

Mariana Rodrigues Morais

# Análise comparativa dos perfis morfológicos e de libertação em Implantes Oculares de Acetazolamida preparados por *Electrospinning*

Dissertação de Mestrado em Tecnologias do Medicamento, orientada pela Professora Doutora Maria Eugénia Pina e pela Doutora Patrícia Coimbra e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Mariana Rodrigues Morais

**Análise comparativa dos perfis morfológicos e de libertação  
em Implantes Oculares de Acetazolamida preparados por  
*Electrospinning***

Dissertação de Mestrado em Tecnologias do Medicamento, orientada pela Professora Doutora Maria Eugénia Pina e pela Doutora Patrícia Coimbra e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Recuso-me a aceitar o que me derem.

Recuso-me às verdades acabadas;  
recuso-me, também, às que tiverem  
pousadas no sem-fim as sete espadas.

Recuso-me às espadas que não ferem  
e às que ferem por não serem dadas.  
Recuso-me aos eus-próprios que vierem  
e às almas que já foram conquistadas.

Recuso-me a estar lúcido ou comprado  
e a estar sozinho ou estar acompanhado.  
Recuso-me a morrer. Recuso a vida.

Recuso-me à inocência e ao pecado  
como a ser livre ou ser predestinado.  
Recuso tudo, ó Terra dividida!

*Independência, Jorge de Sena in “Coroa da Terra”*

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem a orientação e ajuda de diversas pessoas que me acompanharam ao longo desta etapa. Venho por este meio, portanto, expressar os meus sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Maria Eugénia Tavares de Pina, que me indicou este projeto e me abriu todas as portas para que pudesse realizá-lo em colaboração com o Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra. Na sua qualidade de orientadora, queria também agradecer a disponibilidade e preocupação em acompanhar todos os resultados deste trabalho.

À Doutora Patrícia Coimbra que, desde o primeiro contacto, se mostrou inteiramente disponível a acompanhar de perto o meu trabalho. Na sua qualidade de orientadora agradeço o tempo despendido, a revisão e crítica da presente dissertação e a disponibilidade ao longo de todo o projeto; sem a sua orientação e incentivo, este trabalho não teria sido possível.

Por último, mas não menos importante, à minha família e amigos, pela amizade, pelo incentivo e pelo apoio incondicional. Em especial, à Maria Eugénia Farinha e ao Fausto Morais que na qualidade de pais me transmitiram, sempre, que o conhecimento nunca é demais. Agradeço também o amor, o carinho e toda a sua dedicação.

## RESUMO

A deficiência visual que muitas vezes leva à cegueira está entre as doenças que causam maior taxa de morbidade. Os erros refrativos, o glaucoma, as cataratas e as infecções são alguns exemplos.

O objetivo deste trabalho é criar um implante biodegradável obtido a partir de fibras coaxiais contendo o fármaco disperso – acetazolamida. O implante será inserido no segmento posterior do globo ocular do doente em contexto de cirurgia de ambulatório e o fármaco será libertado gradualmente, não necessitando de injeções periódicas, ao contrário das injeções intravítreas de esteroides.

Durante este trabalho desenvolveram-se, em primeiro lugar, implantes sem revestimento, compostos por membranas fibrosas produzidas por *electrospinning* e enroladas na forma de pequenos cilindros. O fármaco foi imobilizado no interior das fibras durante a sua preparação, sendo estas fibras compostas por PCL (policaprolactona) e lutrol F127 (poli (oxietileno-b-oxipropileno-b-oxietileno)). Produziram-se fibras com uma estrutura uniaxial (compostas pela mistura de PCL, lutrol F127 e acetazolamida) e com uma estrutura coaxial (com um núcleo de lutrol F127 com acetazolamida e um revestimento de PCL). Os implantes preparados apresentaram uma velocidade de libertação de fármaco muito rápida, o que levou à preparação de novos implantes, incorporando as mesmas formulações que os primeiros, mas com a adição de um filme de revestimento, preparado por *solvent casting* e composto por PCL e lutrol F127 ou por PCL e luwax EVA 3 (poli (etileno-co-acetato de vinilo)). Os implantes e os seus constituintes (membranas fibrosas e filmes de revestimento) foram caracterizados por várias técnicas, tais como: SEM, FTIR-ATR, análise térmica simultânea e determinação de ângulos de contacto. Adicionalmente, procedeu-se à obtenção dos perfis de libertação *in vitro* da acetazolamida, em PBS e a 37°C, utilizando um método espectrofotométrico para quantificar o fármaco libertado ao longo do tempo.

Os resultados mostraram que o perfil de libertação da acetazolamida a partir dos implantes com revestimento é consideravelmente mais lenta e gradual, dado que estes sistemas apresentam uma barreira adicional à difusão do fármaco. No caso do revestimento contendo lutrol F127, polímero hidrofílico, ocorreu intumescimento do revestimento diminuindo a taxa de libertação do fármaco. No que se refere ao revestimento contendo luwax EVA 3, polímero hidrofóbico, a sua degradação por erosão permitiu diminuir a taxa de libertação do fármaco.

## ABSTRACT

The visual impairment that often leads to blindness is among the diseases that cause higher morbidity rate. Refractive errors, glaucoma, cataracts and infections are some examples.

The objective of this work is to create a biodegradable implant obtained from coaxial fibers containing the dispersed drug - acetazolamide. The implant is inserted into the posterior segment of the eye globe in the patient in ambulatory surgery context and the drug is released gradually, not requiring periodic injections, unlike intravitreal steroids injections.

During this work uncoated implants were developed at first, they were composed of fibrous membranes produced by *electrospinning* and rolled in the shape of small cylinders. The drug was immobilized inside the fibers during their preparation and these fibers were composed of PCL (polycaprolactone) and lutrol F127 (poly (oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene)). Fibers were produced with a uniaxial structure (consisting of the mixture of PCL, lutrol F127 and acetazolamide) and with a coaxial structure (lutrol F127 and acetazolamide as core and PCL as shell). The prepared implants exhibited a fast rate of drug release, which led to the preparation of new implants incorporating the same formulation as the first but with an additional coating film prepared by solvent casting and comprising PCL and lutrol F127 or PCL and luwax EVA 3 (poly (ethylene-co-vinyl acetate)). Implants and their constituents (fibrous membranes and coating films) were characterized by various techniques, such as: SEM, FTIR-ATR, simultaneous thermal analysis and determination of contact angles. In addition, *in vitro* release profiles of acetazolamide were obtained in PBS at 37° C using a spectrophotometric method for quantifying the drug released over time.

The results have showed that the release profile of the acetazolamide of coated implant is considerably slower and more gradual, since the drug has to penetrate an additional barrier. In case of coating containing lutrol F127, an hydrophilic polymer, the swelling of the coating led to a slow rate of drug release. In what concerns the coating containing luwax EVA 3, an hydrophobic polymer, its degradation by erosion allowed a slow rate of drug release.

# ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	ix
ÍNDICE DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	3
2.1 Anatomofisiologia do olho.....	3
2.2 Patologias do olho .....	6
2.3 Farmacologia do olho .....	10
2.4 Implantes oculares de libertação de fármacos.....	11
2.5 Métodos de produção de implantes: electrospinning.....	16
2.6 Fibras core-shell.....	18
2.7 Acetazolamida: perspectivas e considerações no tratamento do glaucoma.....	19
3. OBJETIVOS .....	20
4. MATERIAIS.....	21
5. MÉTODOS.....	22
5.1 Métodos utilizados na preparação de implantes por electrospinning.....	22
5.1.1 Considerações Gerais.....	22
5.1.2 Protocolo experimental .....	24
5.2 Caracterização morfológica e físico-química de implantes .....	27
5.2.1 Considerações Gerais.....	27
5.2.2 Protocolo experimental .....	28
5.3 Cinética de Libertação in vitro dos implantes .....	30
5.3.1 Considerações Gerais.....	30
5.3.2 Protocolo experimental .....	30
6. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	31
6.1. Obtenção dos Implantes .....	31
6.2. Caracterização morfológica e físico-química dos implantes.....	31
6.2.1 Análise dos implantes por SEM.....	31
6.2.2 Análise dos implantes por FTIR.....	34
6.2.3 Ângulos de contacto da superfície dos implantes .....	35

6.2.4 Análise térmica simultânea dos implantes.....	36
6.3 Cinética de libertação <i>in vitro</i> dos implantes .....	41
6.3.1 Ensaio de libertação dos implantes com e sem revestimento .....	41
7. CONCLUSÕES.....	43
8. ABORDAGENS FUTURAS.....	44
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: ANATOMIA DO OLHO.....	3
FIGURA 2: ANATOMIA DO OLHO (EM DETALHE).....	4
FIGURA 3: BLEFARITE.....	6
FIGURA 4: CONJUNTIVITE.....	6
FIGURA 5: HEMORRAGIA SUBCONJUNTIVAL.....	7
FIGURA 6: OLHO SECO.....	7
FIGURA 7: PINGUÍCULA.....	7
FIGURA 8: TIPOS DE ERROS REFRACTIVOS.....	8
FIGURA 9: ESTRUTURA QUÍMICA DO PLA E DO PLGA.....	13
FIGURA 10: ESTRUTURA QUÍMICA DA PCL.....	13
FIGURA 11: ESTRUTURA QUÍMICA DO LUWAX EVA 3.....	14
FIGURA 12: ESTRUTURA QUÍMICA DO LUTROL F127 (ONDE A É APROXIMADAMENTE 101 E B APROXIMADAMENTE 56).....	15
FIGURA 13: ESQUEMA DA FORMAÇÃO DE FIBRAS <i>CORE-SHELL</i> .....	18
FIGURA 14: FORMAÇÃO DO IÃO BICARBONATO COMO PRODUTO DA REAÇÃO ENTRE A ÁGUA E O DIÓXIDO DE CARBONO.....	19
FIGURA 15: ESQUEMA GERAL DA PREPARAÇÃO DOS IMPLANTES.....	23
FIGURA 16: MONTAGEM DO EQUIPAMENTO DE <i>ELECTROSPINNING</i> .....	25
FIGURA 17: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO REVESTIMENTO DOS IMPLANTES.....	26
FIGURA 18: ESQUEMA DO COMPORTAMENTO DA GOTA DE ÁGUA CONFORME A NATUREZA HIDROFÍLICA/HIDROFÓBICA DA SUPERFÍCIE.....	27
FIGURA 19: IMAGENS OBTIDAS POR SEM. (A) FIBRAS DO IMPLANTE BLENDING, (B) FIBRAS DO IMPLANTE EDW.....	32
FIGURA 20: IMAGENS OBTIDAS POR SEM. VISTA DA SECÇÃO TRANSVERSAL (C) E SUPERFÍCIE DO REVESTIMENTO (D) DO IMPLANTE MD 500LUT E VISTA DA SECÇÃO TRANSVERSAL (E) E SUPERFÍCIE DO REVESTIMENTO (F) DO IMPLANTE MD 500LUW.....	33
FIGURA 21: IMAGENS OBTIDAS POR SEM. VISTA DA SECÇÃO TRANSVERSAL (G) E SUPERFÍCIE DO REVESTIMENTO (H) DO IMPLANTE EDW 1000LUT E VISTA DA SECÇÃO TRANSVERSAL (I) E SUPERFÍCIE DO REVESTIMENTO (J) DO IMPLANTE EDW 1000LUW.....	34
FIGURA 22: ANÁLISE TÉRMICA SIMULTÂNEA. (A) ACETAZOLAMIDA, (B) LUTROL F127 (C) PCL (D) FIBRAS COAXIAIS EDW (E) FIBRAS COAXIAIS MD (F) FIBRAS BLENDING.....	40

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: ESPETROS OBTIDOS PELA TÉCNICA DE FTIR DE IMPLANTES MD EM COMPARAÇÃO COM A PCL, O LUTROL F127 E A ACETAZOLAMIDA .....	34
GRÁFICO 2: ESPETROS OBTIDOS PELA TÉCNICA DE FTIR DE IMPLANTES EDW EM COMPARAÇÃO COM A PCL, O LUTROL F127 E A ACETAZOLAMIDA.....	35
GRÁFICO 3: ESPETROS OBTIDOS PELA TÉCNICA DE FTIR DE IMPLANTES <i>BLENDING</i> EM COMPARAÇÃO COM A PCL, O LUTROL F127 E A ACETAZOLAMIDA.....	35
GRÁFICO 4: PERCENTAGEM DE ACETAZOLAMIDA LIBERTADA EM FUNÇÃO DO TEMPO, PARA IMPLANTES COM E SEM REVESTIMENTO .....	41

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES E SOLVENTES UTILIZADOS PARA PRODUZIR O INTERIOR DAS FIBRAS .....	24
TABELA 2: PARÂMETROS UTILIZADOS NO MÉTODO DE <i>ELETROSPINNING</i> EM CADA FORMULAÇÃO.....	25
TABELA 3: COMPOSIÇÃO DOS FILMES DE REVESTIMENTO .....	26
TABELA 4: COMPOSIÇÃO E ESPESSURA DOS FILMES DE REVESTIMENTO .....	31
TABELA 5: ÂNGULOS DE CONTACTO ÁGUA-MEMBRANAS .....	36
TABELA 6: ÂNGULOS DE CONTACTO ÁGUA-REVESTIMENTO .....	36
TABELA 7: TEMPERATURA DE FUSÃO, DE DEGRADAÇÃO (ONSET) E VARIAÇÃO DA ENTALPIA DE FUSÃO DAS SUBSTÂNCIAS PURAS: ACETAZOLAMIDA, LUTROL F127 E PCL E DAS MEMBRANAS COM AS FORMULAÇÕES EDW, MD E <i>BLENDING</i> .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACZ:	Acetazolamida
CLF:	Clorofórmio
DMF:	Dimetilformamida
EtOH:	Etanol
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
IAC:	Inibidores da Anidrase Carbónica
IOLF:	Implante Ocular de Liberação de Fármaco
LIO:	Lente Intraocular
Lut:	Lutrol F127
Luw:	Luwax EVA 3
MeOH:	Metanol
PBS:	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCL:	Policaprolactona
PEVA:	Poli (etileno-co-acetato de vinilo)
PIO:	Pressão Intraocular
PLA:	Poliácido láctico
PLGA:	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
THF:	Tetraidrofurano
TIPS:	Separação de fases termicamente induzida

## I. INTRODUÇÃO

A deficiência visual que muitas vezes leva à cegueira está entre as doenças que causam maior taxa de morbidade. Segundo dados da OMS, em 2014, 285 milhões de pessoas sofriam de deficiência visual das quais 39 milhões são cegas e cerca de 90% destas vivem em países subdesenvolvidos.

As doenças subjacentes a estas patologias são muitas vezes silenciosas e, por isso, estima-se que 82% dos cegos tenham mais de 50 anos de idade. Desta forma, a “prevenção” assume um papel de tal forma fundamental que, segundo a mesma Organização, 40% da cegueira infantil é evitável ou tratável.

Das inúmeras causas para a deficiência visual as mais frequentes são os erros refrativos (miopia, hipermetropia e astigmatismo). Estes atingem cerca de 43% da população com défice visual. O glaucoma, a degeneração macular relacionada com a idade, as cataratas e as infeções oculares são outras causas de deficiência visual que podem levar à cegueira caso não sejam devidamente tratadas.

Durante os últimos vinte anos tem-se vindo a ganhar alguma consciencialização acerca desta problemática, tendo sido criadas medidas de forma a aumentar os serviços de cuidados visuais integrados nos sistema de saúde, alertar a população para os possíveis tratamentos disponíveis e educar para os cuidados a ter com o sistema visual.

Em 2013, a Organização Mundial de Saúde aprovou o Plano de A  o 2014-2019 para o acesso universal   saúde dos olhos, um roteiro para os Estados-Membros, Secretariado da OMS e parceiros internacionais com o objetivo de alcançar uma redução mensurável de 25% da deficiência visual evitável em 2019.

Todavia a execução e aplicação destas medidas (que têm dificuldade em sair do papel) não têm atingido os resultados devidos. As melhorias existem mas em quantidade e seguimento ainda limitados. Segundo estimativas da OMS, se as iniciativas de alcance mundial não forem tomadas, em 2020 existirão no mundo 75 milhões de pessoas cegas e mais de 225 milhões de portadores de deficiência visual.

Perante tais previsões e expectativas torna-se urgente o desenvolvimento de sistemas destinados ao diagnóstico, tratamento e/ou manutenção do sistema visual.

Muitas das principais doenças oftalmológicas de natureza não refrativa são tratadas/controladas com fármacos que atuam no segmento anterior do olho, administrados topicamente, formulados em colírios e pomadas.

Porém, na última década, as injeções intravítreas de esteroides têm sido cada vez mais utilizadas no tratamento de doenças não-inflamatórias do segmento posterior do olho,

as quais incluem edema macular, degeneração macular relacionada com a idade e retinopatia diabética proliferativa. No que diz respeito à injeção ocular, a rápida circulação no segmento posterior do olho leva à diminuição do tempo de meia-vida do fármaco e da sua concentração no local. São necessárias, por isso, injeções periódicas que levam não só ao desconforto do doente mas também a outras complicações (1), tais como:

- ✓ Hemorragia vítrea;
- ✓ Infeções;
- ✓ Cataratas;
- ✓ Descolamento da retina;

Estas doenças do segmento posterior, cuja frequência tende a aumentar no futuro devido ao envelhecimento e estilo de vida, são também doenças crónicas cujo tratamento tradicional se mostra ineficiente. Torna-se necessário desenvolver formulações alternativas às tradicionais, como por exemplo, sistemas de libertação prolongada de fármacos, passíveis de serem implantados perto dos tecidos-alvo.

Micro e nano partículas como microesferas e lipossomas não constituem uma opção viável visto que a sua acumulação na cavidade vítrea é suscetível de causar embaçamento da visão bem como dificultar o exame de fundo de olho pelo oftalmologista (2). Por tudo isto, estão em desenvolvimento, recentemente, implantes capazes de promover a libertação prolongada de fármacos no interior do olho, sendo que em Portugal já existem sistemas deste tipo comercializados que serão aprofundados mais à frente neste trabalho.

## 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1 ANATOMOFISIOLOGIA DO OLHO

O sistema visual apresenta dois tipos de macroestruturas: o olho e os anexos oculares.

O olho pode ser dividido anatomicamente nas suas membranas, como se observa na figura 1. Assim do exterior para o interior temos três camadas: a esclerótica, a coróideia e a da retina.

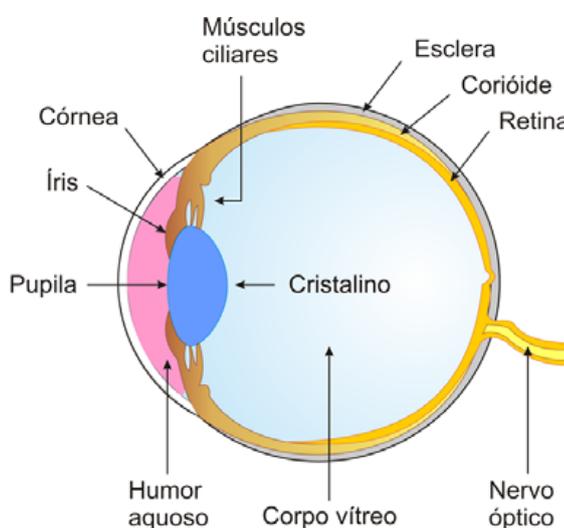


FIGURA 1: ANATOMIA DO OLHO

A esclerótica, juntamente com a córnea, constituem a membrana mais externa do olho ou a membrana fibrosa. A esclerótica constitui os 5/6 posteriores desta membrana e tem uma superfície externa, lisa e branca, que possui as inserções tendinosas dos músculos motores do olho e está unida à coróideia (membrana músculo-vascular) através de uma lâmina de tecido celular lasso rica em pigmentos, a lâmina fusca, o que confere à superfície interna da esclerótica uma cor acastanhada (3).

A coróideia faz parte da membrana músculo-vascular, tal como o corpo ciliar e a íris; a coróideia representa os 2/3 posteriores da referida membrana e situa-se entre a esclerótica e a retina, sendo essencialmente constituída por vasos sanguíneos com duas superfícies, uma externa (castanha e que está aplicada na face interna da esclerótica através da lâmina fusca, de vasos sanguíneos e nervos) e outra interna (lisa e negra e que está

relacionada com a retina, sem aderir a ela). A coroideia é perfurada pelo orifício do nervo ótico, que faz a continuação do orifício posterior da esclerótica. Alguns feixes de tecido conjuntivo das camadas mais superficiais da coroideia penetram nas fibras do nervo ótico e constituem o plano mais anterior da lâmina crivada. O limite anterior da coroideia é uma linha circular e sinuosa - a ora serrata, que se encontra entre a retina e o corpo ciliar (3-4).

A última membrana da parede do olho é a retina, a mais interna das três e a qual recobre toda a face interna da membrana músculo-vascular. Esta divide-se em duas partes, anterior e posterior, pois ao nível da ora serrata apresenta uma mudança brusca de espessura. Na face interna da retina distinguem-se duas zonas: a pupila (ligeiramente à frente do orifício do nervo ótico), que constitui o ponto de convergência das fibras óticas da retina que se unem para formar o nervo ótico, constituindo o ponto em que o nervo e a artéria central da retina penetram na mesma; e a fóvea central ou mácula, que é uma depressão localizada no polo posterior do olho.

Por fim, temos o corpo vítreo que preenche todo o espaço da cavidade ocular atrás do cristalino (câmara vítrea). O corpo vítreo é constituído por uma membrana, a membrana hialóidea, e por uma massa gelatinosa, o humor vítreo.

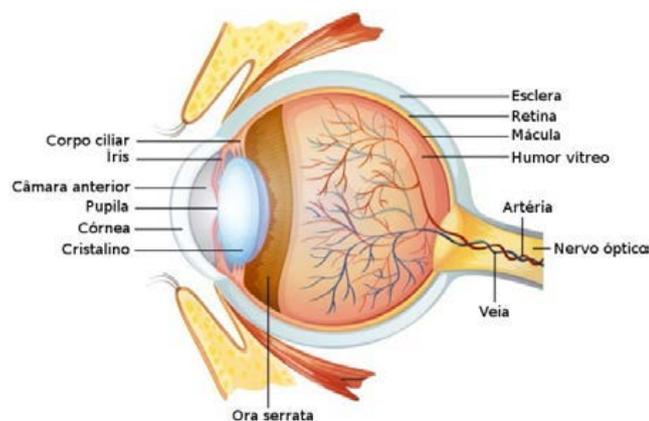


FIGURA 2: ANATOMIA DO OLHO (EM DETALHE)

A formação de imagem é então conseguida através do funcionamento fisiológico e integrado de todas estas estruturas. Os feixes luminosos atravessam a córnea, estrutura transparente, chegando à pupila e à íris. Estas últimas estruturas controlam a quantidade de luz que chega ao cristalino. O cristalino é uma estrutura altamente organizada cuja principal função é a refração da luz, permitindo focar ao longe, ao perto ou a distâncias intermédias. Entre a íris e a córnea e entre a íris e o cristalino encontram-se, respetivamente, a câmara anterior e posterior. Estas cavidades são preenchidas pelo humor aquoso, fluido transparente produzido pelo corpo ciliar cuja função é nutrir a córnea e o cristalino e

manter a pressão hidrostática conveniente para o olho. Quando os feixes luminosos atingem, por fim, a retina estes são captados por células fotorrecetoras que transformam a energia luminosa em impulsos nervosos que são levados pelo nervo ótico até ao cérebro onde ocorre todo o processo de descodificação da imagem (3).

As estruturas oculares, estando parcialmente em contacto com o exterior, necessitam de proteções adicionais.

Existem, principalmente, três tipos de barreiras que isolam o interior do globo ocular e, por sua vez, dificultam a administração de substâncias em concentração suficiente para atingir o efeito terapêutico.

A primeira, a córnea, exerce uma função de barreira mecânica ao proteger o olho contra traumas e infeções, seguida pela barreira hemato-aquosa responsável pela composição característica do humor aquoso em relação ao plasma sanguíneo. As principais diferenças são as menores concentrações de proteína e altas concentrações de ascorbato no humor aquoso, em comparação com o plasma (200 vezes menor e 20 vezes maior, respetivamente). A alta concentração de ascorbato pode ser útil para proteger as estruturas oculares anteriores do dano oxidativo induzido pela luz ultravioleta. No humor aquoso também existem grandes quantidades de lactato, possivelmente pela atividade glicolítica do cristalino, da córnea e de outras estruturas oculares (5).

Por último, temos a barreira hemato-retiniana constituída pelas células endoteliais dos capilares retinianos em conjunto com a sua própria membrana basal e unidas por “*tight junctions*”. Esta estrutura é uma barreira extremamente forte contra macromoléculas tornando a retina num tecido imunologicamente privilegiado (6).

Os anexos oculares, embora não façam parte das estruturas que se relacionem com a captação da imagem, são de extrema importância para a manutenção e proteção do olho. São eles: as pálpebras, os cílios, as sobrancelhas, as glândulas lacrimais e as lágrimas, os músculos oculares (responsáveis pelo movimento do olho na cavidade ocular) e a conjuntiva (membrana fibrovascular que recobre a esclera na porção visível do olho e a área interna das pálpebras) (7).

## 2.2 PATOLOGIAS DO OLHO

As patologias do olho afetam basicamente três áreas: os anexos oculares, o segmento anterior (córnea, íris, corpo ciliar e cristalino) e o segmento posterior (corpo vítreo, retina e coróide).

Como doenças representativas dos anexos oculares podemos considerar:

1. **Blefarite:** trata-se de uma inflamação crônica das margens das pálpebras. É possível notar o inchaço nessa região por congestionamento, podendo haver inclusive secreção;



FIGURA 3: BLEFARITE

2. **Conjuntivite:** trata-se de uma inflamação da conjuntiva. Pode também ocorrer na parte interna das pálpebras;



FIGURA 4: CONJUNTIVITE

3. **Hemorragia Subconjuntival:** patologia em que o sangue fica retido sob a conjuntiva, parecendo uma contusão no olho. Trata-se de uma alteração inócua que não afeta a visão. Normalmente no espaço de uma a três semanas o sangue é absorvido naturalmente;



FIGURA 5: HEMORRAGIA SUBCONJUNTIVAL

4. **Olho Seco:** é possível evitar, combater e aliviar os sintomas desta síndrome que se instala em consequência da escassez de lágrimas responsáveis pela lubrificação do olho;



FIGURA 6: OLHO SECO

5. **Pinguécula:** identificada por uma mancha amarelada na conjuntiva, num dos lados da córnea. Fatores como o vento, a poeira e a radiação ultravioleta podem estar entre as causas dessa alteração comum em pessoas que vivem em lugares muito ensolarados;



FIGURA 7: PINGUÉCULA

As patologias do segmento anterior que advêm de disfunções no grau de curvatura da córnea e do cristalino designam-se por erros refrativos. Decorrentes destas disfunções são geradas anomalias na imagem que chega à retina:

1. **Miopia:** erro refrativo que provoca visão desfocada ao longe. A luz projetada concentra-se em frente à retina;

2. **Hipermetropia:** erro refrativo que provoca visão desfocada ao perto. A luz que forma as imagens é projetada à distância e concentra-se atrás da retina;
3. **Astigmatismo:** erro refrativo que impede os raios de luz de se fixarem na retina. Provoca a distorção de imagens tanto para longe como para perto dependendo se está associado à miopia ou à hipermetropia;

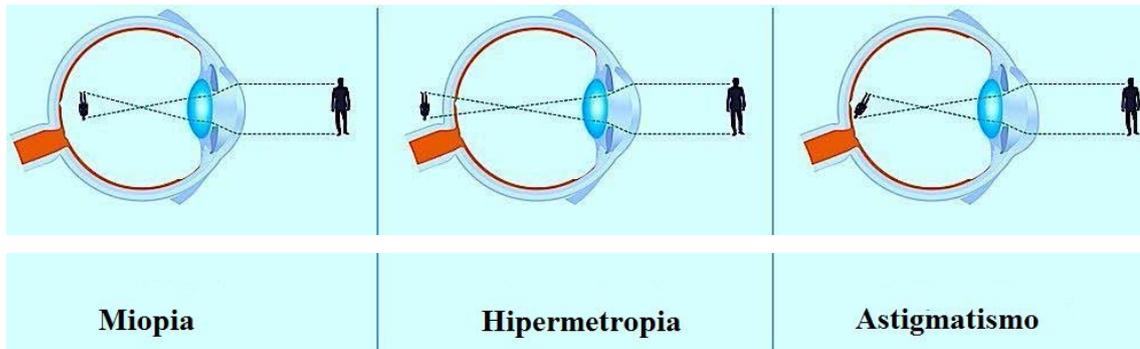


FIGURA 8: TIPOS DE ERROS REFRAATIVOS

4. **Ceratocone:** alteração degenerativa da córnea que a deixa muito fina, assumindo a forma de um cone. Essa forma irregular assumida pela córnea resulta na distorção da imagem percebida e num elevado grau de astigmatismo que não pode ser corrigido com lentes;
5. **Estrabismo:** também conhecido como desvio ocular, manifesta-se, com maior frequência, na infância. O olho poderá estar desviado para dentro (convergente), para fora (divergente) ou para cima ou para baixo (vertical). O desvio poderá ser manifesto (constante) ou intermitente (surge somente durante alguns períodos);

Ainda no segmento anterior, ocorrem outro tipo de patologias como:

1. **Catarata:** consiste na opacidade total ou parcial do cristalino resultante de várias causas como: diabetes *mellitus*, infecções oculares, traumatismo, idade, entre outras;

A cirurgia é o único meio de eliminar a catarata e consiste na remoção do cristalino e no implante de uma lente intraocular que pode restaurar a visão ao longe e ao perto;

2. **Presbiopia ou Vista Cansada:** manifesta-se após os 40 anos de idade quando o cristalino aumenta a sua rigidez de acomodação para focar as imagens ao perto;

Por último, a parte mais interna do olho (segmento posterior) e a mais difícil de alcançar farmacologicamente é alvo de patologias como:

1. **Degeneração Macular:** a forma “seca” caracteriza-se pela acumulação de resíduos causados pelas alterações no metabolismo da retina; a forma “húmida” é descrita pelo crescimento anormal de vasos na mácula. As duas formas impedem a chegada da imagem à retina e provocam dificuldades na visão, podendo levar à cegueira irreversível;
2. **Retinopatia Diabética:** manifesta-se quando os vasos sanguíneos da retina sofrem alterações e desenvolvem pequenos derrames, podendo causar visão desfocada;
3. **Descolamento de Retina:** ocorre quando há separação da retina da sua conexão na parte posterior do olho;
4. **Glaucoma:** o glaucoma é definido como uma neuropatia ótica crónica e progressiva, caracterizada por alterações típicas no nervo ótico e na camada de fibras nervosas da retina levando ao desenvolvimento de defeitos característicos no campo visual, que em estado avançado podem levar à cegueira irreversível;

### 2.3 FARMACOLOGIA DO OLHO

Existem três áreas onde os medicamentos oftálmicos podem atuar: na **superfície do globo ocular**, no seu **interior** e nos **anexos oculares**. Como referido anteriormente, os **anexos oculares** são constituídos pelas pálpebras, cílios, sobrancelhas, glândulas lacrimais e lágrima, músculos oculares e conjuntiva. As afeções nestas zonas são, geralmente, infeções cujo tratamento passa pela aplicação tópica de colírios, pomadas e géis. A viscosidade destes produtos tem vindo a aumentar de forma a combater a sua rápida diluição e lavagem pelo contínuo *turnover* das lágrimas e a sua perda pelo canal lacrimo-nasal.

A **superfície do globo ocular** é, então, alvo de infeções e processos inflamatórios. O fármaco de primeira escolha em muitas das infeções superficiais é a **eritromicina**. No entanto, tetraciclina como o **cloranfenicol** e as **fluoroquinolonas** também são recorrentes. As situações de alergia, ineficácia ou agravamento da infeção podem levar à utilização de **ácido fusídico**, **aminoglicosídeos** ou **trimetoprim** (Infarmed, 2015). As infeções oculares de origem fúngica são pouco frequentes, na maior parte dos casos são úlceras da córnea, que geralmente respondem ao tratamento com **clotrimazol**. O tratamento específico da queratite herpética atualmente quase se restringe ao **aciclovir tópico**, dada a sua eficácia e quase ausência de reações adversas (Infarmed, 2015).

Por outro lado, **o interior do olho** está praticamente isolado. A existência de barreiras (da córnea, hemato-aquosa e hemato-retiniana) faz com que **o interior do globo ocular** seja apenas atingido por moléculas pequenas ou muito lipófilas. Destacam-se os corticosteroides: **dexametasona**, **fluorometolona** e **prednisolona**. Em alternativa às injeções intravítreas, o uso tópico destes fármacos (eventualmente associado a terapêutica sistémica) deve ser sempre ponderado porque pode agravar quadros infecciosos, particularmente a queratite herpética e as infeções fúngicas, bem como desencadear um glaucoma cortisónico.

Desta forma, quando se usa a via sistémica, as concentrações intraoculares dos fármacos são quase sempre baixas, geralmente muito inferiores às respetivas concentrações plasmáticas. Tal facto obriga à utilização de concentrações muito elevadas de fármacos (acarretando todos os efeitos secundários e sistémicos adjacentes) ou à utilização de administração intraocular (6).

## **2.4 IMPLANTES OCULARES DE LIBERTAÇÃO DE FÁRMACOS**

Os dispositivos intraoculares dividem-se em Lentes Intraoculares (LIO) e Implantes de Liberação.

Sistemas como as LIO podem ser fálicas (designadas por lentes Artisan) ou pseudofálicas. As lentes fálicas são dispositivos médicos colocados atrás da córnea e fixadas à frente da íris que são utilizados em erros refrativos como a miopia, a hipermetropia e o astigmatismo (8). Por outro lado, as lentes pseudofálicas têm como finalidade a substituição do cristalino no tratamento de patologias como as cataratas. Estes últimos implantes dividem-se em “*Cristalino Dobrável*” e “*Cristalino Dobrável Multifocal*”, sendo que este último aplica-se a casos onde também existe acentuada miopia e hipermetropia (9).

Os implantes de liberação têm a finalidade de introduzir e libertar fármacos no segmento posterior do olho. Em Portugal já existem comercializados este tipo de sistemas, entre eles, o Iluvien® e o Ozurdex®.

O sistema matricial Ozurdex®, aprovado em 2009 pela FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento do edema macular, é um implante intraocular composto por um sistema polimérico sólido (Novadur®) e pela substância ativa dexametasona (corticosteroide). O sistema Novadur é composto por uma matriz de PLGA (poli (ácido láctico-co-glicólico)) que lentamente sofre erosão e clivagem originando ácido láctico e ácido glicólico. Desta forma ocorre a extensão da liberação da dexametasona por um período de 6 meses (1).

O Iluvien®, aprovado em 2013 pelo Infarmed, é um implante intraocular à base de álcool polivinílico que contém 190 mg de acetato de fluocinolona (corticosteroide). Trata-se de um pequeno tubo cilíndrico de 3,5 mm de comprimento e 0,35 mm de diâmetro composto por poliamida selado por silicone numa das extremidades. A outra extremidade contém o álcool polivinílico que por difusão simples permite a saída da substância ativa (1).

O sistema de liberação de fármaco na forma de implante deve ser biocompatível com o organismo; os componentes presentes necessitam de ser não carcinogénicos, hipoalergénicos, mecanicamente estáveis e não causadores de resposta inflamatória no local de aplicação.

## ***Estrutura e composição de Implantes Oculares de libertação de fármacos (IOLF)***

Os implantes são preparados a partir de polímeros biodegradáveis ou não-biodegradáveis, podendo ser de dois tipos: matriciais (ou monolíticos) e reservatórios. A sua estrutura adquire diferentes formas: cilindros, discos ou membranas (2).

Nos sistemas matriciais o fármaco encontra-se disperso homogeneamente no sistema polimérico ou adsorvido à sua superfície, e a libertação ocorre por difusão através dos poros da matriz, por degradação do polímero ou por uma combinação dos dois mecanismos. Caso a velocidade de degradação do polímero seja inferior à difusão do fármaco, a libertação inicial deste último é dependente de sua difusão pelo sistema polimérico, podendo diferir se ele estiver dissolvido molecularmente ou disperso (2).

Nos sistemas reservatório, o fármaco encontra-se numa cavidade central envolta por uma membrana polimérica, a qual controla a taxa de libertação. Mudanças na natureza e espessura dessa membrana promovem alterações na velocidade de libertação dos fármacos (2).

Atualmente existe uma utilização preferencial de materiais poliméricos biodegradáveis na composição de implantes. Estes apresentam vantagens já que são totalmente absorvidos pelo organismo, não necessitando de remoção subsequente e proporcionam melhor adesão e aceitação do doente ao tratamento. Os produtos resultantes da sua degradação são metabolizados a dióxido de carbono e água, via ciclo de Krebs, ou são excretados na urina (6).

Polímeros biodegradáveis naturais e sintéticos estão sendo estudados como componentes em sistemas de libertação de fármacos, mas apenas alguns têm demonstrado verdadeira biocompatibilidade. Os naturais, à base de proteínas ou polissacarídeos como as albuminas bovina e humana, o colagénio e a gelatina, o quitosano e o ácido hialurónico, apresentam uso restrito por conterem pureza questionável e, em alguns casos, atividade antigénica marcante; já os sintéticos, representados por poliamidas, poliaminoácidos, polialquilcianacrilatos, poliésteres, poliortoésteres, poliuretanos e poliacrilamidas, têm apresentado crescente interesse na aplicação em sistemas de libertação de fármacos (2).

Os polímeros biodegradáveis mais investigados na preparação de IOLF são os poliésteres, tais como a PCL, o PLA (poliácido láctico) e o PLGA (5). Na classe dos polímeros não biodegradáveis destaca-se o poli (ácido vinílico) e o PEVA poli (etileno-co-acetato de vinilo).

## PLA e PLGA

Estes polímeros têm propriedades mecânicas ajustáveis e, mais importante, são aprovados pela FDA. Em particular, o PLGA (figura 9) tem sido extensivamente estudado para o desenvolvimento de dispositivos para administração controlada de fármacos com baixa massa molecular, proteínas e outras macromoléculas em uso comercial e na investigação científica.

O sistema matricial Ozurdex®, referido anteriormente, é um exemplo dos vários implantes de liberação controlada de fármacos à base de PLGA atualmente no mercado. Desta forma ocorre a extensão da liberação da dexametasona por um período de 6 meses (1).

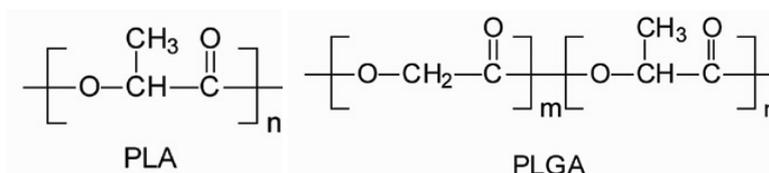


FIGURA 9: ESTRUTURA QUÍMICA DO PLA E DO PLGA

## PCL

A PCL (figura 10) é um polímero bastante hidrofóbico, biocompatível e semi-cristalino com uma temperatura de transição vítrea de - 60°C e com um ponto de fusão que varia entre 59°C e 64°C, dependendo da sua natureza cristalina.

A biodegradação da PCL ocorre por meio de erosão/clivagem da cadeia polimérica; pelo fato de apresentar uma velocidade de degradação lenta, esta pode promover a liberação do fármaco por um período de três anos (5).

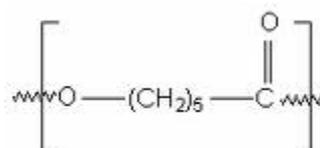


FIGURA 10: ESTRUTURA QUÍMICA DA PCL

Este polímero é bastante utilizado na preparação de nanocápsulas e, atualmente, também tem sido utilizado para o desenvolvimento de outros sistemas de liberação prolongada.

## Álcool Polivinílico

O álcool polivinílico pertence a um conjunto de polímeros não-biodegradáveis solúveis em água e que se tornam insolúveis quando quimicamente reticulados; considerando este facto, pode afirmar-se que são insolúveis em água, mas apresentam uma matriz fortemente hidrofílica (6).

O Iluvien®, referido anteriormente, é um exemplo de um implante de libertação controlada à base de álcool polivinílico.

O Retisert® aprovado pela FDA contém a mesma substância ativa que o Iluvien® - acetono de fluocinolona; a composição do reservatório e da matriz de dispersão também é semelhante ao anterior, no entanto, a dose libertada por este é superior.

### **Luwax EVA 3**

O Luwax EVA 3 (figura 11) é classificado como um PEVA, ou seja, é um copolímero de etileno e acetato de vinilo. É utilizado no fabrico de borrachas e plásticos devido à sua elasticidade e flexibilidade; o acetato de vinilo constitui 10 a 40% do copolímero, sendo o restante etileno.

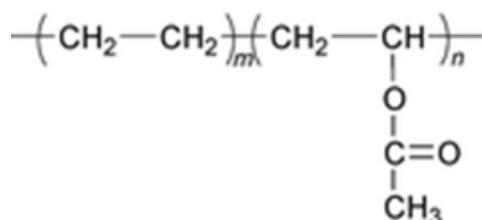


FIGURA 11: ESTRUTURA QUÍMICA DO LUWAX EVA 3

Devido à sua hidrofobicidade tem a capacidade de formar estruturas com elevada porosidade através da separação de fases termicamente induzida (TIPS).

Este processo consiste em promover o aumento da solubilidade do polímero em determinado solvente através do aquecimento da mistura. Posteriormente, aquando do arrefecimento da mesma ocorre uma separação de fases: uma rica em polímero, outra rica em solvente. Após a evaporação do solvente obtém-se uma estrutura morfológica caracterizada por uma extensa rede de poros e canalículos (10).

## Lutrol F127

O Lutrol F127 (figura 12) é um copolímero de polioxietileno e polioxipropileno usado como agente espessante e formador de géis. Tem a aparência de um pó branco com consistência cerosa e a sua estrutura é a seguinte:

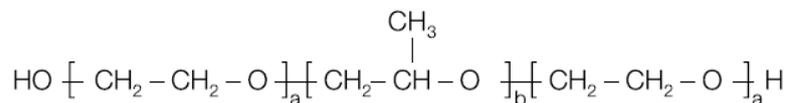


FIGURA 12: ESTRUTURA QUÍMICA DO LUTROL F127 (ONDE A É APROXIMADAMENTE 101 E B APROXIMADAMENTE 56)

O Lutrol F127 apresenta solubilidade elevada em água, etanol (95%) e isopropanol, tornando-o num veículo eficaz para a solubilização de fármacos hidrofílicos.

## **2.5 MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE IMPLANTES: ELECTROSPINNING**

De acordo com os estudos realizados até ao momento, os implantes podem ser obtidos pelos métodos de *melting*, *solvent casting* e *electrospinning* (6).

O *melting* é um processo que é inadequado a fármacos termolábeis, uma vez que neste método se usam temperaturas elevadas, próximas do Pf (ponto de fusão) do polímero e sem atingir o Pf do fármaco. A moldagem e a extrusão são duas técnicas que acopladas ao *melting* permitem a obtenção da forma final do implante. Na moldagem, a mistura de pós (contendo o polímero e o fármaco) previamente liofilizada é colocada num molde desenvolvido com a forma do implante onde é sujeita ao aumento de temperatura e pressão (2). O calor fomenta a plasticidade do polímero que acaba por envolver o fármaco em pó e, quando arrefecidos, a mistura adquire a forma do molde. Na extrusão, a mistura de pós é propulsionada continuamente pelo equipamento, passando por regiões de alta temperatura e pressão, onde sofre fusão e compactação de acordo com a forma final do implante (2).

O método de *solvent casting* envolve o uso de solventes orgânicos apropriados para dissolver o fármaco no polímero; a solução formada é, então, lançada sobre uma superfície lisa e não adesiva e aquando da evaporação do solvente o filme formado é retirado da superfície (6).

O *Electrospinning* utiliza forças eletrostáticas que provocam aceleração nas soluções de fármaco com polímero produzindo continuamente fibras com diâmetros na ordem dos nanómetros podendo atingir os micrómetros (11).

As fibras produzidas podem ser monolíticas, ou seja, de constituição homogénea; ou podem ser coaxiais nas quais a constituição difere do interior para o exterior.

Na produção destas últimas fibras utiliza-se um sistema coaxial de agulhas que permite que a solução do polímero exterior incorpore a solução do núcleo contendo o fármaco.

A formação das fibras é iniciada com o “cone de *Taylor*” – estrutura formada na saída da agulha coaxial que se assemelha a uma gotícula a partir da qual emergem as fibras recém-formadas numa forma cónica. Todo o processo é extremamente rápido, na ordem dos 10 milissegundos, suficiente para a evaporação dos solventes. Porém, o solvente do núcleo evapora mais lentamente através do polímero exterior resultando numa estrutura em microtúbulo (12).

Atualmente, a comercialização de equipamentos e de materiais de *electrospinning* têm vindo a ganhar destaque. Tendo em vista a transposição de escala têm surgido melhorias e modificações de modo a otimizar a produção de fibras. O alinhamento uniaxial de fibras

utilizando dois coletores paralelos e os sistemas de multi-agulhas para dispensar volumes elevados são exemplos de modificações que permitem a otimização e a transposição de escala desta técnica (13).

## 2.6 FIBRAS CORE-SHELL

Como descrito anteriormente, as fibras “core-shell” são formadas quando se utiliza um sistema coaxial em que o polímero de revestimento difere do polímero do núcleo, criando fibras heterogêneas.

A utilização de dois polímeros com características diferentes permite a encapsulação de substâncias ativas no interior da fibra e a sua posterior libertação prolongada através do polímero de revestimento.

A preparação de todo o processo passa por duas etapas: a primeira, em que são selecionados os polímeros e os solventes respetivos; e a segunda, em que se otimizam os parâmetros da técnica propriamente dita.

Polímeros hidrofóbicos são preferíveis para o revestimento da fibra de modo a encapsularem o interior já que a sua degradação ocorre por erosão do polímero ou difusão através dos poros, prevalecendo um ou outro mecanismo de acordo com as propriedades do fármaco e do excipiente utilizado (14).

Pelo contrário, os polímeros hidrofílicos são eleitos para constituir o interior das fibras porque dissolvem em maior extensão os fármacos que são, também na sua maioria, hidrofílicos. A sua degradação compreende as seguintes etapas: i) intumescimento do polímero com formação de uma camada de gel; ii) difusão do fármaco através da camada de polímero intumescido e iii) erosão do polímero intumescido.

Quanto à segunda etapa, o *electrospinning* compreende várias fases sequenciais: o jato de polímero extrudido, o alinhamento das fibras e a deposição das mesmas (ver figura 13) (11). O caudal das soluções poliméricas e a voltagem são fatores que alteram o jato de polímero levando à deposição de fibras maiores ou menores; quanto ao tipo e forma do coletor podemos obter fibras sem direção privilegiada ou fibras orientadas uniaxialmente.

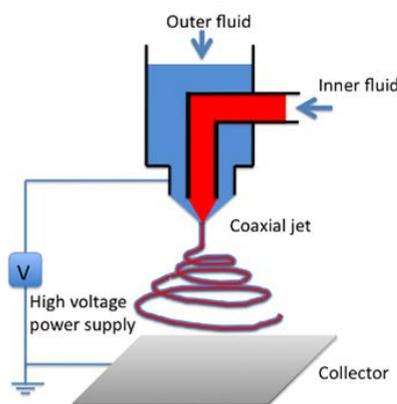


FIGURA 13: ESQUEMA DA FORMAÇÃO DE FIBRAS CORE-SHELL

## 2.7 ACETAZOLAMIDA: PERSPETIVAS E CONSIDERAÇÕES NO TRATAMENTO DO GLAUCOMA

O glaucoma, causa maioritária da cegueira irreversível, estima-se que afete mais de 67 milhões de pessoas; e esta designação oftálmica utiliza-se para uma série de distúrbios que provocam o aumento da pressão intraocular (PIO).

O humor aquoso, formado por iões bicarbonato, sódio e água, provoca, em excesso, o aumento da PIO.

A reação de formação do bicarbonato, catalizada pela enzima anidrase carbónica, é evidenciada na figura 14:

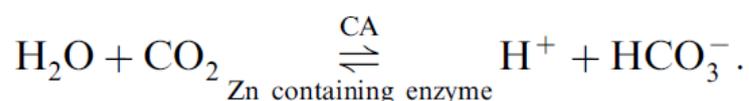


FIGURA 14: FORMAÇÃO DO IÃO BICARBONATO COMO PRODUTO DA REAÇÃO ENTRE A ÁGUA E O DIÓXIDO DE CARBONO

O mercado farmacêutico para o tratamento do glaucoma é basicamente dominado pelos Inibidores da Anidrase Carbónica (IAC).

Os IAC diminuem, assim, a concentração de iões bicarbonato, seguidamente de iões sódio e água, diminuindo a síntese de humor aquoso e da pressão intraocular.

A acetazolamida pertence à classe dos IAC e por mais de quarenta anos foi dos fármacos mais utilizados no tratamento do glaucoma, através da sua administração por via oral. Porém, os efeitos extraoculares, como: anorexia, falência renal, acidose metabólica, entre outros, levaram ao desuso gradual deste fármaco.

A crescente investigação de novos sistemas farmacêuticos de transporte aliada a novos materiais que permitem a libertação modificada permitiu a reciclagem de muitas substâncias ativas anteriormente em desuso, entre as quais, a acetazolamida. A incorporação deste fármaco em sistemas farmacêuticos de libertação controlada e localizada é a base racional deste trabalho.

### 3. OBJETIVOS

Face ao exposto anteriormente, a incorporação da acetazolamida em sistemas farmacêuticos de liberação controlada e localizada é a base deste trabalho científico, cujo objetivo geral visa a produção de um dispositivo composto por fibras coaxiais contendo acetazolamida dispersa.

Este sistema farmacêutico tem como destino final a aplicação ocular (tópica) associada a uma liberação prolongada.

Mais particularmente, também constitui um objetivo deste trabalho averiguar quais os parâmetros que determinam a cinética de liberação da substância ativa mais favorável, entre os quais: a composição química do núcleo das fibras coaxiais, a presença/ausência de revestimento, o tipo de polímero para revestimento e a respetiva espessura.

## 4. MATERIAIS

No decorrer deste trabalho experimental utilizaram-se as seguintes substâncias e reagentes:

- ✓ Acetazolamida da Alfa Aesar e grau de pureza 99%
- ✓ Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) da BASF, Caprolactones Limited
- ✓ Lutrol F127 (poli (oxietileno-b-oxipropileno-b-oxietileno)) da BASF, 70% de oxietileno e massa molar de 9,8-14,6 g/mol
- ✓ Luwax EVA 3 (poli (etileno-co-acetato de vinilo)) da BASF, 13-15% de acetato de vinilo
- ✓ Clorofórmio da Fisher Scientific UK, reagente de grau analítico
- ✓ Dimetilformamida da Fisher Scientific UK, reagente de grau analítico
- ✓ Metanol da Fisher Scientific UK, reagente de grau analítico
- ✓ Etanol da Fisher Scientific UK, reagente de grau analítico
- ✓ Tetraidrofurano da Fisher Scientific UK, reagente de grau analítico
- ✓ Reagentes usados na preparação do tampão fosfato salino da Sigma, reagentes de grau analítico

No decorrer deste trabalho científico utilizaram-se os seguintes equipamentos:

- ✓ Montagem de *electrospinning*, constituída por um gerador de alta voltagem (SL 10W-300W, Spellman), duas bombas de seringa (New Era Pump Systems), um coletor quadrangular de cobre e um sistema de agulhas coaxiais
- ✓ Espectrofotómetro modelo V-530 da Jasco
- ✓ Equipamento de FTIR modelo FT-IR 4200 da Jasco
- ✓ Equipamento ângulo de contacto modelo OCA-20 da DataPhysics Instruments
- ✓ Equipamento de SEM modelo Zeiss Gemini Field Emission Scanning Eletron Microscope
- ✓ Equipamento de Análise térmica simultânea (DSC/TGA) Q600 (TA Instruments)

## 5. MÉTODOS

A metodologia utilizada no decorrer deste trabalho experimental divide-se em:

- ✓ Métodos utilizados na preparação de implantes por *electrospinning*;
- ✓ Métodos utilizados na caracterização morfológica e físico-química de implantes;
- ✓ Métodos utilizados no estudo da cinética de libertação *in vitro* dos implantes;

### **5.1 Métodos utilizados na preparação de implantes por electrospinning**

#### 5.1.1 Considerações Gerais

Os Implantes desenvolvidos neste trabalho são constituídos por PCL e, em menores quantidades, por lutrol F127 e luwax EVA 3.

No final desta etapa pretende-se obter:

- Implantes com formulação à base de lutrol F127 dissolvido em metanol e dimetilformamida (MD);
- Implantes com formulação à base de lutrol F127 dissolvido em etanol, dimetilformamida e água (EDW);
- Implantes *blending*, ou seja, compostos por fibras uniaxiais;
- Implantes MD revestidos com um filme de PCL/lutrol F127 ou PCL/luwax EVA 3;
- Implantes EDW revestidos com um filme de PCL/lutrol F127 ou PCL/ luwax EVA 3;

A preparação dos implantes inicia-se com a produção de membranas fibrosas constituídas por fibras coaxiais cujo interior é constituído por lutrol F127 dissolvido em solventes diferentes. Estas membranas devidamente cortadas e enroladas constituem os implantes sem revestimento. Pelo método de *solvent casting* produzem-se os filmes que irão revestir os restantes implantes. A figura 15 ilustra, de forma geral, a metodologia utilizada na preparação dos implantes.

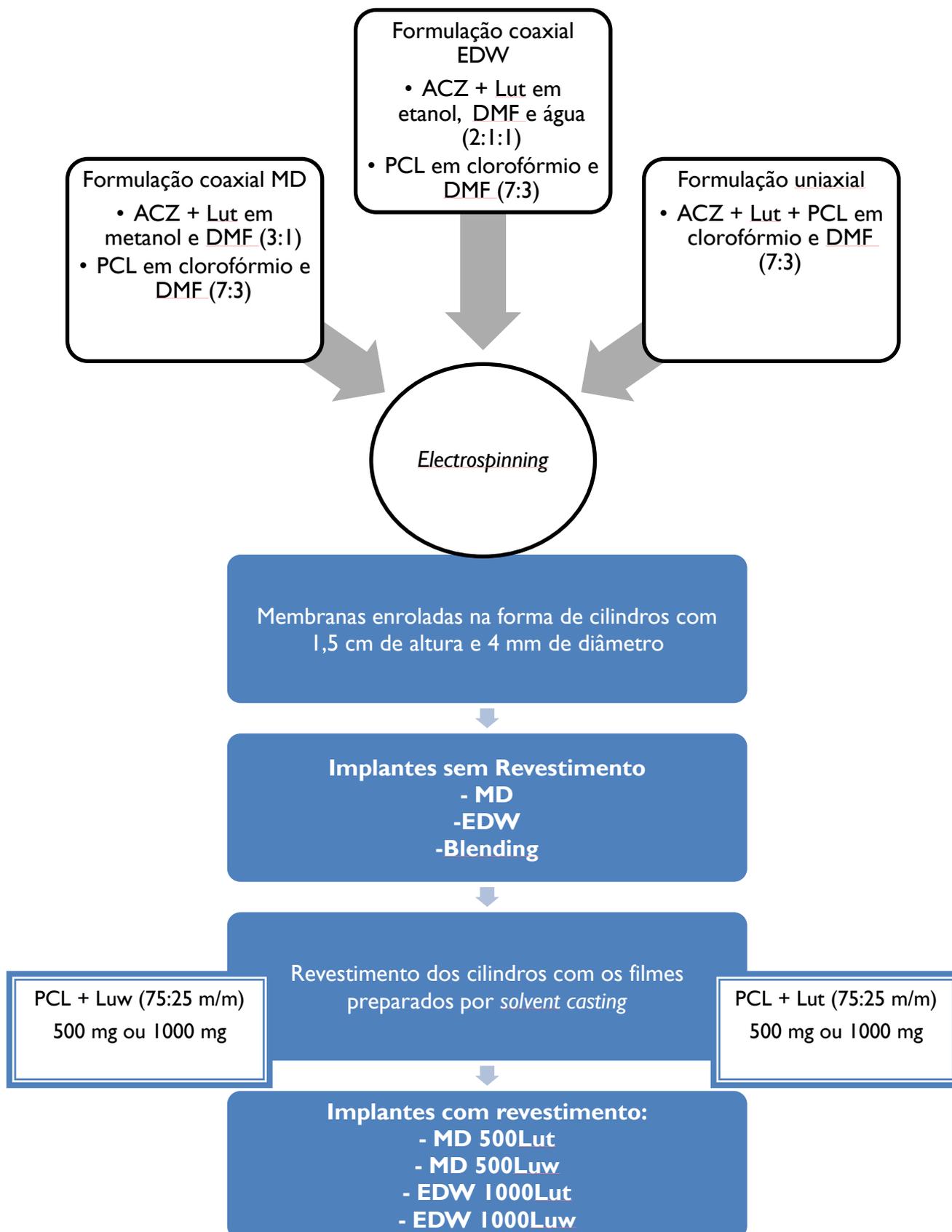


FIGURA 15: ESQUEMA GERAL DA PREPARAÇÃO DOS IMPLANTES

## 5.1.2 Protocolo experimental

5.1.2.1 *Preparação das soluções de lutrol F127 e acetazolamida que constituem o interior das fibras:*

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES E SOLVENTES UTILIZADOS PARA PRODUIR O INTERIOR DAS FIBRAS

<b>Tipo de Fibras</b>	<b>Formulação</b>	<b>Lutrol F127 (massa)</b>	<b>Acetazolamida (massa)</b>	<b>Solventes</b>	<b>Volume</b>
<b>Coaxiais</b>	MD	0,3g	75 mg	MeOH:DMF 3:1	2 mL
<b>Coaxiais</b>	EDW	0,3g	75 mg	EtOH:DMF:H <sub>2</sub> O 2:1:1	2 mL
<b>Uniaxiais</b>	<i>Blending</i>	0,3g	75mg	CLF:DMF 7:3	10mL

A preparação das soluções seguiu as indicações da tabela 1, obtendo-se três soluções diferentes. As soluções foram sujeitas a agitação durante 48 horas.

5.1.2.2 *Preparação da solução de PCL em CLF:DMF (7:3) que constitui o revestimento das fibras:*

Pesou-se 2,4 g de PCL e dissolveu-se o sólido numa mistura de 11,2 mL de clorofórmio e 4,8 mL de dimetilformamida, perfazendo 16 mL de volume (8 mL para cada solução de lutrol F127). A solução foi sujeita a agitação durante 48 horas.

5.1.2.3 *Electrospinning setup:*

A montagem do equipamento de *electrospinning* foi realizada como evidencia a figura 16. Nesta experiência foram controlados e definidos certos fatores condicionantes da formação de fibras: a voltagem, o caudal ou fluxo libertado por cada seringa e a distância da ponta da seringa ao coletor. Na tabela 2 encontram-se os parâmetros anteriormente mencionados.

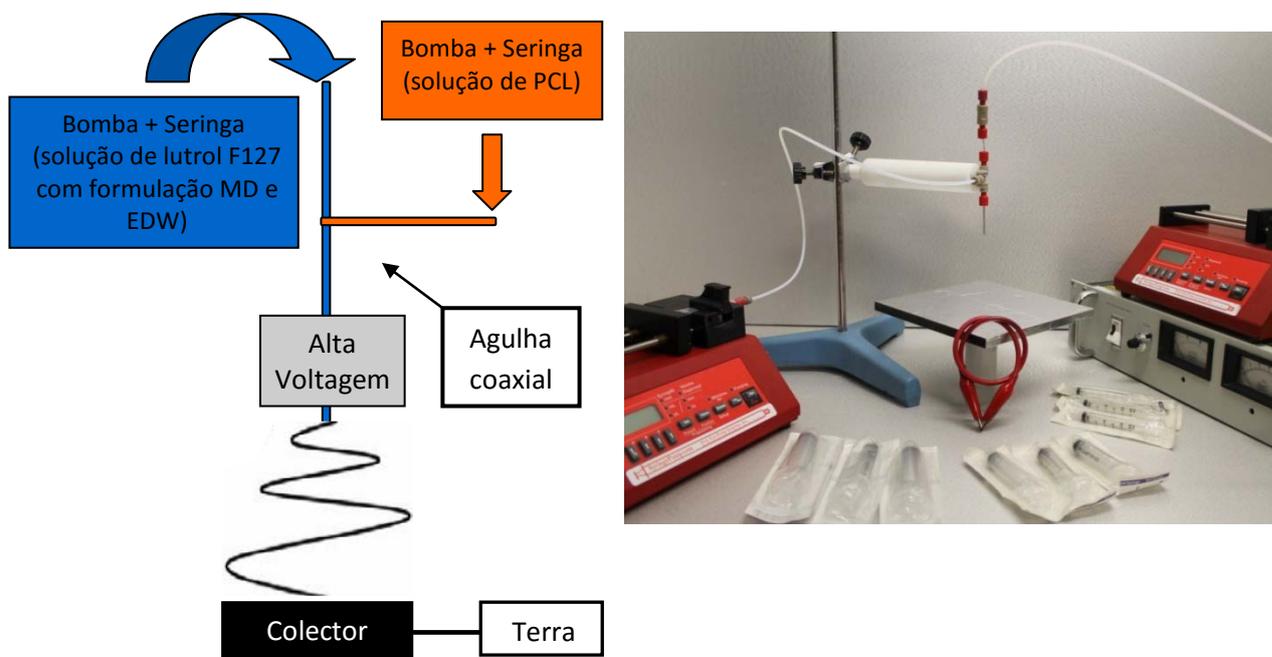


FIGURA 16: MONTAGEM DO EQUIPAMENTO DE ELECTROSPINNING

TABELA 2: PARÂMETROS UTILIZADOS NO MÉTODO DE ELETROSPINNING EM CADA FORMULAÇÃO

Formulação	Caudal da solução de Lutrol F127	Caudal da solução de PCL	Voltagem	Distância
MD	0,5 mL/h	2,0 mL/h	16kV	20 cm
EDW	0,5 mL/h	2,0 mL/h	15kV	20 cm
Blending	2,5 mL/h		11kV	20 cm

#### 5.1.2.4 Preparação dos implantes

As membranas obtidas anteriormente foram cortadas em retângulos com 4 cm de comprimento por 1,5 cm de largura, aproximadamente. Os implantes foram obtidos pelo enrolamento dos retângulos acima descritos. Utilizou-se clorofórmio, em quantidade residual, apenas para selar as extremidades dos cilindros (as duas bases) e a parte lateral.

#### 5.1.2.5 Preparação dos filmes de Revestimento dos Implantes:

As soluções de polímeros de revestimento foram preparadas conforme a tabela 2:

TABELA 3: COMPOSIÇÃO DOS FILMES DE REVESTIMENTO

Formulação	Polímeros		Total (mg)	Solvente	%Lutrol F127/Luwax EVA 3	%PCL
500Lut	125 mg Lutrol F127	375 mg PCL	500	THF (Tetrahidrofurano)	25%	75%
500Luw	125 mg Luwax EVA 3	375 mg PCL	500	THF	25%	75%
1000Lut	250 mg Lutrol F127	750 mg PCL	1000	THF	25%	75%
1000Luw	250 mg Luwax EVA 3	750 mg PCL	1000	THF	25%	75%

As soluções foram sujeitas a agitação até dissolução completa. No caso das soluções com Luwax EVA 3, foi necessário recorrer ao aquecimento (50°C) até dissolução total.

Por fim, as soluções foram vertidas para placas de *petri* e colocadas a secar na *hotte* durante 24 horas até à formação de um filme.

#### 5.1.2.6 Revestimento dos implantes cilíndricos com os filmes:

Os filmes foram cortados em retângulos com área suficiente para cobrir todo o cilindro. De seguida a aresta maior do retângulo foi “pincelada” com clorofórmio facilitando a adesão ao cilindro. De seguida, parte dos implantes cilíndricos da formulação MD e EDW foram revestidos pelo respetivo filme tendo sido as suas pontas enroladas e seladas com calor (ver figura 17).

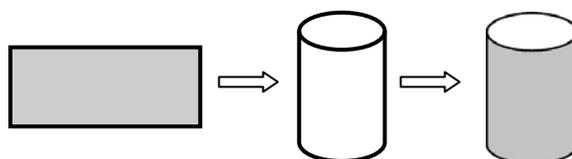


FIGURA 17: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO REVESTIMENTO DOS IMPLANTES

## 5.2 Caracterização morfológica e físico-química de Implantes

### 5.2.1 Considerações Gerais

Na caracterização morfológica e físico-química dos implantes preparados empregaram-se métodos para examinar as características morfológicas das fibras e dos implantes, para analisar o conteúdo das fibras e para estudar o grau de hidrofiliicidade dos implantes.

As técnicas utilizadas foram:

- SEM: capaz de produzir imagens de alta resolução com uma aparência tridimensional característica, esta técnica revelou-se eficaz para avaliar a estrutura superficial de uma dada amostra. Este método utilizou-se na análise morfológica das fibras produzidas, na análise da superfície transversal dos implantes revestidos e na análise da superfície lateral dos mesmos implantes;
- Espetroscopia de infravermelho (FTIR): este tipo de espectroscopia baseia-se na absorção de radiação infravermelha pelos grupos funcionais das moléculas. Cada composto tem, assim, um espectro único de absorção de radiação dependendo dos seus grupos funcionais e das vibrações e alongações dos mesmos. Esta técnica permite a identificação de misturas complexas partindo da sobreposição do espectro inicial com espectros de substâncias conhecidas. Aquando da utilização desta técnica foram realizados espectros de todos os componentes utilizados na experimentação a fim de comparar com as membranas preparadas;
- Ângulo de contacto: esta técnica mede o ângulo formado entre a superfície em estudo e uma gotícula de água que é deixada cair sobre a mesma (ver figura 18). Assim, avalia-se o grau de afinidade da superfície com a água e conclui-se acerca do grau de hidrofiliicidade da superfície.

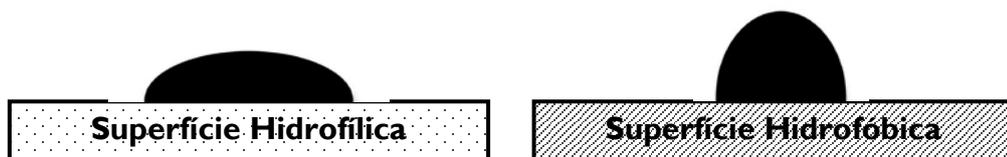


FIGURA 18: ESQUEMA DO COMPORTAMENTO DA GOTA DE ÁGUA CONFORME A NATUREZA HIDROFÍLICA/HIDROFÓBICA DA SUPERFÍCIE

- Análise térmica simultânea: esta técnica refere-se à aplicação da calorimetria diferencial de varrimento (DSC) acoplada com a termogravimetria (TGA) e permite identificar eventos térmicos e determinar a temperatura de transição vítrea, de fusão e de degradação (onset) dos polímeros.

## 5.2.2 Protocolo experimental

### 5.2.2.1 Análise dos implantes por SEM

Recorrendo a esta técnica analisaram-se os implantes no que diz respeito à sua morfologia. Os implantes cilíndricos foram mergulhados em azoto líquido e em seguida cortados ao meio com um bisturi, sendo que ambas as partes foram utilizadas na análise por SEM: uma para observar o corte transversal, outra para analisar a superfície lateral. As amostras foram coladas a um suporte com fita de carbono, revestidas com ouro durante 10 segundos e analisadas num *Geiss Gemini Field Emission SEM*.

### 5.2.2.2 Análise dos implantes por FTIR

Nesta técnica foram obtidos espectros das seguintes substâncias/materiais:

- Acetazolamida em pó;
- PCL em filme;
- Lutrol F127 em filme;
- Implante *blending* com fármaco;
- Implante MD;
- Implante EDW;

Os filmes de PCL e lutrol F127, analisados por FTIR, foram preparados dissolvendo 1 g de polímero em 10 mL de clorofórmio e metanol, respetivamente. As soluções foram vertidas para placas de *petri* e colocadas na *hotte* durante 24 horas. Os espectros foram adquiridos no modo ATR num espectrómetro Jasco FT/IR-4200 equipado com um *Golden Gate Single Reflection Diamond ATR*. Os espectros foram obtidos a 64 *scans* com a resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , entre 600 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 5.2.2.3 Ângulo de Contato

Foi medido o ângulo de contacto entre gotículas de água e as seguintes estruturas:

- Membrana *blending* com e sem fármaco;
- Membrana coaxial MD;
- Membrana coaxial MD sem fármaco;
- Revestimento contendo lutrol F127;
- Revestimento contendo luwax EVA 3;

#### 5.2.2.4 Análise Térmica Simultânea

Foram sujeitas a análise térmica simultânea (DSC/TGA) as seguintes estruturas:

- Acetazolamida em pó;
- Lutrol F127 em pó;
- PCL em pó;
- Implante com formulação EDW;
- Implante com formulação MD;
- Implante com formulação *blending*;

As amostras, com um peso entre 5 e 10 mg, foram colocadas em cadinhos de porcelana e analisadas num SDT Q600 da TA *Instruments*, entre a temperatura ambiente e os 500°C, utilizando uma taxa de aquecimento de 10°C/minuto.

### **5.3 Cinética de Liberação in vitro dos Implantes**

#### **5.3.1 Considerações Gerais**

O estudo da liberação *in vitro* dos implantes permite determinar quais os parâmetros que condicionam a melhor cinética de liberação de fármaco, pretendendo-se atingir uma liberação prolongada. Estes parâmetros abrangem a composição do implante, a presença/ausência de revestimento e a respetiva espessura e estão relacionados com os fenómenos de intumescimento, erosão e difusão.

Polímeros hidrofílicos como o lutrol FI27 em contacto com a solução salina tendem a intumescer, formando uma camada de gel por onde se difunde o fármaco. Por outro lado, polímeros hidrofóbicos como a PCL e o luwax EVA 3 sofrem erosão formando-se canalículos por onde se difunde o fármaco.

Nos implantes formados coexistem os fenómenos descritos anteriormente já que as fibras coaxiais são constituídas por lutrol FI27 no seu interior e PCL no exterior. No caso dos implantes revestidos, ocorre o intumescimento exterior nos que contêm lutrol FI27 e ocorre erosão nos que contêm luwax EVA 3.

A liberação de fármaco nos implantes é, assim, um processo complexo que deve ser estudado de modo a definir quais os parâmetros que condicionam uma liberação mais prolongada.

#### **5.3.2 Protocolo experimental**

##### *4.1 Ensaio de liberação dos implantes*

Cada implante foi colocado em frascos de vidro individuais contendo 4 mL da solução de PBS. Os frascos foram mantidos numa estufa a 37°C, sendo removido na totalidade e em tempos pré-determinados o meio de liberação e substituído por PBS fresco. Estas amostras recolhidas ficaram armazenadas no frigorífico ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) até à sua quantificação.

##### *5.3.2.1 Quantificação do fármaco libertado*

As amostras foram quantificadas pela técnica de espectrofotometria. A curva de calibração foi obtida através da preparação prévia de várias soluções PBS contendo diferentes concentrações de fármaco. Estas variavam entre 5,3 ug/mL até 26,5 ug/mL. A análise de absorvências foi efetuada no comprimento de onda de 266 nm.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **6.1. Obtenção dos Implantes**

#### *6.1.1 Espessura dos filmes de revestimento*

A tabela 4 apresenta os valores da espessura de cada filme de revestimento. Os polímeros foram dissolvidos no mesmo volume de solvente (THF) e as soluções foram colocadas em placas de vidro iguais, logo, as soluções com maior massa polimérica apresentam filmes mais espessos, como podemos confirmar na referida tabela.

TABELA 4: COMPOSIÇÃO E ESPESSURA DOS FILMES DE REVESTIMENTO

Solução	Massa dos polímeros		Total	Espessura ( $\mu\text{m}$ )
500 Lut	125 mg Lutrol F127	375 mg PCL	500 mg	52,5 $\pm$ 12,6
500 Luw	125 mg Luwax EVA 3	375 mg PCL	500 mg	50,0 $\pm$ 8,1
1000 Lut	250 mg Lutrol F127	750 mg PCL	1000 mg	168,5 $\pm$ 6,2
1000 Luw	250 mg Luwax EVA 3	750 mg PCL	1000 mg	271,3 $\pm$ 6,3

### **6.2. Caracterização morfológica e físico-química dos implantes**

#### 6.2.1 Análise dos implantes por SEM

Na figura 19 encontram-se as imagens da membrana *blending* e da membrana EDW, respetivamente. Verifica-se que as fibras uniaxiais do implante *blending* apresentam grânulos superficiais provavelmente devido a acumulações de fármaco não dissolvido. Os solventes desta formulação, clorofórmio e dimetilformamida, apresentam um carácter ligeiramente hidrofóbico o que dificulta a dissolução completa do fármaco neste meio. A possível presença de acumulações de fármaco não dissolvido pode provocar libertações irregulares e pouco constantes de fármaco. Por outro lado, as fibras coaxiais do implante EDW apresentam superfícies lisas e sem irregularidades verificando-se assim que o revestimento das fibras ocorreu com sucesso.

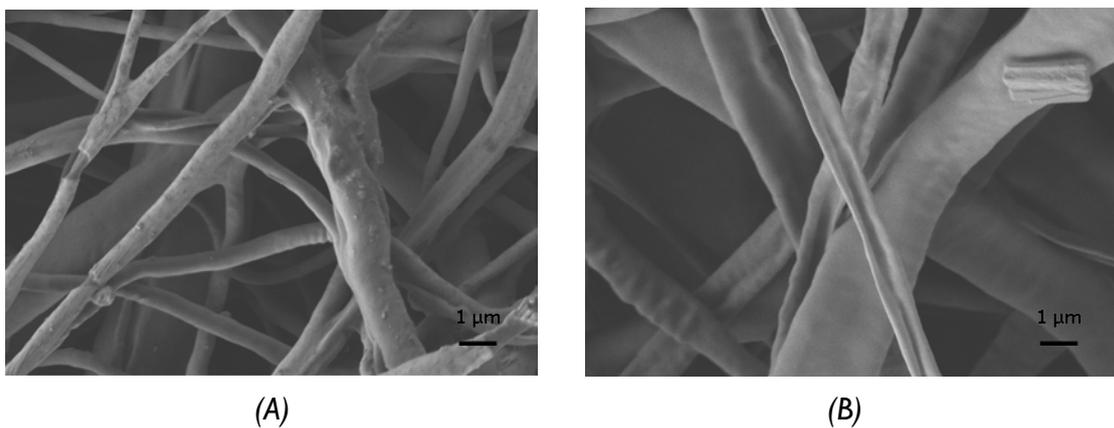
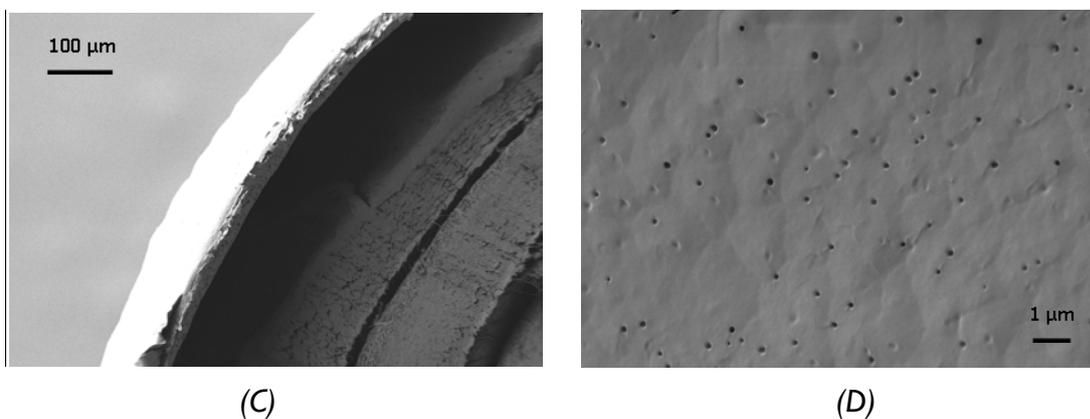
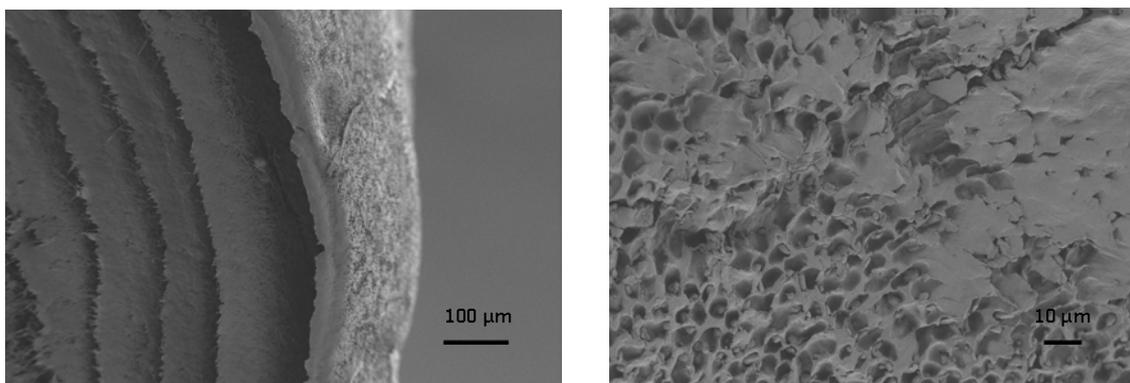


FIGURA 19: IMAGENS OBTIDAS POR SEM. (A) FIBRAS DO IMPLANTE BLENDING, (B) FIBRAS DO IMPLANTE EDW

Na figura 20 encontra-se a secção transversal e a superfície do revestimento do implante MD 500Lut e do implante MD 500Luw, respetivamente. Através da análise da imagem (D) e (F) observa-se que a superfície do revestimento contendo lutrol F127 apresenta menor porosidade relativamente ao revestimento contendo luwax EVA 3, apesar da diferente ampliação. O filme contendo luwax EVA 3 teve de ser aquecido devido à sua baixa solubilidade em THF para se atingir a sua dissolução completa. No processo subsequente de arrefecimento ocorreu uma separação de fases: uma rica em polímero e outra rica em solvente. A extração de solvente por evaporação lenta originou uma estrutura porosa, como se pode observar na imagem (F) da figura 20.

Relativamente à vista da secção transversal dos implantes as imagens (C) e (E) apresentam a mesma morfologia: várias camadas concêntricas, no interior, correspondentes à membrana fibrosa enrolada, e uma camada exterior que corresponde ao revestimento. Quanto à espessura do revestimento não existem diferenças significativas, o que coincide com os resultados obtidos através da medição direta da espessura dos revestimentos apresentados na tabela 4.





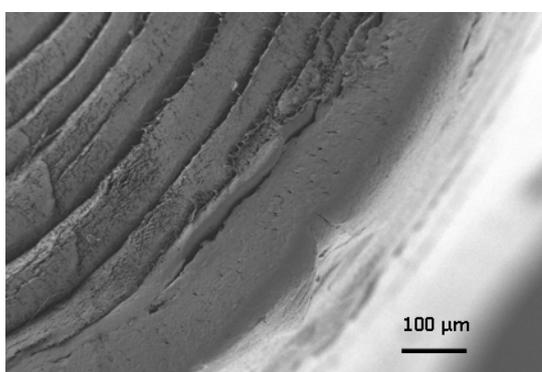
(E)

(F)

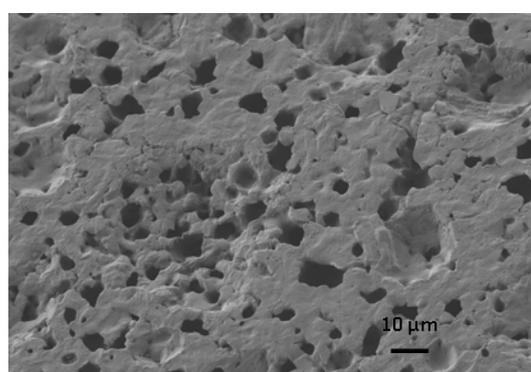
FIGURA 20: IMAGENS OBTIDAS POR SEM. VISTA DA SECÇÃO TRANSVERSAL (C) E SUPERFÍCIE DO REVESTIMENTO (D) DO IMPLANTE MD 500LUT E VISTA DA SECÇÃO TRANSVERSAL (E) E SUPERFÍCIE DO REVESTIMENTO (F) DO IMPLANTE MD 500LUW

Na figura 21 encontra-se a secção transversal e a superfície do revestimento do implante EDW 1000Lut e do implante EDW 1000Luw, respetivamente. Pela observação da imagem (H) e (J) verifica-se que a superfície do revestimento dos implantes apresentam uma rede de poros e canaliculos mais extensa do que nos implantes MD 500Lut e MD 500Luw. No caso do implante EDW 1000Luw a separação de fases aquando da formação do filme de revestimento ocorreu em maior extensão devido ao aumento da massa do polímero originando uma estrutura mais porosa e irregular.

Quanto à vista da secção transversal dos implantes, os resultados são semelhantes aos anteriores: observam-se várias camadas concêntricas, no interior, resultado da membrana enrolada e um revestimento exterior mais espesso, no caso dos implantes EDW 1000Lut e EDW 1000Luw.



(G)



(H)

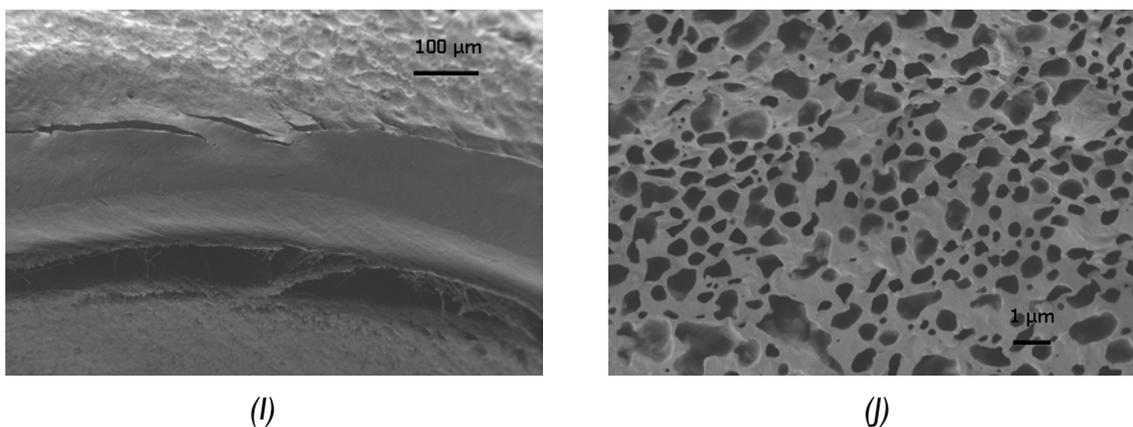


FIGURA 21: IMAGENS OBTIDAS POR SEM. VISTA DA SECÇÃO TRANSVERSAL (G) E SUPERFÍCIE DO REVESTIMENTO (H) DO IMPLANTE EDW 1000LUT E VISTA DA SECÇÃO TRANSVERSAL (I) E SUPERFÍCIE DO REVESTIMENTO (J) DO IMPLANTE EDW 1000LUW

### 6.2.2 Análise dos implantes por FTIR

Os gráficos 1, 2 e 3 mostram os espectros de FTIR de cada implante em comparação com os espectros de cada componente separado.

Pela análise dos gráficos verifica-se que a PCL, o lutrol FI27 e a acetazolamida são constituintes de cada implante o que coincide com o protocolo experimental descrito anteriormente. Os picos mais predominantes e acentuados dos espectros dos implantes correspondem ao espectro da PCL, já que este componente é o que se encontra em maior quantidade nas membranas.

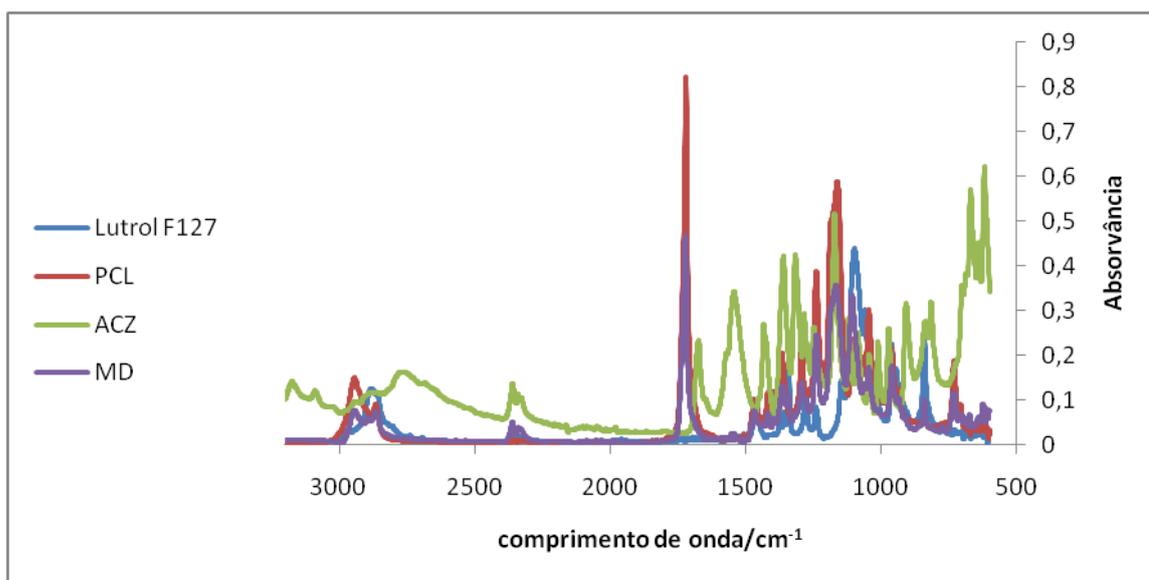


GRÁFICO 1: ESPETROS OBTIDOS PELA TÉCNICA DE FTIR DE IMPLANTES MD EM COMPARAÇÃO COM A PCL, O LUTROL FI27 E A ACETAZOLAMIDA

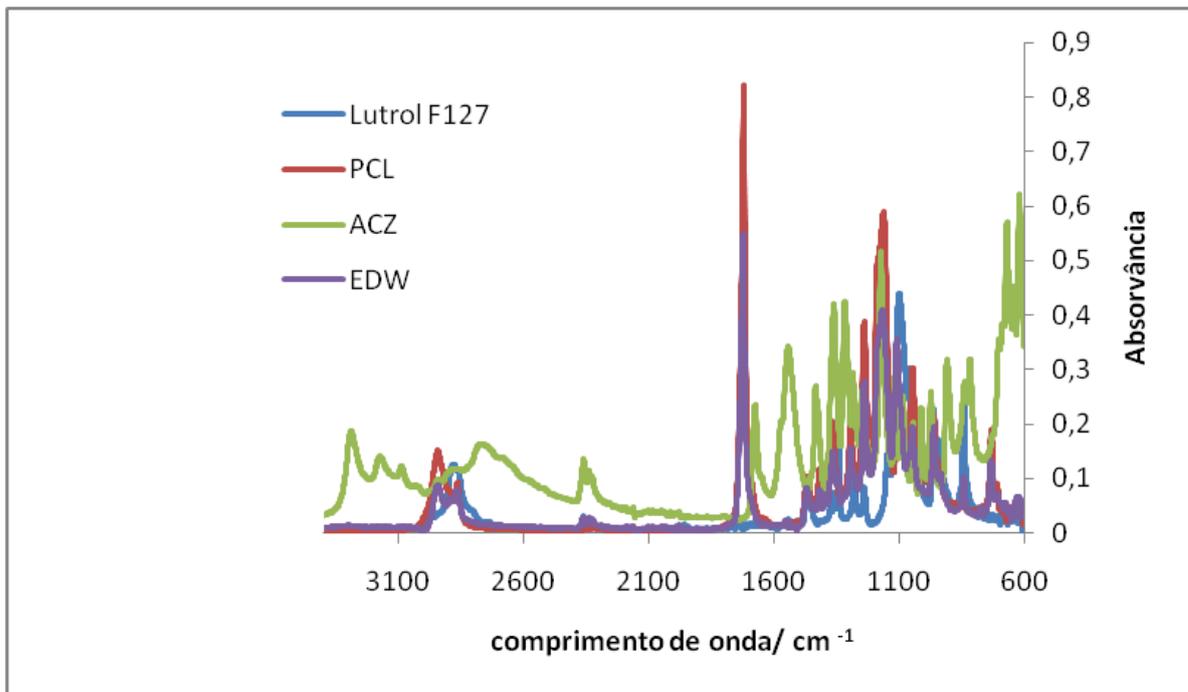


GRÁFICO 2: ESPETROS OBTIDOS PELA TÉCNICA DE FTIR DE IMPLANTES EDW EM COMPARAÇÃO COM A PCL, O LUTROL F127 E A ACETAZOLAMIDA

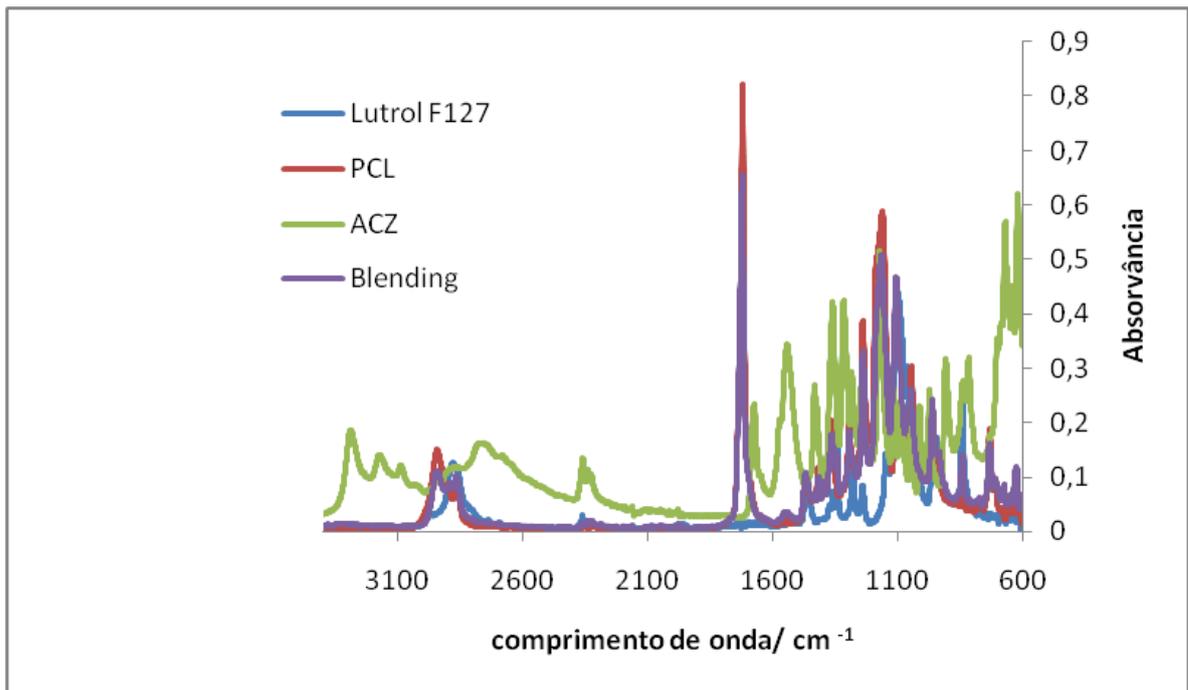


GRÁFICO 3: ESPETROS OBTIDOS PELA TÉCNICA DE FTIR DE IMPLANTES BLENDING EM COMPARAÇÃO COM A PCL, O LUTROL F127 E A ACETAZOLAMIDA

### 6.2.3 Ângulos de Contacto da superfície dos Implantes

Pela análise das tabelas 5 e 6 verifica-se que os ângulos de contacto variam de acordo com as características físico-químicas dos materiais: superfícies hidrofílicas em contacto com

a água provocam o espalhamento da gotícula e originam ângulos de contacto baixos; superfícies hidrofóbicas em contacto com a água sofrem efeito hidrofóbico e diminuem a área da superfície de contacto resultando em ângulos maiores.

Na tabela 5, observa-se, por comparação entre as duas membranas *blending*, o carácter hidrofílico da acetazolamida a provocar a diminuição do ângulo de contacto.

Em relação às fibras coaxiais nota-se um aumento do ângulo de contacto em relação às fibras uniaxiais com fármaco devido à presença do revestimento de PCL que isola o interior hidrofílico das fibras.

Na tabela 6 verifica-se que os dois revestimentos têm diferentes ângulos de contacto devido à hidroflicidade do lutrol F127 e à hidrofovidade do luwax EVA 3, apesar destes constituírem apenas 25% do revestimento.

TABELA 5: ÂNGULOS DE CONTACTO ÁGUA-MEMBRANAS

Membranas			
<i>Blending</i> sem ACZ	<i>Blending</i>	MD sem ACZ	MD
Ângulo /°	Ângulo /°	Ângulo /°	Ângulo /°
58.84±10.60	38.08±12.16	100.35±4.58	50.75±4.45

TABELA 6: ÂNGULOS DE CONTACTO ÁGUA-REVESTIMENTO

Revestimento	
PCL-Lut 75:25	PCL-Luw 75:25
Ângulo/°	Ângulo/°
37.22±4.40	102.60±3.40

#### 6.2.4 Análise térmica simultânea dos implantes

A figura 22 apresenta os termogramas referentes às substâncias puras: acetazolamida, lutrol F127 e PCL e os termogramas referentes às membranas: MD, EDW e *blending*.

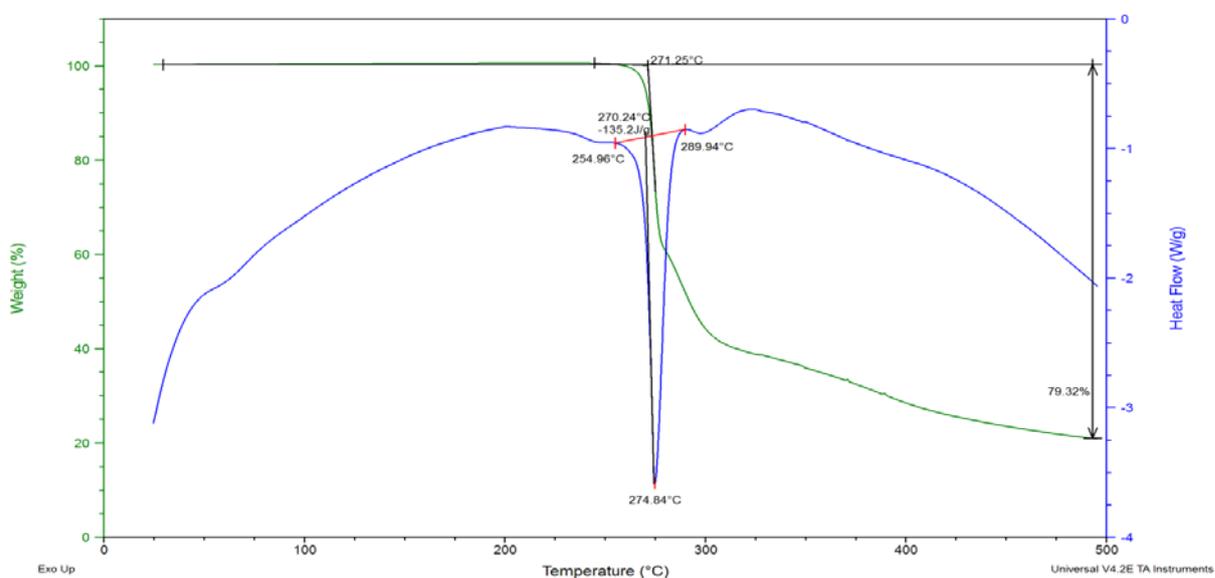
A tabela 7 apresenta a informação retirada de cada termograma de forma reduzida:

TABELA 7: TEMPERATURA DE FUSÃO, DE DEGRADAÇÃO (ONSET) E VARIAÇÃO DA ENTALPIA DE FUSÃO DAS SUBSTÂNCIAS PURAS: ACETAZOLAMIDA, LUTROL F127 E PCL E DAS MEMBRANAS COM AS FORMULAÇÕES EDW, MD E BLENDING

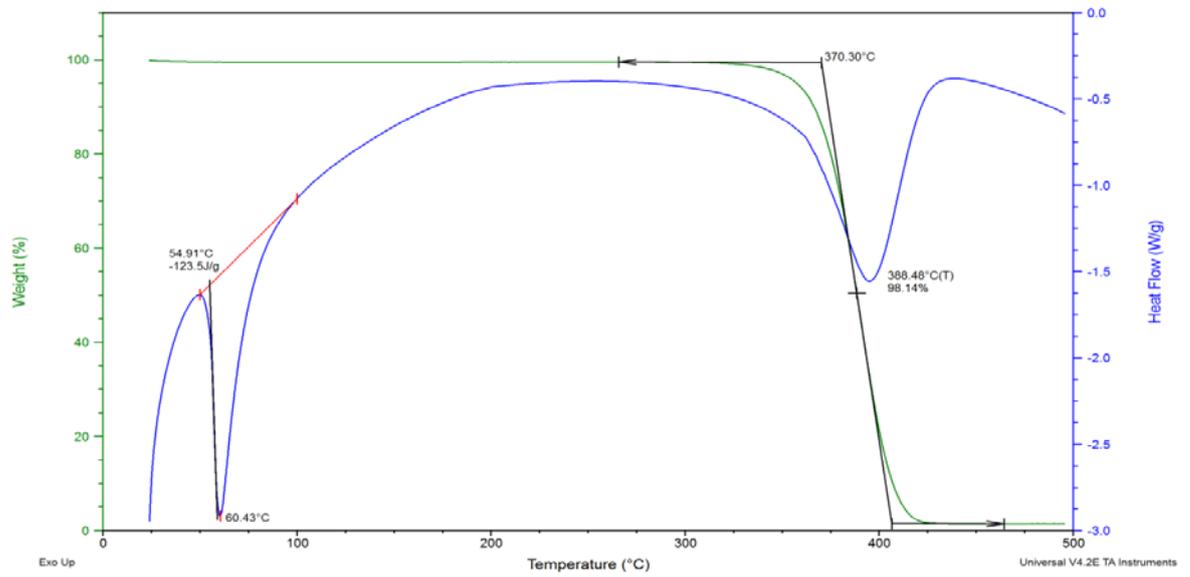
Substância/ Formulação	Temperatura de Fusão (°C)	Variação de entalpia de fusão (J/g)	Temperatura de degradação onset (°C)
Acetazolamida	274,84	-132,20	271,25
Lutrol F127	60,43	-123,50	370,30
PCL	67,47	-67,34	388,27
EDW	61,03	-54,36	379,89
MD	61,85	-57,71	380,03
<i>Blending</i>	61,78	-61,30	382,79

Pela observação da tabela 7, verifica-se que a acetazolamida apresenta uma transição de estado (fusão) a 274,84°C não se verificando a mesma nos termogramas referentes às membranas. Daqui, pode inferir-se que nas formulações MD, EDW e *blending* o fármaco interage fortemente com o polímero lutrol F127 encontrando-se na forma amorfa e/ou a quantidade de fármaco nas fibras (cerca de 5%) é tão baixa que o pico referente à transição em questão é impercetível.

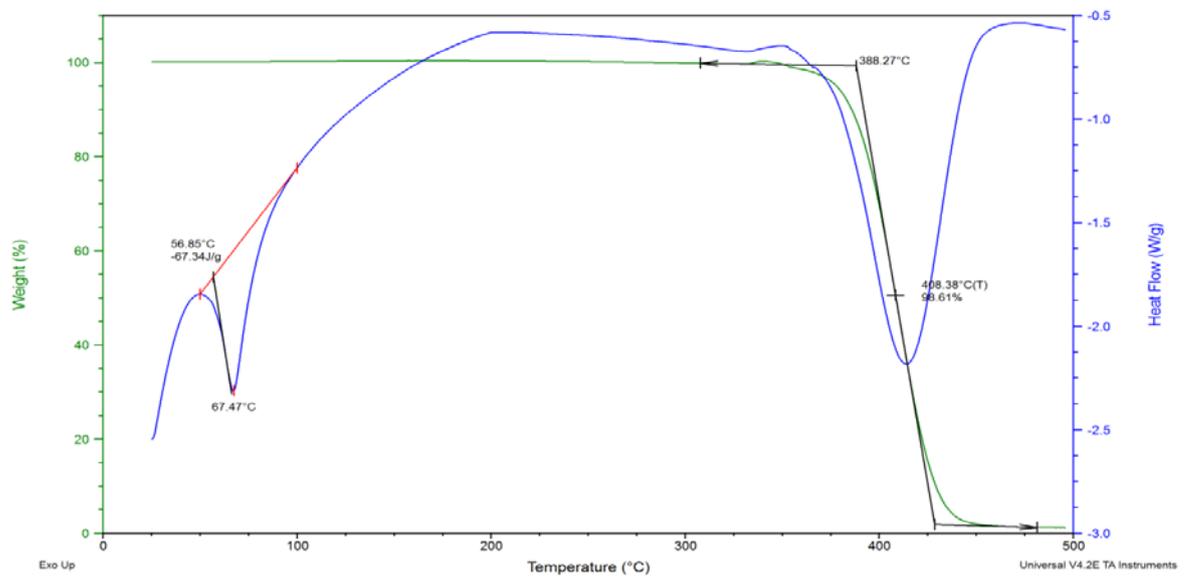
As temperaturas de fusão das membranas apresentam valores intermédios entre a temperatura de fusão do lutrol F127 (60,43°C) e da PCL (67,47°C). O mesmo sucede com as temperaturas de degradação. Estes resultados sugerem que os eventos térmicos das membranas são próximos dos eventos térmicos dos seus dois componentes maioritários (lutrol F127 e PCL).



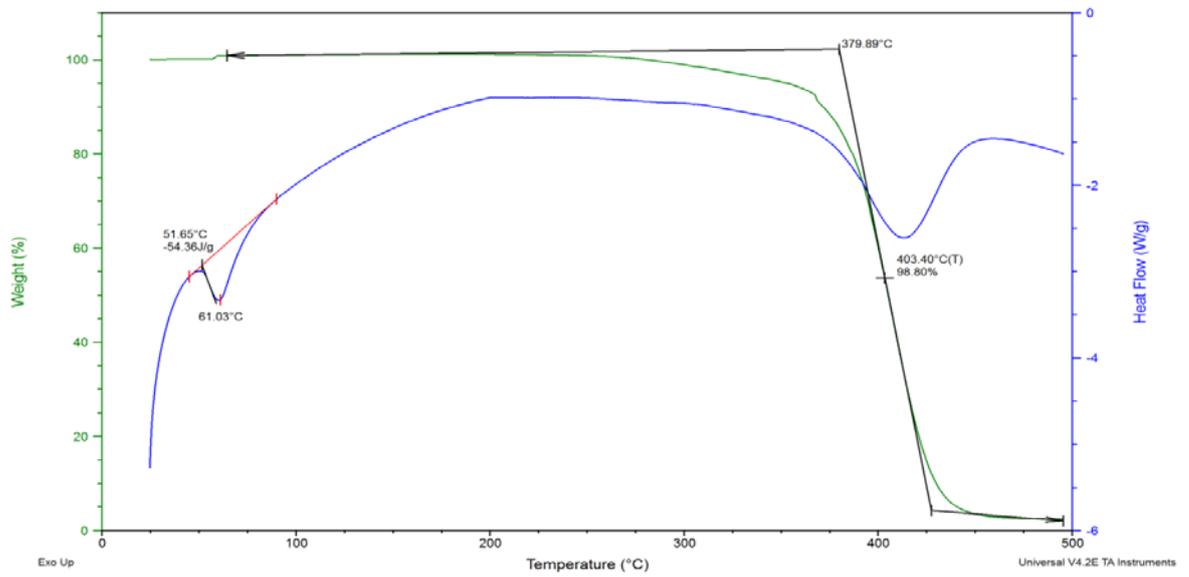
(A) TERMOGRAMA DA ACETAZOLAMIDA



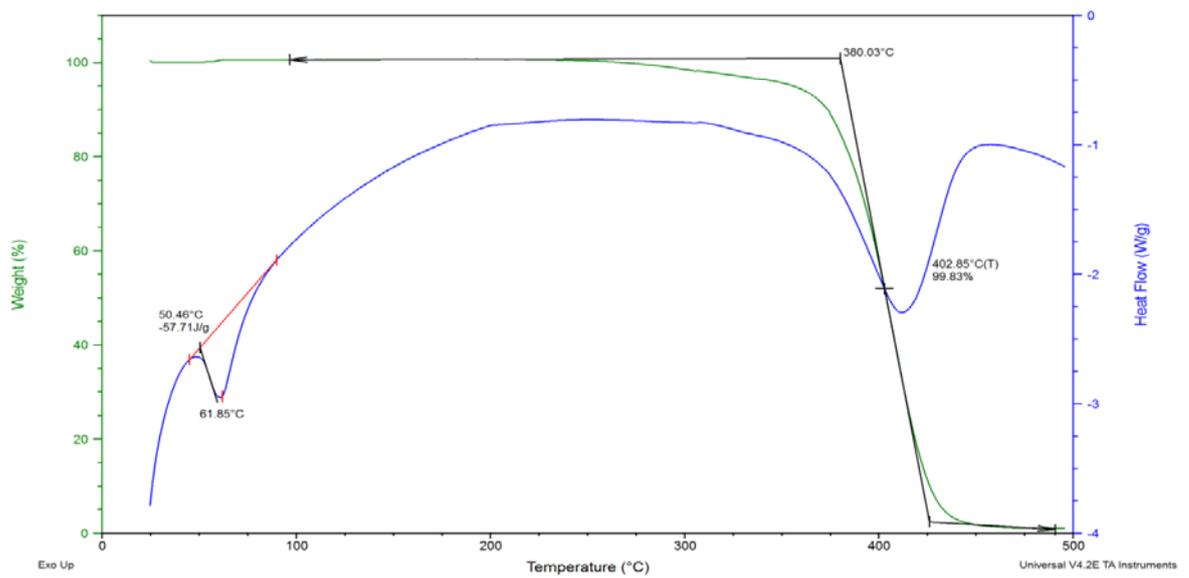
(B) TERMOGRAMA DO LUTROL F127



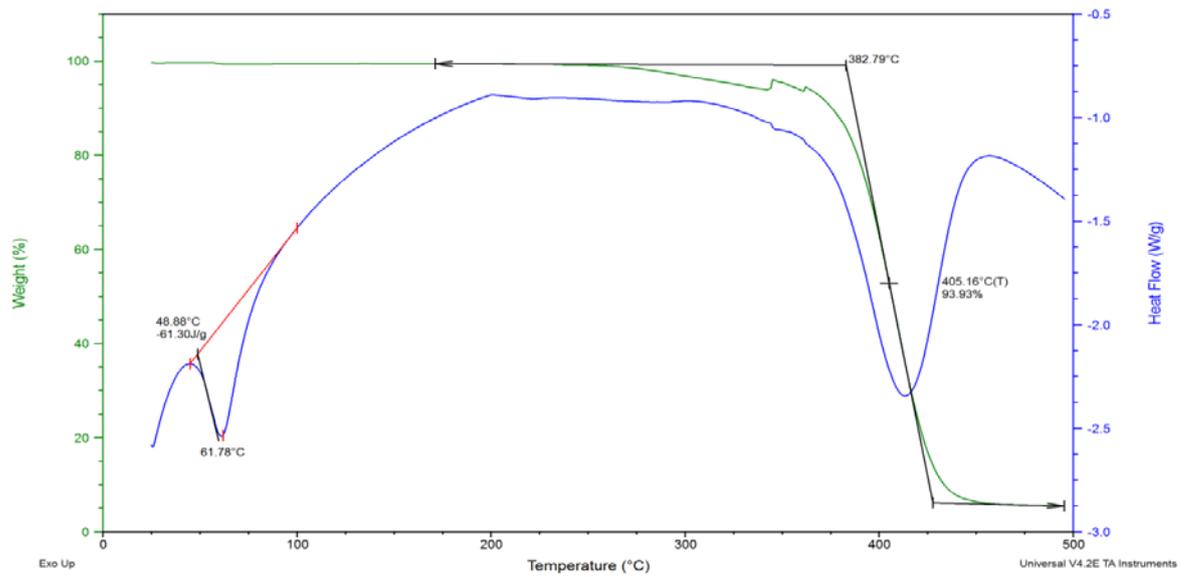
(C) TERMOGRAMA DA PCL



(D) TERMOGRAMA DAS FIBRAS COAXIAIS EDW



(E) TERMOGRAMA DAS FIBRAS COAXIAIS MD



(F) TERMOGRAMA DAS FIBRAS *BLENDING*

FIGURA 22: ANÁLISE TÉRMICA SIMULTÂNEA. (A) ACETAZOLAMIDA, (B) LUTROL F127 (C) PCL (D) FIBRAS COAXIAIS EDW (E) FIBRAS COAXIAIS MD (F) FIBRAS *BLENDING*

### 6.3 Cinética de Libertação *in vitro* dos implantes

#### 6.3.1 Ensaio de libertação dos implantes com e sem revestimento

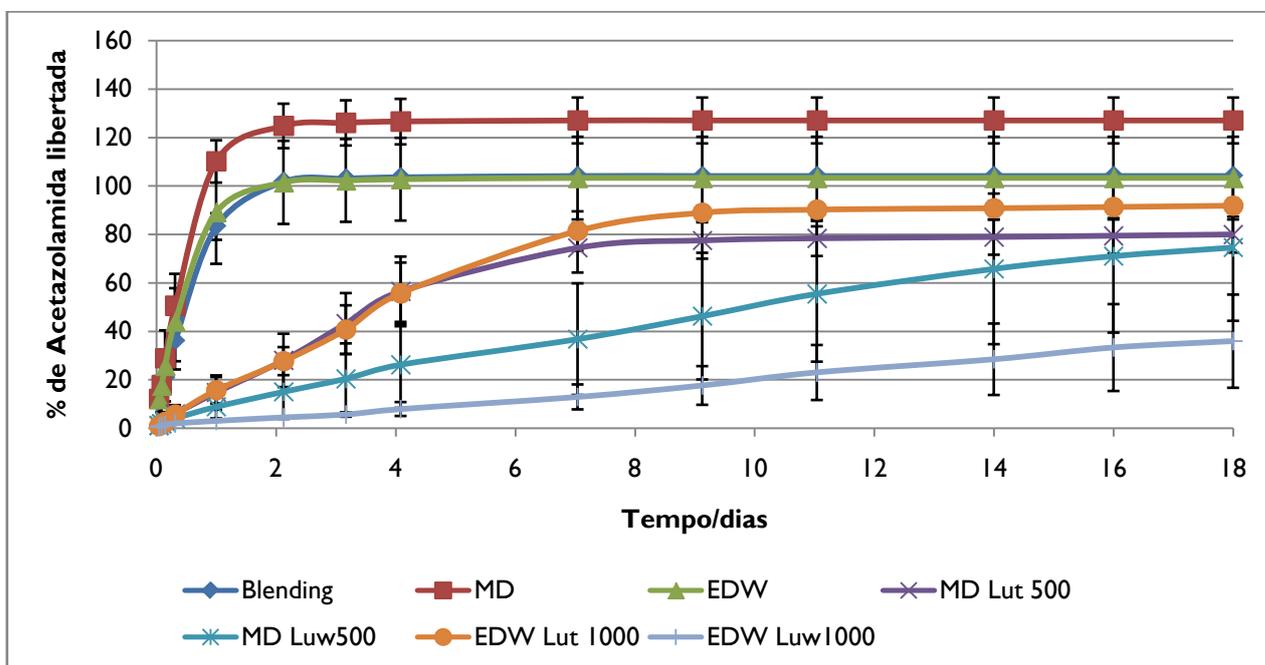


GRÁFICO 4: PERCENTAGEM DE ACETAZOLAMIDA LIBERTADA EM FUNÇÃO DO TEMPO, PARA IMPLANTES COM E SEM REVESTIMENTO

Através da análise do gráfico 4, observa-se que os implantes MD, EDW e *blending* apresentam taxas de libertação muito semelhantes, contrariando estudos anteriores em que se verifica uma clara diferença dos padrões de libertação entre fibras *blending* e coaxiais (11) (15). Conclui-se assim que, nestas condições, o tipo de fibras (*blending* ou coaxiais) não condiciona a libertação de fármaco. Os implantes preparados sem revestimento apresentaram uma taxa de libertação de fármaco muito elevada, isto é, durante as primeiras 48 horas ocorreu a libertação de todo o conteúdo farmacológico dos sistemas.

No que diz respeito aos implantes com revestimento, verifica-se que os implantes com revestimento contendo lutrol F127 apresentam uma taxa de libertação mais rápida que os implantes com revestimento contendo luwax EVA 3. Isto explica-se porque o lutrol F127, sendo hidrofílico, apresenta maior afinidade com o meio salino e a difusão do fármaco a partir da camada de polímero intumescido é mais rápida; no caso do luwax EVA 3, existe menos afinidade com o meio salino e a penetração deste nos poros do polímero e a sucessiva erosão e difusão de fármaco pelos canalículos formados ocorre mais lentamente.

A espessura do revestimento condiciona acentuadamente a cinética de libertação no caso do luwax EVA 3, como é perceptível no gráfico 4, visto que a distância que o fármaco

percorre até sair do implante é maior - “distância difusional” - e, portanto, a difusão do fármaco é retardada. Por outro lado, a espessura do revestimento de lutrol F127 não influencia a taxa de libertação pois, ao sofrer intumescimento, não condiciona de forma drástica a passagem de fármaco para o exterior.

Os implantes revestidos apresentam uma taxa de libertação da acetazolamida claramente mais favorável e, de facto, sugerem uma alternativa viável às nanopartículas utilizadas em estudos anteriores (16-17) cujo conteúdo era libertado em menos de 24 horas.

## 7. CONCLUSÕES

Este projeto de investigação teve como objetivo preparar um implante biodegradável de acetazolamida para o tratamento do glaucoma, uma das patologias que mais comumente afeta o segmento posterior do olho.

Durante este trabalho foram preparados implantes pela técnica de *electrospinning* constituídos por fibras coaxiais que continham acetazolamida no seu interior. Investigou-se o efeito de quatro variáveis:

- o tipo de formulação do interior das fibras;
- a presença/ausência de revestimento;
- o tipo de polímero usado no revestimento;
- a espessura do filme de revestimento;

Foram preparados 7 tipos diferentes de implantes oculares de acetazolamida que foram submetidos a ensaios de libertação durante 18 dias. Através do perfil de libertação de cada tipo de implante e da sua caracterização morfológica e físico-química conclui-se que o/os implantes que exibem um desempenho eficaz na libertação da acetazolamida são os implantes:

- ✓ constituídos por PCL e lutrol F127 dissolvido em etanol, dimetilformamida e água – formulação EDW e revestidos com luwax EVA 3. A presença de água como solvente do lutrol F127 e da acetazolamida provocou uma dissolução do fármaco mais eficaz levando a uma libertação mais uniforme e gradual. Por outro lado, a hidrofobicidade do polímero de revestimento relaciona-se com uma libertação de fármaco por erosão, fenómeno este que retarda a libertação de fármaco.
- ✓ com o revestimento mais espesso. O filme obtido pela dissolução de 1000 mg de luwax EVA 3 em 10 mL de THF conduziu a uma libertação mais lenta, dado que a distância que separa o fármaco do meio salino é maior, motivando um atraso na sua difusão.

## 8. ABORDAGENS FUTURAS

Embora todos os objetivos propostos tenham sido cumpridos existe um longo percurso que separa este trabalho científico da comercialização destes implantes oftalmológicos.

Seria interessante a realização futura de uma análise térmica mais profunda a fim de averiguar a comportamento da acetazolamida no seio do implante. A baixa concentração de fármaco nos implantes deste trabalho não permitiu um estudo claro sobre o comportamento térmico do fármaco no interior do dispositivo.

Relativamente ao método de *electrospinning* é necessário recorrer à sua transposição de escala e automatização de parâmetros. Equipamentos que permitam sistemas de injeção com volumes industriais, coletores com geometria que condicionam o alinhamento das fibras e sistemas de agulhas múltiplas são alguns exemplos de *scale-up* desta técnica (13).

Por outro lado, qualquer dispositivo/sistema farmacológico que seja introduzido no interior do corpo humano deve ser esterilizado e, como tal, a escolha da melhor técnica de esterilização deve ser alvo de pesquisa futura. A autoclave, a esterilização química com óxido de etileno e a radiação gama são algumas técnicas que devem ser estudadas de modo a verificar se provocam alterações morfológicas e funcionais nos implantes.

Após investigações científicas que culminem na obtenção de implantes a partir de técnicas precisas, reprodutíveis, seguras e biocompatíveis deve recorrer-se a ensaios *in vitro* que avaliem a citotoxicidade e, posteriormente, ensaios *in vivo* e clínicos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) HAZIROLAN, D., & PLEYER, U. - Think global-act local: Intravitreal drug delivery systems in chronic noninfectious uveitis. *Ophthalmic Research*. Vol. 49, nº2 (2013), p. 59–65.
- (2) FIALHO, S. L. [et al]. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. Vol. 66, nº6 (2003), p. 891–896.
- (3) CHACALTANA, F. C. [et al] - Anatomia ocular. Universidade Federal de Rio Grande do Sul, 2011, p. 1–17. [Acedido a 23 de Fevereiro de 2016]. Disponível na Internet: [http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/flor\\_humor\\_aquoso\\_vitreo.pdf](http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/flor_humor_aquoso_vitreo.pdf)
- (4) GUIMAR R. Curso de Histologia da Retina. Belo Horizonte: Hospital de Olhos de Minas Gerais, 2003, p. 1-14. [Acedido a 25 de Fevereiro de 2016]. Disponível na Internet: <http://docplayer.com.br/4963453-Retina-curso-de-histologia-da-retina-2003-profa-dra-marcia-reis-guimaraes-hospital-de-olhos-de-minas-gerais-belo-horizonte-mg.html>
- (5) OBSTBAUM S.A. [et al]. Gold standard medical therapy for glaucoma: Defining the criteria identifying measures for an evidence-based analysis. Vol. 26, nº12 (2004), p. 2102-2120.
- (6) FIGUEIREDO, ISABEL A. Estudo comparativo dos perfis de libertação de implantes oftalmológicos de dexametasona obtidos por métodos diferentes, 2013. Tese de dissertação do Mestrado em Tecnologias do Medicamento da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.
- (7) CRUZ, A. A. V., CHAHUD, F., & GUIMARÃES, F. C. Patologia dos anexos oculares. Vol. 30, 1997, p. 36–51.
- (8) KARIMIAN, F. [et al]. Comparison of three phakic intraocular lenses for correction of myopia. *Journal of Ophthalmic and Vision Research*. Vol. 9, nº4 (2014), p.427.
- (9) INSTITUTO DE OFTALMOLOGIA DE CURITIBA. Implante de lentes intraoculares (LIO), 2011, p. 3–5. [Acedido a 27 de Fevereiro de 2016]. Disponível na Internet: <http://www.ioc.med.br/especialidades/implante-de-lentes-intraoculares-lio>

- (10) MARTÍNEZ-PÉREZ, C. [et al]. Scaffolds for tissue engineering via thermally induced phase separation. *Advances in Regenerative Medicine*, 2011, p. 275–294.
- (11) JI, W. [et al]. Fibrous scaffolds loaded with protein prepared by blend or coaxial electrospinning. *Acta Biomaterialia*. Vol 6, nº 11 (2010), p. 4199–4207.
- (12) ARINSTEIN, A, AVRAHAMI, R., & ZUSSMAN, E. Buckling behaviour of electrospun microtubes: a simple theoretical model and experimental observations. *Journal of Physics D: Applied Physics*, Vol. 42, nº1 (2008).
- (13) PERSANO, L., CAMPOSEO, A., TEKMEK, C., & PISIGNANO, D. Industrial upscaling of electrospinning and applications of polymer nanofibers: A review. *Macromolecular Materials and Engineering*. Vol. 298, nº5 (2013), p. 504–520.
- (14) LOPES, C. M., LOBO, J. M. S., & COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. Vol. 41, nº2 (2005), p.143–154.
- (15) TIWARI, S. K. [et al]. Optimizing partition-controlled drug release from electrospun core-shell fibers. *International Journal of Pharmaceutics*. Volume 392, nº1 e 2 (2010), p. 209–217.
- (16) SINGH, J., CHHABRA, G., & PATHAK, K. Development of acetazolamide-loaded, pH-triggered polymeric nanoparticulate in situ gel for sustained ocular delivery: in vitro, ex vivo evaluation and pharmacodynamic study. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. Volume 9045, nº9 (2013), p. 1223–1232.
- (17) VERMA, P. [et al]. Development, in vitro and in vivo characterization of Eudragit RL 100 nanoparticles for improved ocular bioavailability of acetazolamide. *Drug Delivery*. Volume 20, nº7 (2013), p. 269–276.