificações individuais com o aumento da temperatura.

### **4.3 Cinética de Libertação - Teste Piloto**

A formulação tem impacto direto na taxa de libertação do fármaco. Sendo o PEG uma molécula hidrofílica, atrai água para a matriz polimérica e, conseqüentemente acelera o mecanismo de difusão. Assim, é esperado que um aumento da percentagem de PEG, gere uma taxa de libertação mais rápida, para a mesma quantidade de fármaco. De maneira a certificar que a formulação definida estaria ajustada a um perfil de libertação de 7 dias, isto é, a utilização de um inserto composto por 20 mg de copolímero contendo 22,5 % PEG (massa/massa) e 2,62 mg de DZ (quantidade correspondente a uma ação terapêutica de 7 dias, conforme calculado em 3.3.1), procedeu-se inicialmente a um teste piloto. Este foi realizado numa solução de pH neutro, conforme o procedimento descrito em 3.4.2).

O resultado do perfil cinético obtido da libertação de DZ através de um inserto polimérico, é apresentado na Figura 24.



**Figura 24.** Perfil cinético de liberação de DZ, através de um inserto contendo 22,5 % de PEG, durante 14 dias.

Através dos resultados apresentados na **Figura 24**, conclui-se que ao fim de 7 dias, não se obteve a liberação mínima desejada, de pelo menos 80 %, tendo-se registado um valor de apenas aproximadamente 58 %. Desta forma, prolongou-se o tempo liberação até 14 dias, a fim de verificar se, após os 7 dias, ainda havia fármaco a ser libertado através do inserto. Os dados da figura indicam que a quantidade de fármaco estabilizou ao sétimo dia, não havendo alterações significativas ao fim do décimo quarto dia, registando-se uma liberação total de apenas 60 %.

Desta forma, e de maneira a estudar as possíveis interferências que estariam na origem da reduzida percentagem de liberação do fármaco, procedeu-se a um conjunto de testes, antes de serem realizados os estudos de liberação, em meios com diferente pH.

Todos os testes foram realizados utilizando uma solução neutra (pH 7) e copolímero contendo 22,5 % (massa) de PEG 600.

### **Caso de Estudo I – Adsorção do fármaco na matriz polimérica**

- Inicialmente foi estudada a possível ocorrência de adsorção do fármaco na matriz polimérica, isto é, a adesão das moléculas do fármaco à superfície sólida do polímero. Para isso, utilizou-se um frasco onde foram espalhadas nas paredes 20 mg de polímero. Acrescentou-se 5 mg de DZ e 10 mL de solução. O frasco foi colocado numa estufa, a 37 °C, durante 24 horas. Posteriormente, determinou-se a

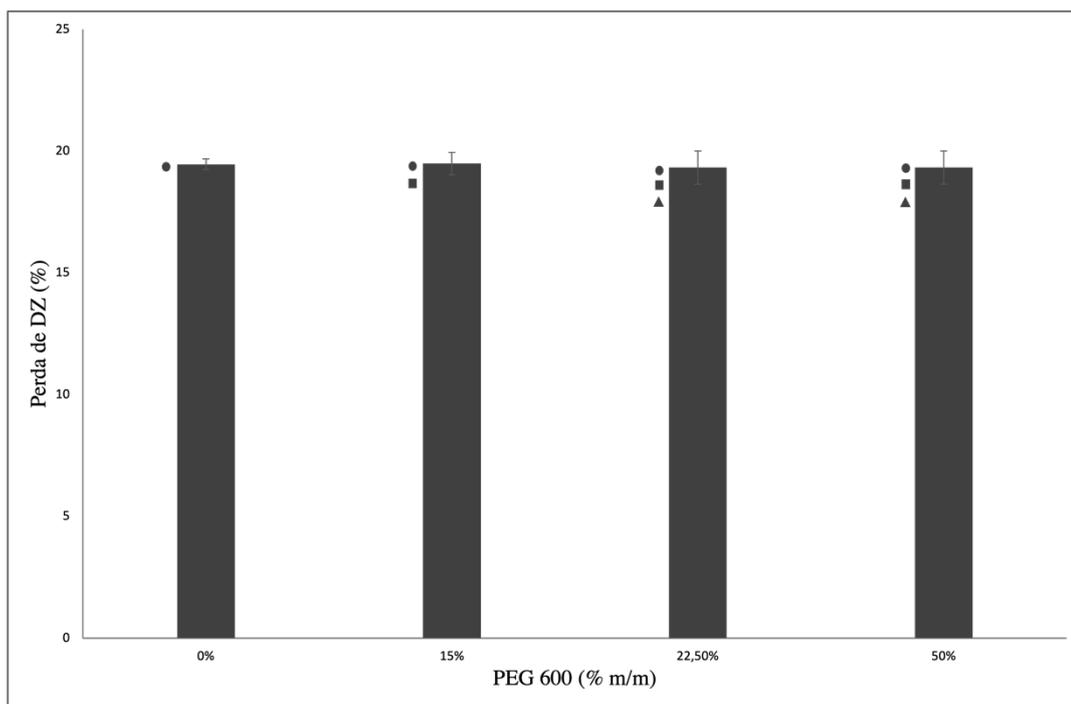
quantidade de fármaco presente em solução, com recurso ao leitor de microplacas. Dado que, ao fim de 24 horas a quantidade de fármaco obtida corresponde à quantidade inicialmente pesada, admitiu-se de partida que não ocorreu o processo de adsorção. Caso contrário, dada a adesão das partículas do fármaco ao polímero, a quantidade deste em solução seria menor.

No entanto, as condições de realização do teste não são as mesmas que se observam num inserto, isto é, na preparação do inserto, o fármaco é misturado e, provavelmente, solubilizado numa amostra fundida de polímero, enquanto neste teste de adsorção o fármaco é dissolvido em água e só depois é colocado em contacto com o polímero no estado sólido. Deste modo, o facto de se ter concluído que durante o teste não ocorreu a adsorção do fármaco no polímero, a hipótese não pode ser totalmente descartada no contexto do inserto (onde ocorre interação entre os constituintes). Assim, o resultado deste caso de estudo é **inconclusivo**.

#### **Caso de Estudo II – Interferência da formulação (% de PEG 600)**

- Como já referido, uma vez que a formulação do copolímero interfere na cinética de libertação do fármaco, executou-se um estudo onde se fez variar a percentagem mássica de PEG, a fim de verificar qual a influência desta variação na quantidade total de fármaco libertado. Para isso, foram utilizados vários copolímeros, de diferentes composições: **0, 15, 22,5 e 50 % de PEG**. Inicialmente pesou-se para um frasco 20 mg de copolímero e 5 mg de DZ. O frasco contendo a mistura foi colocado num banho com agitação, a 70 °C, durante cerca de 20 minutos, para homogeneizar a mistura. Acrescentou-se 5 mL de solução, e colocou-se o frasco numa estufa a 37 °C, durante 24 horas. Por fim, foi determinada a concentração do fármaco em solução através do leitor de microplacas.

Os resultados referentes à perda de DZ obtida em cada solução foram avaliados através de um simples estudo estatístico, Figura 25, de maneira a entender se a variação da percentagem mássica de PEG no copolímero, interferia no valor da perda do fármaco.



**Figura 25.** Variação da % da perda de DZ, de acordo com diferentes % (mássica) de PEG no copolímero.

De acordo com os resultados obtidos na **Figura 25**, para a mesma quantidade de fármaco, é possível concluir que **não há diferença estatisticamente significativa da perda**, e que esta é independente da formulação utilizada, registrando sempre um valor médio de aproximadamente 20 %. Os símbolos apresentados no topo das barras permitem facilitar a interpretação, confirmando a igualdade estatística entre as duas variáveis em questão.

Deste modo, conclui-se assim a necessidade de compensar a quantidade de fármaco perdida, na etapa da mistura física.

### Caso de Estudo III – Estabilidade do fármaco

- Para concluir acerca da estabilidade do fármaco, nomeadamente a possibilidade de degradação térmica, pesou-se num frasco 5 mg de DZ e acrescentou-se 5 mL de solução. Posteriormente, mediu-se a absorvância da solução em tempo zero e, dividiu-se a mesma em dois frascos. Um frasco foi colocado numa estufa a 37 °C, e o outro à temperatura ambiente, durante 7 dias. No final, foram lidas novamente as absorvâncias de cada solução e comparadas com o valor obtido inicialmente. Os resultados da absorvância foram obtidos segundo um fator de diluição (f) igual a 10 e encontram-se na Tabela 5.

**Tabela 5.** Resultados da abs e da perda do fármaco obtida, durante 7 dias, para  $T_{amb}$  e  $T_{37^{\circ}C}$  ( $f=10$ ).

	$t_0$	$t_7$ dias	
		$T_{amb}$	$T_{37^{\circ}C}$
<b>abs</b>	2,156	2,054	2,107
<b><math>m_{DZ}</math> (mg)</b>	5,363	5,110	5,241
<b>Perda (%)</b>	-	4,72*	2,3*

\*calculado em relação a  $t_0$ 

Através dos valores apresentados na **Tabela 5**, conclui-se que tanto à temperatura ambiente como a  $37^{\circ}C$  (temperatura à qual as soluções são sujeitas no teste de libertação), o fármaco sofre pouca degradação, registando-se um valor máximo de aproximadamente 5 %, quando exposto durante 7 dias, à temperatura ambiente. Por sua vez, o valor registado não é suficiente para justificar a perda de 20 % no perfil de libertação obtido inicialmente.

De notar que, podem existir erros associados aos valores obtidos, como o facto de a solução inicial ser dividida em duas, podendo estas não conter a mesma quantidade de fármaco, fazendo variar os resultados finais.

Deste modo e, dado os resultados obtidos é **descartada a hipótese da possível degradação térmica do fármaco** ao longo dos testes de libertação.

#### Caso de Estudo IV- Interferências espectrais

- Para a determinação da quantidade de fármaco presente nas soluções, recorre-se à leitura da absorvância, através de um leitor de microplacas. Assim, parte-se do princípio que a absorvância lida corresponde apenas ao fármaco. No entanto, a presença de outras espécies, as quais também absorvem radiação no mesmo comprimento de onda, podem induzir a interferências espectrais, interferindo assim no resultado final. Deste modo, procedeu-se a um estudo das possíveis interferências de outros componentes, como o caso do polímero e da própria solução. Começou-se por fazer um varrimento de comprimento de onda individual para cada amostra, onde através dos gráficos (Anexo B), se obteve o valor da absorvância, correspondente ao comprimento de onda fixo do fármaco. Os resultados foram obtidos para amostras filtradas (através de uma seringa com filtro de Nylon de  $0,45 \mu m$ ), como para amostras não filtradas. Deste modo, é possível

avaliar apenas as interferências espectrais (através das amostras filtradas), como as interferências espectrais e químicas em conjunto (pelas amostras não filtradas).

Considerando como base, os valores da absorvância obtidos no Caso de Estudo II para: A) fármaco + solução e B) fármaco + solução + polímero, foi possível determinar a quantidade de fármaco, e, por conseguinte, a percentagem de perda, tendo agora em conta a absorvância obtida do polímero e da solução. Deste modo, aos valores base foi subtraída a absorvância de cada componente, e os resultados foram comparados, a fim de verificar se haveria alterações significativas na perda de DZ. No Anexo B, encontram-se os cálculos auxiliares deste estudo.

Na Tabela 6 estão resumidos os valores da absorvância resultantes do varrimento de comprimento de onda e, na Tabela 7 encontram-se as percentagens de perda do fármaco posteriormente calculadas. Os resultados são apresentados para as amostras filtradas e não filtradas.

**Tabela 6.** Valores da absorvância obtidos, através do varrimento de comprimento de onda individual, para o polímero e solução, de acordo com o valor do comprimento de onda fixo do DZ.

	<b>abs<sub>λ=248(DZ)</sub></b>	
	<b>Filtrada</b>	<b>Não Filtrada</b>
<b>Polímero</b>	0,16	0,26
<b>Solução</b>	0,12	0,15

**Tabela 7.** Percentagem de fármaco perdido, considerando os resultados da abs do polímero e da solução.

	<b>% perda</b>
	<b>DZ</b>
<b>Amostra filtrada</b>	22
<b>Amostra não filtrada</b>	27

Tendo em conta os dados apresentados na **Tabela 6**, conclui-se que de modo geral, tanto o polímero como a solução não apresentam grandes interferências a nível espectral. Todavia, ainda que se considere que as absorvâncias obtidas não interferem no valor da perda do fármaco registada, os dados apresentados na **Tabela 7**, demonstram que a filtração é um fator modificador para a obtenção de uma menor percentagem de perda. Assim, existe a possibilidade

de alguma interferência química, dado que as amostras não sujeitas à filtração apresentam uma percentagem de perda maior. Deste modo, verifica-se a necessidade de filtrar as soluções provenientes dos testes de libertação, antes de serem lidas as respetivas absorvâncias.

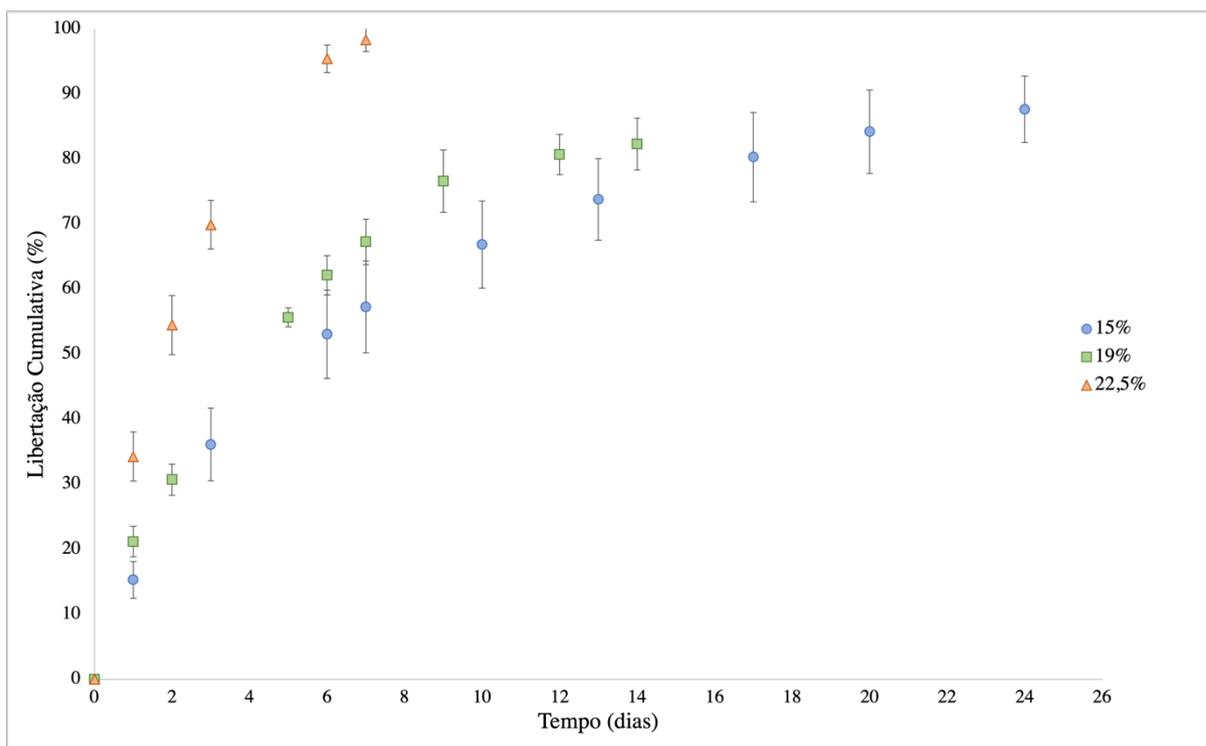
Em termos conclusivos dos diferentes testes realizados, depois de descartadas várias interferências que poderiam afetar a quantidade do fármaco libertado, constata-se a necessidade de um acréscimo de cerca de 22 % de DZ face à quantidade inicial estipulada para os 7 dias de libertação. Assim, um inserto passará a ser constituído por **3,20 mg de DZ** para **20 mg de polímero**. A adição do fármaco é feita na etapa da mistura física (descrita em 3.3.1). Acrescenta-se ainda a etapa de filtração das soluções onde são realizados os testes de libertação, antes de serem submetidas à leitura no leitor de microplacas.

#### **4.4 Cinética de Libertação do Fármaco em diferentes meios de dissolução**

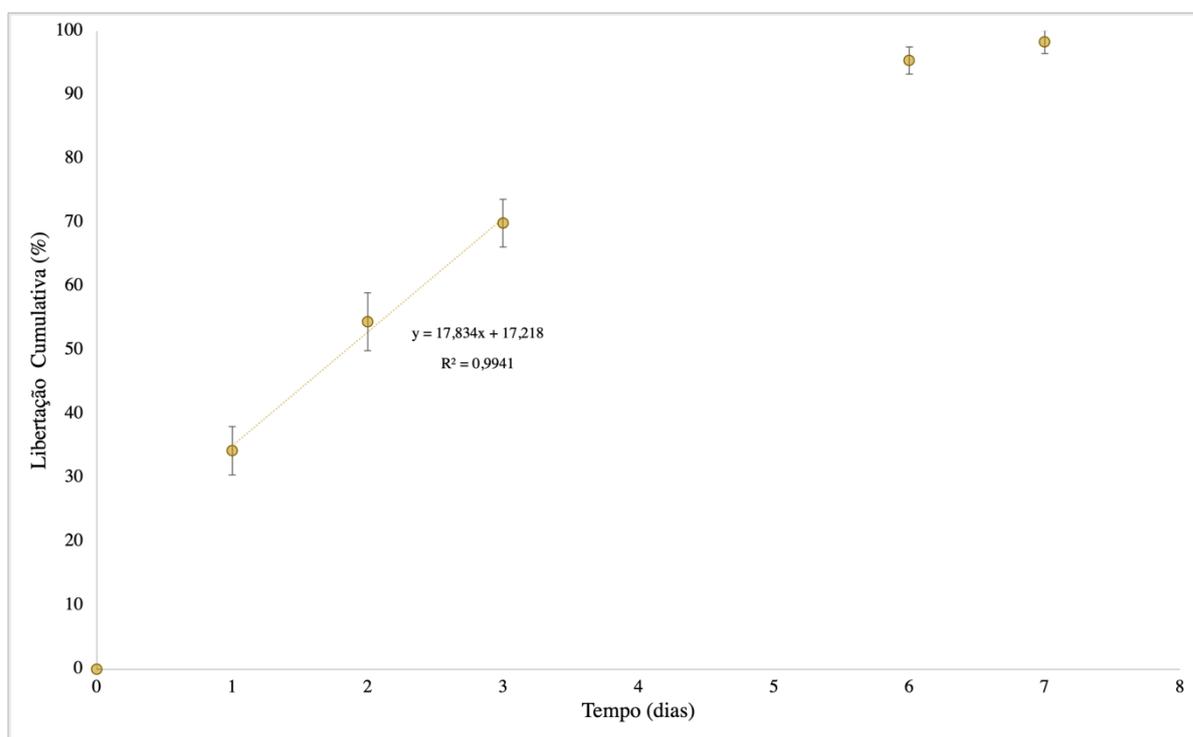
Definida a formulação ideal, tendo em conta um período de ação de 7 dias, procedeu-se à análise da cinética de libertação em meios de dissolução com diferentes valores de pH (6, 7, 8 e 9). Todos os insertos apresentam um diâmetro de 3,5 mm e a mesma constituição (igual quantidade de fármaco e polímero).

##### **4.4.1 Meio de dissolução com pH 7**

O estudo da cinética de libertação num meio de dissolução de pH neutro foi concebido para diferentes formulações, variando a percentagem mássica de PEG no copolímero em 15, 19 e 22,5 %. O resultado cinético obtido para as diferentes formulações encontra-se apresentado na Figura 26. A Figura 27 descreve o comportamento da libertação, quando é utilizada uma percentagem mássica de PEG de 22,5 %, durante 7 dias.



**Figura 26.** Perfil cinético de liberação de DZ ao longo do tempo: a azul um inserto constituído por 15 % PEG, a verde com 19 % PEG e a laranja com 22,5 % PEG.



**Figura 27.** Perfil cinético de liberação de DZ, durante 7 dias, de um inserto constituído por copolímero PCL/PEG (com 22,5 % PEG), num meio de dissolução com pH 7. No gráfico, é apresentada a equação de linearidade referente aos primeiros tempos de liberação.

A influência da percentagem de PEG ao longo do estudo cinético da libertação de DZ, pode ser observada na **Figura 26** - um aumento na percentagem de PEG implica uma taxa de libertação mais rápida. O comportamento de libertação do fármaco é controlado através da difusão das moléculas do fármaco e do relaxamento da matriz polimérica. Deste modo, sendo o PEG uma molécula hidrofílica, atrai água para a matriz polimérica, acelerando o processo de difusão. Assim, é esperado que uma maior quantidade de PEG no copolímero, gere uma taxa de libertação do fármaco mais rápida, o que é comprovado pelos resultados apresentados.

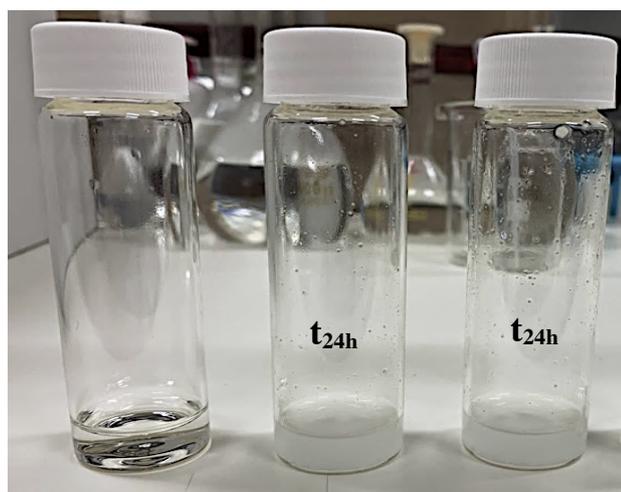
Dos dados obtidos, verifica-se que ao fim de 7 dias, apenas o inserto constituído por 22,5 % de PEG, apresenta uma libertação de aproximadamente 100 % (cerca de 98 %). No caso do inserto composto apenas por 15 % de PEG, são necessários 17 dias para que se obtenha uma libertação mínima de 80 %, sendo que a quantidade de fármaco libertado só estabiliza ao fim de 24 dias, registando-se um valor total de aproximadamente 88 %. À semelhança, quando é utilizada 19 % de PEG, é necessário o dobro do tempo predefinido para que se obtenha cerca de 82 % de libertação, normalizando a quantidade ao fim do décimo segundo dia. Nestes últimos casos, para que seja possível a utilização de um inserto com as respetivas percentagens de PEG, seria necessário a utilização de um inserto de menores dimensões, onde as moléculas do fármaco percorriam um menor caminho até alcançar a superfície, proporcionando assim uma libertação mais rápida. No entanto, a utilização de insertos de menores dimensões aumentariam o risco de deslocamento quando colocados no olho.

Pela **Figura 27**, a utilização de 22,5 % PEG pressupõe uma percentagem de libertação ideal de DZ, ao fim de 7 dias, apresentando inicialmente uma taxa de libertação mais rápida, estabilizando progressivamente a quantidade libertada nas fases posteriores, descrevendo assim um perfil cinético de acordo com a lei de Fick. Ao fim de 7 dias, foi conseguida uma libertação superior a 98 %. Ainda na Figura 27, está representada a linearidade obtida nos primeiros dias de libertação, tendo-se registado um coeficiente de determinação de 0,9995.

#### 4.4.2 Meio de dissolução com pH 6, 8 e 9

Os testes de libertação para os meios de dissolução com pH 6, 8 e 9, foram realizados apenas para a formulação contendo 22,5 % PEG.

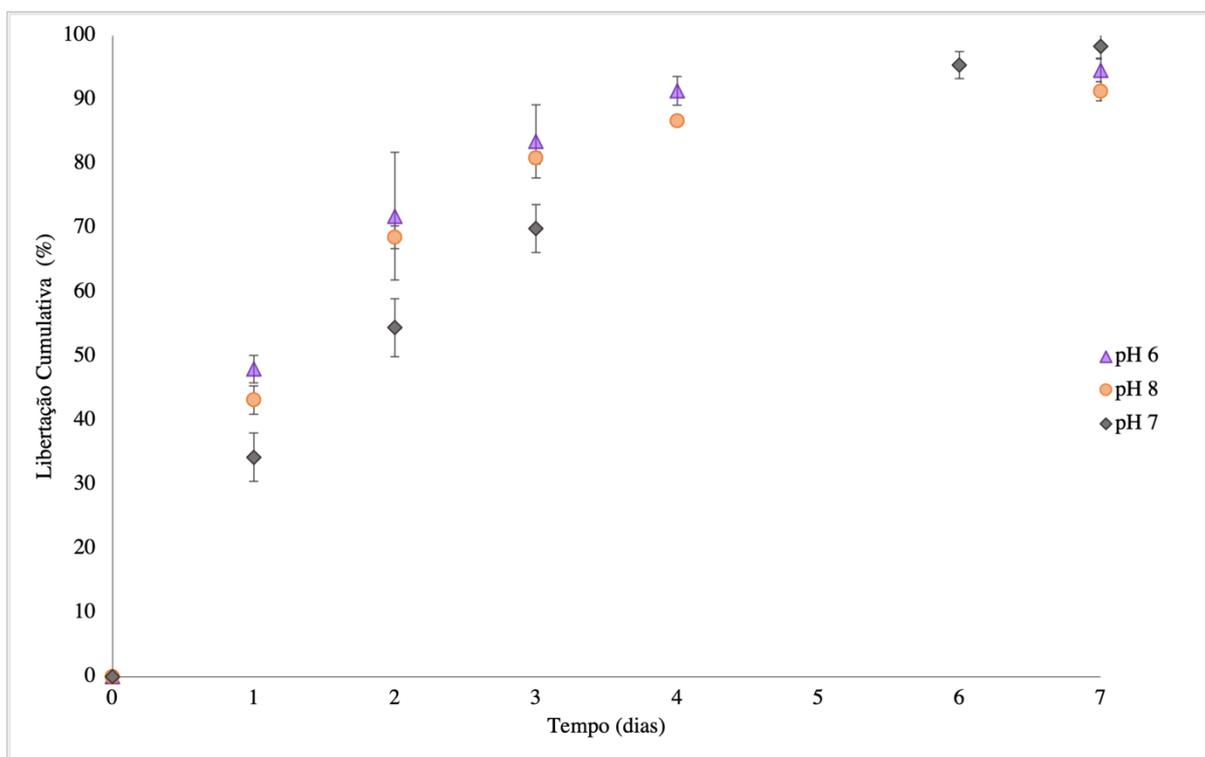
Para os estudos realizados em soluções ligeiramente mais alcalinas, de pH 9, não foi possível a obtenção de dados relativos à cinética de libertação dado que, ao fim de 24 horas, os insertos colocados na solução encontravam-se completamente desfeitos, como apresentado na **Figura 28**.



***Figura 28.** Resultado 24 horas após os insertos serem colocados numa solução de pH 9. À esquerda uma solução de pH 9 pura (onde inicialmente são inseridos os insertos); os restantes frascos correspondem a uma solução 24 h após a colocação do inserto.*

Como referido, a degradação da PCL é mediada através da hidrólise de ligações ésteres. Teoricamente a taxa de degradação em meio alcalino é relativamente mais rápida quando comparado com o meio ácido [36][37]. De notar que, um aumento no pH diminui a concentração de iões  $H^+$ , o que resulta numa maior quantidade de iões hidróxido ( $OH^-$ ) no meio. Deste modo, há um aumento da rutura das ligações éster da cadeia de PCL, resultando assim numa taxa de degradação mais rápida. No entanto, para uma melhor compreensão e conclusão, seria necessário a realização de mais testes, utilizando diferentes percentagens de PCL no copolímero, a fim de entender a influência desta na degradação do inserto.

Os resultados dos perfis obtidos para os meios de dissolução de pH 6 e 8 são apresentados na Figura 29, onde se acrescentou também o perfil obtido em meio neutro (pH 7), para termos de comparação.



**Figura 29.** Perfil cinético de liberação de DZ, durante 7 dias, de um inserto constituído por copolímero PCL/PEG (22,5 % PEG), num meio de dissolução com pH 6 (roxo), pH 8 (laranja) e pH 7 (cinzento).

De acordo com os dados apresentados na **Figura 29**, ao fim de 7 dias, todos os insertos obtiveram uma liberação superior a 90 %, observando-se um ligeiro aumento da quantidade libertada, ao longo de todo o tempo, quando o inserto é submetido a um meio de pH 6 (95 %), quando comparado com o meio de pH 8 (92 %). Todos os perfis seguem uma cinética de liberação de acordo com a lei de Fick: uma primeira etapa caracterizada por uma liberação mais rápida e, uma segunda etapa correspondente uma liberação mais lenta. Embora se verifique um perfil de liberação mais lento em pH neutro, ao longo do tempo, observa-se uma maior percentagem de liberação final, com aproximadamente 98 % de DZ libertada.

A DZ apresenta dois valores de pKa, 6,4 e 8,5, sendo que a utilização de meios de dissolução com diferentes valores do pH influencia a carga do fármaco. A relação entre a forma ionizada e a forma não ionizada está diretamente dependente do pH do meio e do pKa do fármaco. Assim, para o meio com pH 6, a DZ encontra-se na forma catiónica; já no meio com

pH 9, o fármaco apresenta-se na sua forma aniônica. Para valores de pH na gama entre 6,4 e 8,5, o fármaco apresenta-se na sua forma não ionizada.

Pode assim concluir-se que o valor do pH do meio, não interfere significativamente na cinética de libertação de DZ, tendo-se alcançado uma taxa de libertação do fármaco favorável em ambos os casos.

Por forma a compreender os mecanismos predominantes na libertação do fármaco a partir dos insertos durante os testes de libertação, recorreu-se aos modelos matemáticos descritos em 3.5). Assim, utilizando o **modelo Ritger-Peppas**, foram determinados os parâmetros cinéticos, nomeadamente o expoente de libertação (n) e a constante cinética (k). Embora este modelo, apenas abrange os primeiros 60 % de fármaco libertado, como o tempo de libertação total é de apenas 7 dias, a percentagem de fármaco indicada é conseguida ao final de um ou dois dias, dependendo do pH utilizado. Deste modo, e na impossibilidade da obtenção de uma reta com apenas um ponto, assumiu-se para efeitos de cálculo uma libertação de 70 %. Ademais, para definir os mecanismos de acordo com os valores obtidos do expoente de libertação, assumiu-se ainda que o inserto apresentava uma geometria esférica. Na Tabela 8 estão apresentados os valores dos parâmetros cinéticos e o coeficiente de determinação obtidos, consoante o valor do pH do meio. Todos os pressupostos mencionados, invalidam o rigor dos resultados obtidos.

*Tabela 8. Valores obtidos dos parâmetros cinéticos, consoante o valor do pH do meio.*

pH	n	k	R <sup>2</sup>
6	0,582	0,021	1,000
7	0,651	0,029	0,999
8	0,668	0,023	1,000

De acordo com os valores do expoente de libertação apresentados na **Tabela 8**, e tendo em conta os valores da literatura, conclui-se que, possivelmente, o mecanismo predominante na libertação de DZ através dos insertos, é o transporte anômalo, envolvendo a sobreposição de ambos os fenómenos, o mecanismo Fickiano e o transporte controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas. Este por sua vez, é provocado pela penetração do solvente na matriz polimérica, provocando um aumento da mobilidade das cadeias, favorecendo assim o transporte do fármaco.

# Capítulo 5

## Conclusões

### 5.1 Conclusão Geral

Alguns pontos abordados ao longo da dissertação requerem observações conclusivas.

O objetivo deste trabalho, inserido no âmbito do projeto InEye<sup>®</sup>, foi a otimização do perfil de libertação de DZ (fármaco utilizado para o tratamento do glaucoma), através de um inserto ocular de base polimérica.

Relativamente à avaliação do comportamento cinético da libertação de DZ, conclui-se que independentemente do pH do meio utilizado, a libertação do DZ através do inserto polimérico é sempre superior a 90 %, e de acordo com a lei de Fick, isto é, mais rápida nos primeiros tempos, estabilizando nos tempos posteriores. De acordo com os valores dos parâmetros cinéticos obtidos, nomeadamente o expoente de libertação ( $n = 0,582, 0,651, 0,668$ , para pH 6, 7 e 8, respetivamente) e a constante cinética ( $k = 0,021, 0,029, 0,023$ , pH 6, 7 e 8, respetivamente), conclui-se que possivelmente a libertação apresenta um comportamento anómalo. No entanto, aquando da utilização de um meio mais alcalino, pH 9, verifica-se que ao fim de 24 horas o inserto se encontrava desfeito. Tal deve-se ao facto de um aumento no valor de pH proporcionar um aumento dos iões hidroxila no meio e, como tal, o aumento das ruturas das ligações esteres da cadeia de PCL. Do estudo da libertação realizado numa solução neutra, com copolímeros contendo diferentes percentagens mássicas de PEG, conclui-se, como esperado, que um aumento da percentagem de PEG, implicaria uma libertação do fármaco mais rápida.

Os resultados da análise RMN permitiram confirmar as estruturas da PCL assim como a abertura do anel, tendo-se obtido uma ótima conversão de aproximadamente 100 %. Os valores obtidos do peso molecular dos copolímeros indicam que um aumento da quantidade de PEG, resulta num copolímero com menor peso molecular final. Desta forma, uma boa correlação linear entre estas variáveis permite controlar o peso molecular de um copolímero, alterando corretamente a percentagem de PEG.

A Calorimetria Diferencial de Varrimento trata-se de um valioso instrumento de investigação na caracterização polimérica e das misturas do fármaco com os polímeros. A PCL apresentou uma estrutura cristalina, com uma temperatura de fusão de aproximadamente 58 °C. No caso do PEG, dada a ausência de transições de fase ao longo do aquecimento, conclui-se ser uma estrutura amorfa. A análise aos copolímeros, indicou que uma maior percentagem de PEG, levaria a uma curva do termograma mais próxima do estado amorfo, desaparecendo o ponto de fusão associado à PCL. Relativamente ao cloridrato de dorzolamida, conclui-se que se trata de uma estrutura amorfa, marcada pela ausência de uma temperatura de fusão. Quanto à solubilização na matriz do copolímero, conclui-se que a DZ não é solúvel no polímero, sendo possível distinguir claramente as fases térmicas individuais no termograma da mistura entre o copolímero e o fármaco.

## 5.2 Trabalhos Futuros

Neste subcapítulo serão propostos alguns aspetos em prol da melhoria dos resultados de investigação obtidos.

- Utilização de um meio que melhore imite a composição do filme lacrimal, contendo sais e enzimas. Para isso seria ainda necessário um novo método de quantificação do fármaco na solução, sem que haja interferência nas leituras devido à presença de outros compostos em solução;
- Repetição do estudo individual e conjunto, do comportamento cinético da libertação para o caso do Maleato de Timolol, e combinado com DZ, uma vez que estes fármacos atuam como terapia conjugada em grande parte das formulações farmacêuticas.
- Estudo acerca da degradação do inserto composto por PCL/PEG quando submetido em meios mais alcalinos. Como a PCL se degrada mais rapidamente em meio alcalino, propõe-se um estudo onde se utilize insertos com diferentes percentagens de PCL, avaliando a relação entre a quantidade de PCL e o tempo de degradação do inserto;

→ Um estudo mais profundo acerca da solubilidade do fármaco na matriz polimérica, incluindo outras técnicas que permitam complementar/comparar os resultados obtidos por DSC, como o caso da Espectroscopia de Infravermelho e a Difração de Raios X. Para além disso, estudar a solubilidade de DZ em diferentes copolímeros.



# Referências Bibliográficas

- [1] Instituto optico, “A Importância Da Visão,” (2021). <https://www.institutoptico.pt/consultorio/processo-visual.html> (accessed June 17, 2021).
- [2] World Health Organization, World report on vision, 2019.
- [3] R. Gilhotra, K. Nagpal, D. Mishra, “Azithromycin Novel Drug Delivery System for Ocular Application,” *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 1 (2011) 22. <https://doi.org/10.4103/2230-973x.76725>.
- [4] E.M. del Amo, A. Urtti, “Current and Future Ophthalmic Drug Delivery Systems. A Shift to the Posterior Segment,” *Drug Discovery Today*. 13 (2008) 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.11.002>.
- [5] P. Rewri, M. Dhar, S. Virani, “Difficulties with Self Instillation of Eye Drops and Its Impact on Intraocular Pressure in Glaucoma Patients,” *Journal of Clinical Ophthalmology and Research*. 3 (2015) 87. <https://doi.org/10.4103/2320-3897.156592>.
- [6] R. Conlon, H. Saheb, I.I.K. Ahmed, “Glaucoma Treatment Trends: A Review,” *Canadian Journal of Ophthalmology*. 52 (2017) 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.cjjo.2016.07.013>.
- [7] A. Patel, “Ocular Drug Delivery Systems: An Overview,” *World Journal of Pharmacology*. 2 (2013) 47. <https://doi.org/10.5497/wjp.v2.i2.47>.
- [8] A. Urtti, “Challenges and Obstacles of Ocular Pharmacokinetics and Drug Delivery,” *Advanced Drug Delivery Reviews*. 58 (2006) 1131–1135. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.07.027>.
- [9] A. Kumari, P.K. Sharma, V.K. Garg, G. Garg, “Ocular Inserts-Advancement in Therapy of Eye Diseases,” *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*. 1 (2010) 291–296. <https://doi.org/10.4103/0110-5558.72419>.
- [10] Y.W. Chien, *Novel Drug Delivery Systems (Drugs and the pharmaceutical sciences)*, 2nd ed., New Jersey, 2013.
- [11] R. Stamper, M. Lieberman, M. Drake, *Diagnosis and Therapy of the Glaucomas*, 8th ed., 2009.
- [12] R.N. Weinreb, T. Aung, F.A. Medeiros, “The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma: A Review,” *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 311 (2014) 1901–1911. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3192>.
- [13] H. Hollands, D. Johnson, S. Hollands, D.L. Simel, D. Jinapriya, S. Sharma, “Do Findings on Routine Examination Identify Patients at Risk for Primary Open-Angle Glaucoma?,” *Jama*. 309 (2013) 2035–2042. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.5099>.
- [14] J.B. Jonas, T. Aung, R.R. Bourne, A.M. Bron, R. Ritch, S. Panda-Jonas, “Glaucoma,” *The Lancet*. 390 (2017) 2183–2193. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31469-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31469-1).
- [15] R. Goel, Manik; Picciani, Renata; Lee, “Aqueous Humor Dynamics: A Review,” *The Open Ophthalmology Journal*. 4 (2010) 52–59. <https://doi.org/10.2174/1874364101004010052>.
- [16] M. Marcos, *Ocular Drug Delivery Insert Technology*, Universidade de Coimbra, 2018.
- [17] J. Riordan-Eva, Paul; Augsburger, *General Ophthalmology*, 19th ed., n.d.

- [18] A.H. Rantamäki, T. Seppänen-Laakso, M. Oresic, M. Jauhiainen, J.M. Holopainen, “Human Tear Fluid Lipidome: From Composition to Function,” *PLoS ONE*. 6 (2011) 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019553>.
- [19] A.K. Khurana, *Comprehensive Ophthalmology*, 4th ed., 2004.
- [20] D.A. Lee, E.J. Higginbotham, “Glaucoma and Its Treatment: A Review,” *American Journal of Health-System Pharmacy*. 62 (2005) 691–699. <https://doi.org/10.1093/ajhp/62.7.691>.
- [21] A.C. Society, *Atlas of Atlas of*, 2nd ed., 2004.
- [22] S. Wadhwa, R. Paliwal, S. Paliwal, S. Vyas, “Nanocarriers in Ocular Drug Delivery: An Update Review,” *Current Pharmaceutical Design*. 15 (2009) 2724–2750. <https://doi.org/10.2174/138161209788923886>.
- [23] Grupo Português de Glaucoma, “A Trabeculoplastia Laser Mantém o Interesse No Sec. XXI ?,” (n.d.). <https://glaucoma-answers.org/pt-pt/inicio/terapeutica-laser/trabeculoplastia-laser-mantem-o> (accessed July 3, 2021).
- [24] M.D.P. Willcox, P. Argüeso, G.A. Georgiev, J.M. Holopainen, G.W. Laurie, T.J. Millar, E.B. Papas, J.P. Rolland, T.A. Schmidt, U. Stahl, T. Suarez, L.N. Subbaraman, O. Uçakhan, L. Jones, “TFOS DEWS II Tear Film Report,” *Ocular Surface*. 15 (2017) 366–403. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.03.006>.
- [25] P.E. Flattau, *Considerations in Contact Lens Use Under Adverse Conditions*, 1991. <https://doi.org/10.17226/1773>.
- [26] J. Safari, Z. Zarnegar, “Advanced Drug Delivery Systems: Nanotechnology of Health Design A Review,” *Journal of Saudi Chemical Society*. 18 (2014) 85–99. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.12.009>.
- [27] J.F. Coelho, P.C. Ferreira, P. Alves, R. Cordeiro, A.C. Fonseca, J.R. Góis, M.H. Gil, “Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalized Treatments,” *EPMA Journal*. 1 (2010) 164–209. <https://doi.org/10.1007/s13167-010-0001-x>.
- [28] H. Rosen, T. Aribat, “The Rise and Rise of Drug Delivery,” *Nature Reviews Drug Discovery*. 4 (2005) 381–385. <https://doi.org/10.1038/nrd1721>.
- [29] N. Devhadrao, M. Siddhaia, “Review on Ocular Insert Drug Delivery System,” *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 8 (2018) 115–121. <https://doi.org/10.22270/jddt.v8i5-s.1991>.
- [30] D. Karthikeyan, M. Bhowmick, V. Pandey, J. Nandhakumar, S. Sengottuvelu, S. Sonkar, T. Sivakumar, “The Concept of Ocular Inserts as Drug Delivery Systems: An Overview,” *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2 (2008) 192. <https://doi.org/10.4103/0973-8398.45031>.
- [31] H. Kaji, N. Nagai, M. Nishizawa, T. Abe, “Drug Delivery Devices for Retinal Diseases,” *Advanced Drug Delivery Reviews*. 128 (2018) 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.002>.
- [32] M. Helena, M. Gil, P. Cristina, N. Ferreira, R. Alexandra, G. Antunes, PT 109154 B, 2019.
- [33] R.M. Mohamed, K. Yusoh, “A Review on the Recent Research of Polycaprolactone (PCL),” *Advanced Materials Research*. 1134 (2015) 249–255. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.1134.249>.

- [34] M. Labet, W. Thielemans, "Synthesis of Polycaprolactone: A Review," *Chemical Society Reviews*. 38 (2009) 3484–3504. <https://doi.org/10.1039/b820162p>.
- [35] D. Mondal, M. Griffith, S.S. Venkatraman, "Polycaprolactone-Based Biomaterials for Tissue Engineering and Drug Delivery: Current Scenario and Challenges," *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 65 (2016) 255–265. <https://doi.org/10.1080/00914037.2015.1103241>.
- [36] E. Malikmammadov, T.E. Tanir, A. Kiziltay, V. Hasirci, N. Hasirci, PCL and PCL-based materials in biomedical applications, Taylor & Francis, 2018. <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1394711>.
- [37] A. Ramírez Hernández, O.C. Contreras, J.C. Acevedo, L. Guadalupe, N. Moreno, "Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Degradation Under Acidic and Alkaline Conditions," *American Journal of Polymer Science*. 3 (2013) 70–75. <https://doi.org/10.5923/j.ajps.20130304.02>.
- [38] S. Zhou, X. Deng, H. Yang, "Biodegradable Poly( $\epsilon$ -Caprolactone)-Poly(Ethylene Glycol) Block Copolymers: Characterization and Their Use as Drug Carriers for a Controlled Delivery System," *Biomaterials*. 24 (2003) 3563–3570. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00207-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00207-2).
- [39] A. Rai, S. Senapati, S.K. Saraf, P. Maiti, "Biodegradable Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) as a Controlled Drug Delivery Vehicle of Vancomycin for the Treatment of MRSA Infection," *Journal of Materials Chemistry B*. 4 (2016) 5151–5160. <https://doi.org/10.1039/c6tb01623e>.
- [40] C. Jérôme, P. Lecomte, "Recent Advances in the Synthesis of Aliphatic Polyesters by Ring-Opening Polymerization," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60 (2008) 1056–1076. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.02.008>.
- [41] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U.S. Schubert, "Poly(Ethylene Glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives," *Angewandte Chemie - International Edition*. 49 (2010) 6288–6308. <https://doi.org/10.1002/anie.200902672>.
- [42] C.-G. Gölander, J.N. Herron, K. Lim, P. Claesson, P. Stenius, J.D. Andrade, Properties of Immobilized PEG Films and the Interaction with Proteins, 1992. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0703-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0703-5_15).
- [43] A.A. D'souza, R. Shegokar, "Polyethylene Glycol (PEG): A Versatile Polymer for Pharmaceutical Applications," *Expert Opinion on Drug Delivery*. 13 (2016) 1257–1275. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485>.
- [44] J.B. Soltau, T.J. Zimmerman, "Changing Paradigms in the Medical Treatment of Glaucoma," *Survey of Ophthalmology*. 47 (2002) S2. [https://doi.org/10.1016/S0039-6257\(02\)00291-6](https://doi.org/10.1016/S0039-6257(02)00291-6).
- [45] E. Lavik, M.H. Kuehn, A.J. Shoffstall, K. Atkins, A. V. Dumitrescu, Y.H. Kwon, "Sustained Delivery of Timolol Maleate for over 90 Days by Subconjunctival Injection," *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 32 (2016) 642–649. <https://doi.org/10.1089/jop.2016.0042>.
- [46] C. De Ângulo, A. Primário, "Terapêutica Médica Actual No Glaucoma," 34 (n.d.) 445–452.
- [47] M.A. Attia Shafie, "In Vitro and In Vivo Evaluation of Timolol Maleate Ocular Inserts Using Different Polymers," *Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology*. 03 (2012). <https://doi.org/10.4172/2155-9570.1000246>.

- [48] Z. Wang, I. Denys, F. Chen, L. Cai, X. Wang, D.R. Kapusta, Y. Lv, J. Gao, “Complete Atrioventricular Block Due to Timolol Eye Drops: A Case Report and Literature Review,” *BMC Pharmacology and Toxicology*. 20 (2019) 2–5. <https://doi.org/10.1186/s40360-019-0370-2>.
- [49] T. Loftsson, P. Jansook, E. Stefánsson, “Topical Drug Delivery to the Eye: Dorzolamide,” *Acta Ophthalmologica*. 90 (2012) 603–608. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2011.02299.x>.
- [50] C.G. Park, Y.K. Kim, S.N. Kim, S.H. Lee, B.K. Huh, M.A. Park, H. Won, K.H. Park, Y. Bin Choy, “Enhanced Ocular Efficacy of Topically-Delivered Dorzolamide with Nanostructured Mucoadhesive Microparticles,” *International Journal of Pharmaceutics*. 522 (2017) 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.02.035>.
- [51] E.M. Abdou, S. M.Kandil, “Formulation and Evaluation of Dorzolamide and Timolol Ocuserts,” *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 8 (2017) 915–924. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8\(2\).915-24](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8(2).915-24).
- [52] D. Gramaglia, B.R. Conway, V.L. Kett, R.K. Malcolm, H.K. Batchelor, “High Speed DSC (Hyper-DSC) as a Tool to Measure the Solubility of a Drug within a Solid or Semi-Solid Matrix,” *International Journal of Pharmaceutics*. 301 (2005) 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.04.038>.
- [53] L. Bond, S. Allen, M.C. Davies, C.J. Roberts, A.P. Shivji, S.J.B. Tendler, P.M. Williams, J. Zhang, “Differential Scanning Calorimetry and Scanning Thermal Microscopy Analysis of Pharmaceutical Materials,” *International Journal of Pharmaceutics*. 243 (2002) 71–82. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00239-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00239-9).
- [54] M.A. De Oliveira, Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica, 2011.
- [55] R.A.E. Castro, Antagonista adrenérgico seletivos beta 1: estrutura do atenolol, Universidade de Coimbra, 2006.
- [56] S.D. Clas, C.R. Dalton, B.C. Hancock, “Differential Scanning Calorimetry: Applications in Drug Development,” *Pharmaceutical Science and Technology Today*. 2 (1999) 311–320. [https://doi.org/10.1016/S1461-5347\(99\)00181-9](https://doi.org/10.1016/S1461-5347(99)00181-9).
- [57] W. Brostow, R. Chiu, I.M. Kalogeras, A. Vassilikou-Dova, “Prediction of Glass Transition Temperatures: Binary Blends and Copolymers,” *Materials Letters*. 62 (2008) 3152–3155. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2008.02.008>.
- [58] D. Jennifer B, R. Christos, Oral drug absorption : prediction and assessment, 2nd ed., 2010.
- [59] D. Giron, “Thermal Analysis and Calorimetric Methods in the Characterisation of Polymorphs and Solvates,” *Thermochimica Acta*. 248 (1995) 1–59. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(94\)01953-E](https://doi.org/10.1016/0040-6031(94)01953-E).
- [60] Mundipharma, “COSOPT® Cloridrato de Dorzolamida 2,0 % / Maleato de Timolol 0,5%,” (2020).
- [61] N.A. Peppas, J.J. Sahlin, “A Simple Equation for the Description of Solute Release. III. Coupling of Diffusion and Relaxation,” *International Journal of Pharmaceutics*. 57 (1989) 169–172. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90306-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90306-2).
- [62] J. Siepmann, N.A. Peppas, “Modeling of Drug Release from Delivery Systems Based on Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC),” *Advanced Drug Delivery Reviews*. 48 (2001) 139–157. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00112-0).

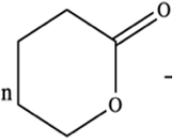
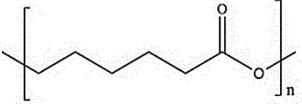
- [63] Marcos Luciano Bruschi, Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems, 2nd ed., 2015. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081000922000060>.
- [64] K. Żółtowska, M. Sobczak, E. Olejdzka, “Novel Zinc-Catalytic Systems for Ring-Opening Polymerization of  $\epsilon$ -Caprolactone,” *Molecules*. 20 (2015) 2816–2827. <https://doi.org/10.3390/molecules20022816>.
- [65] P. Cerrai, M. Tricoli, F. Andruzzi, M. Paci, M. Paci, “Polyether-Polyester Block Copolymers by Non-Catalysed Polymerization of  $\epsilon$ -Caprolactone with Poly(Ethylene Glycol),” *Polymer*. 30 (1989) 338–343. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(89\)90126-2](https://doi.org/10.1016/0032-3861(89)90126-2).
- [66] J. Jin, F. Lin, R. Liu, T. Xiao, J. Zheng, G. Qian, H. Liu, P. Wen, “Preparation and Thermal Properties of Mineral-Supported Polyethylene Glycol as Form-Stable Composite Phase Change Materials (CPCMs) Used in Asphalt Pavements,” *Scientific Reports*. 7 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17224-1>.

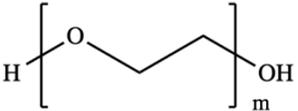
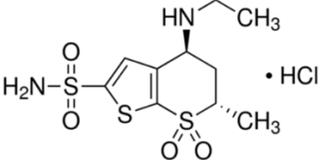
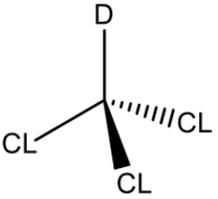


# Anexos

## Anexo A: Descrição das propriedades físico-químicas dos reagentes utilizados

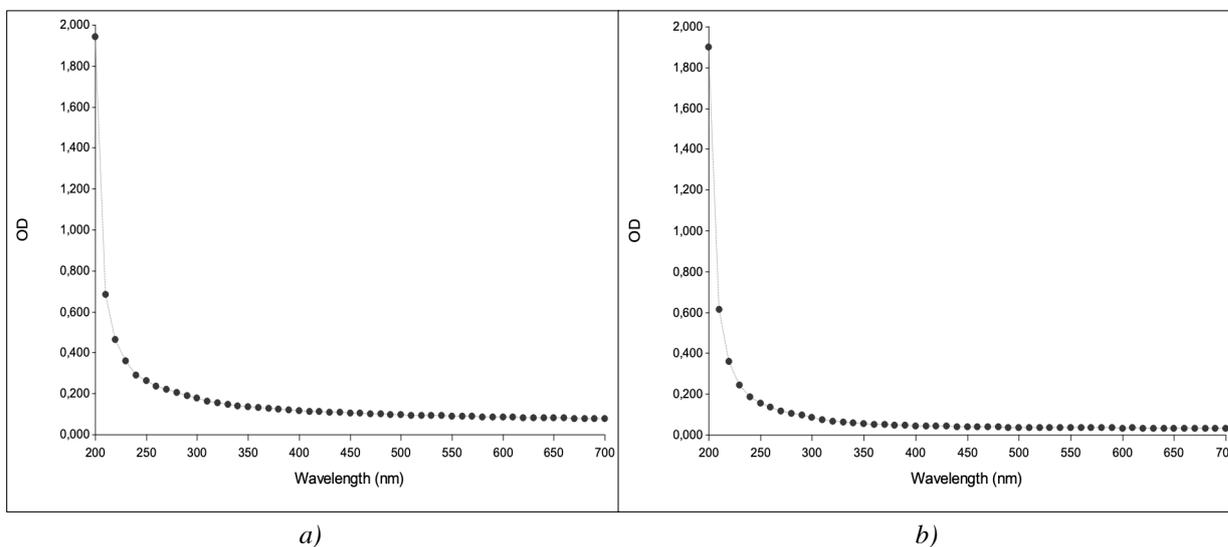
*Tabela A1. Propriedades físico-químicas e medidas de segurança (advertências de perigo (H) e recomendações de prudência (P)) dos compostos utilizados, obtidas a partir das fichas de segurança.*

Nome da substância	Formula química	Estrutura química	Peso molecular (g.mol <sup>-1</sup> )	Densidade (g.cm <sup>3</sup> )	Ponto de fusão (°C)	Frases H	Frases P
$\epsilon$ - caprolactona	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>		114,14	1,03 <sup>†</sup>	-2,14	H319	P264; P280; P305+P33; P305+P351; P337+P313
PCL	(C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>		10 000	1,15 <sup>†</sup>	60	Substância considerada não perigosa.	

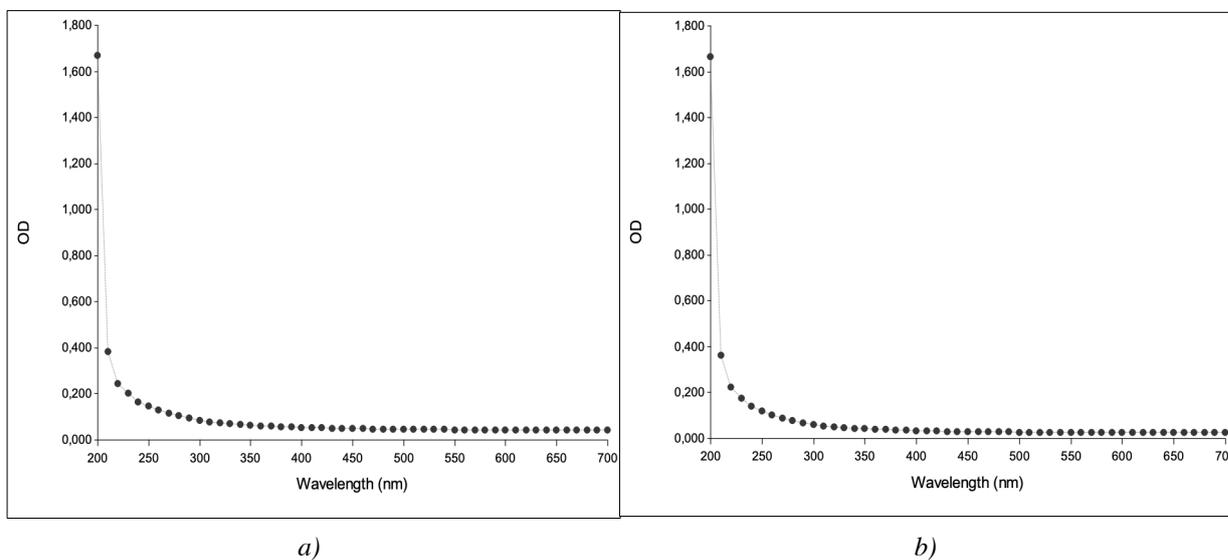
<b>PEG</b>	$H(OCH_2CH_2)_mOH$		600	1,12*	17-22	H302 H361 H373	P260; P264; P281; P305+P312; P405; P501
<b>Cloridrato de Dorzolamida</b>	$C_{10}H_{16}N_2O_4S_3 \cdot HCl$		360,9		-	H302 H361 H373	P201; P202; P260; P264; P270; P281; P301+P312; P308+P313; P314; P330; P405; P501
<b>Clorofórmio deuterado</b>	$CCL_3D$		120,38	1,50†	-64	H302 H315 H319 H331 H351 H361d H352	P201; P301+P312+P330; P302+P352; P304+P340+P311; P308+P313; P305+P351+P338

## Anexo B: Cálculos complementares do Caso de Estudo IV- Interferências espectrais

### Varrimento de Comprimento de onda



*Figura B30. Varrimento de onda para o polímero (22,5%PEG) a) amostra não filtrada; b) amostra filtrada.*



*Figura B31. Varrimento de comprimento de onda para a solução pH 7 a) amostra não filtrada; b) amostra filtrada.*

▪ **Cloridrato de Dorzolamida:  $\lambda = 248 \text{ nm}$**

**Considerando a seguinte informação:**

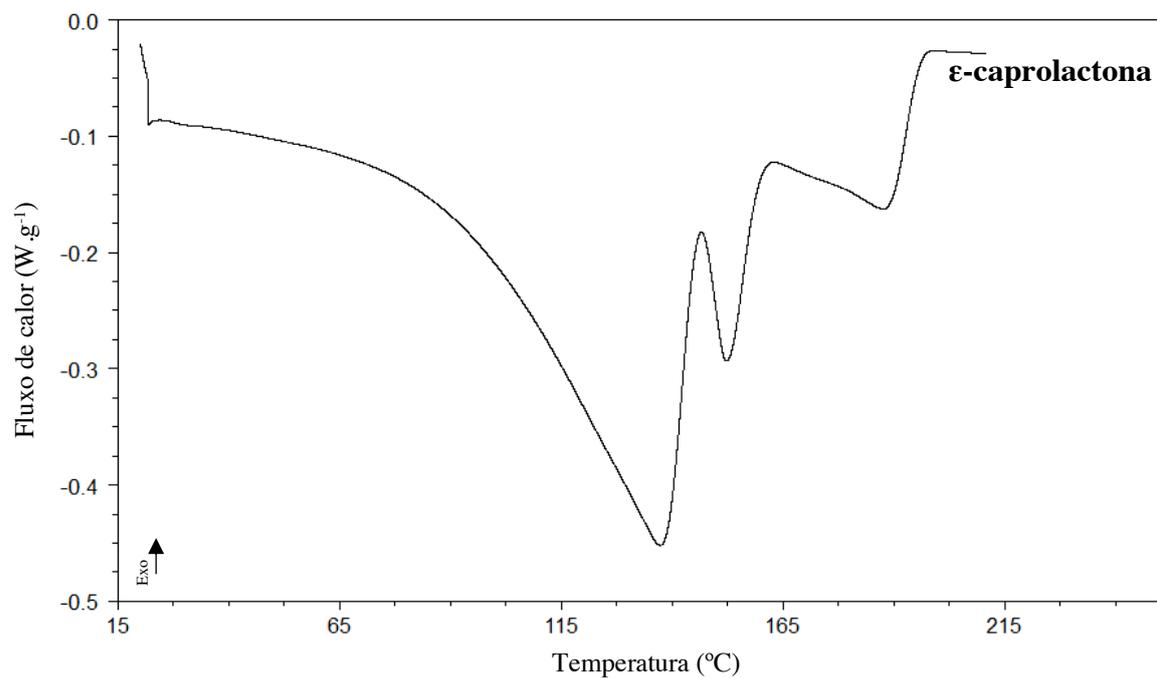
- 5 mg DZ + 5 mL<sub>solução pH 7</sub> = 1,984
- 5 mg DZ + 5 mL<sub>solução pH 7</sub> + 20 mg polímero = 1,61

Através do varrimento, para  $\lambda = 248 \text{ nm}$ , os valores da abs obtidas são:

- Amostra polímero não filtrada = 0,261
- Amostra de polímero filtrada = 0,156
- Amostra de solução não filtrada = 0,147
- Amostra de polímero filtrada = 0,119

<u><b>Amostra não filtrada</b></u>	<u><b>Amostra Filtrada</b></u>
Solução: $1,984 - 0,147 = 1,837$ (assumindo 100%)	Solução: $1,984 - 0,119 = 1,865$ (assumindo 100%)
Polímero: $1,61 - 0,261 = 1,349$	Polímero: $1,61 - 0,156 = 1,454$
Assim:	Assim:
1,837 --- 100%	1,865 --- 100%
1,349 --- x	1,454 --- x
Com x = 73,40%	Com x = 77,96%
<b>Perda <math>\approx</math> 27%</b>	<b>Perda <math>\approx</math> 22%</b>

## Anexo C: Resultados análise térmica de DSC



**Figura C1.** Termograma referente à  $\epsilon$ -caprolactona, com um grau de aquecimento de 10 °C/min.