

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AINA LIZ ALVES CESAR

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE  
*IN VIVO* DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE ATIVO ANTIGLAUCOMATOSO  
A PARTIR DE FILMES DE QUITOSANA E CONDROITINA**

Belo Horizonte - MG

2019

Aina Liz Alves Cesar

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE *IN VIVO* DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE ATIVO ANTIGLAUCOMATOSO A PARTIR DE QUITOSANA E CONDROITINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências de Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. André Augusto Gomes Faraco

Coorientadora: Prof. Dra Giselle Foureaux Heida

Belo Horizonte – MG

2019

Cesar, Aina Liz Alves.

C421d Desenvolvimento, caracterização e avaliação de atividade *in vivo* de sistemas de liberação de ativo antiglaucomatoso a partir de filmes de quitosana e condroitina / Aina Liz Alves Cesar. – 2019.  
114 f. : il.

Orientadora: André Augusto Gomes Faraco.  
Coorientadora: Giselle Foureaux Heida.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Glaucoma – Teses. 2. Enzima conversora da angiotensina – Teses. 3. Polímeros – Teses. 4. Fármacos – Teses. 5. Quitosana – Teses. I. Faraco, André Augusto Gomes. II. Heida, Giselle Foureaux. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 617.741

**Elaborado por Leandro da Conceição Borges – CRB-6/3448**



## ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA AINA LIZ ALVES CESAR

Realizou-se, no dia 12 de dezembro de 2019, às 08:30 horas na sala 3062, da Faculdade de Farmácia - UFMG, a 133ª defesa de tese, intitulada *DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE IN VIVO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE ATIVO ANTIGLAUCOMATOSO A PARTIR DE FILMES DE QUITOSANA E CONDROITINA*, apresentada por AINA LIZ ALVES CESAR, número de registro 2015746123, graduada no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. André Augusto Gomes Faraco - Orientador (UFMG), Profa. Giselle Foureaux Heida - Coorientadora (UFMG), Profa. Denise Carmona Cara Machado (UFMG), Prof. Carlos Eduardo de Matos Jensen (UFSJ), Profa. Ana Luíza Chavez Maia (Unicentro Newton Paiva), Profa. Maria Aparecida Vieira Teixeira Garcia (UFMG).

A Comissão considerou a tese:


Aprovada

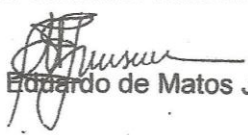
Reprovada

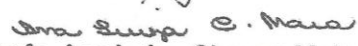
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.  
Belo Horizonte, 12 de dezembro de 2019.

  
Prof. André Augusto Gomes Faraco (Doutor)

  
Profa. Giselle Foureaux Heida (Doutora)

  
Profa. Denise Carmona Cara Machado (Doutora)

  
Prof. Carlos Eduardo de Matos Jensen (Doutor)

  
Profa. Ana Luíza Chavez Maia (Doutora)

  
Profa. Dra. Maria Aparecida Vieira Teixeira Garcia (Doutora)

*Com licença poética*

*Quando nasci um anjo esbelto,  
desses que tocam trombeta, anunciou:  
vai carregar bandeira.*

*Cargo muito pesado pra mulher,  
esta espécie ainda envergonhada.*

*Aceito os subterfúgios que me cabem,  
sem precisar mentir.*

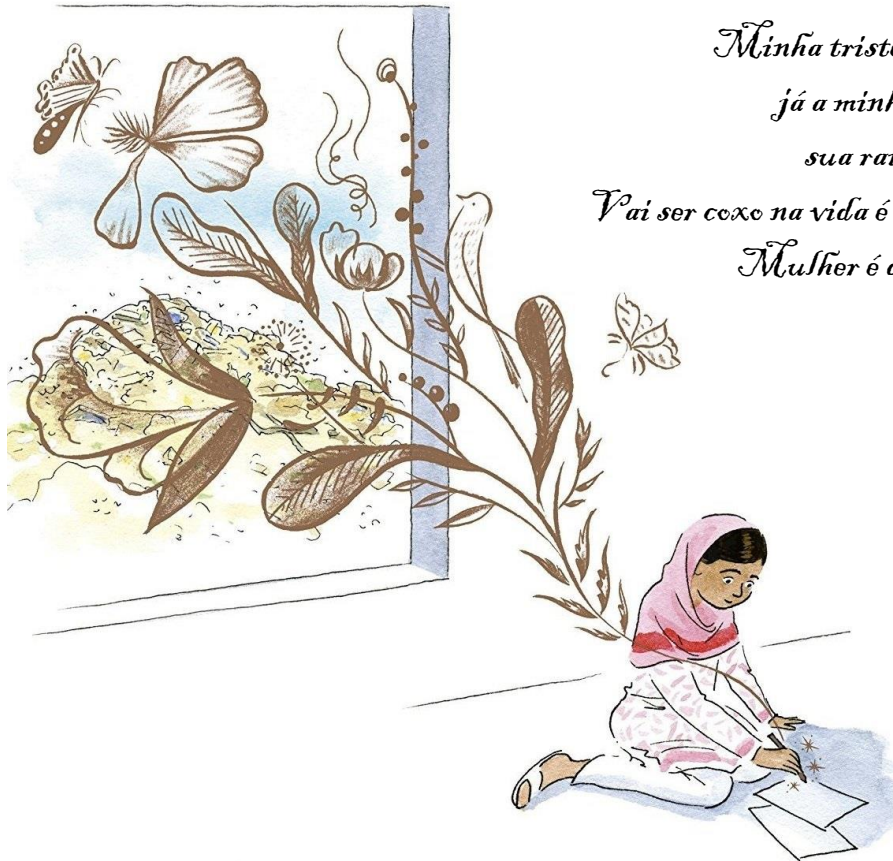
*Não sou tão feia que não possa casar,  
acho o Rio de Janeiro uma beleza e  
era sim, era não, creio em parto sem dor.*

*Mas o que sinto escrevo. Cumpro a sina.  
Inauguro linhagens, fundo reinos  
-- dor não é amargura.*

*Minha tristeza não tem pedigree,  
já a minha vontade de alegria,  
sua raiz vai ao meu mil avô.*

*Vai ser coxo na vida é maldição pra homem.  
Mulher é descobrável. Eu sou.*

*Adélia Prado*



“Um livro, uma caneta, uma criança e um professor podem mudar o mundo”.

Malala Yousafzai

## AGRADECIMENTOS

A Nossa Senhora por caminhar ao meu lado;

À minha família e amigos, pelo apoio, suporte e presença em todos os momentos e que fizeram essa caminhada ser mais leve.

Ao meu orientador Prof. André Faraco pela confiança, pelo conhecimento compartilhado ao longo de tantos anos de trabalho.

À minha coorientadora Profa. Giselle Foureaux, muito obrigada pela oportunidade e confiança no projeto de extensão e por ter sido sempre muito carinhosa e prestativa;

À Ms. Larissa Navarro, colaboradora deste trabalho, pelo auxílio nos experimentos *in vivo*. Às alunas de iniciação científica, Alaíde Silva, Waleska de Sousa pelo auxílio na execução dos experimentos;

Aos professores Gilson Ramaldes (*in memoriam*) e a professora Maria Aparecida Vieira Teixeira Garcia por integrarem a banca de qualificação e darem opiniões e sugestões relevantes que levaram ao aprimoramento deste projeto;

Ao apoio financeiro concedido pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento da Pessoa de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado;

## RESUMO

O glaucoma é a segunda maior causa de cegueira evitável e irreversível no mundo, portanto é uma doença de impacto social. A preservação da visão e a diminuição dos danos provocados à camada de células ganglionares da retina (CGR) e ao disco óptico são os fundamentos de sua terapia, que consiste na aplicação tópica de colírios com a finalidade de reduzir a pressão intraocular (PIO). Não raro, no entanto, é a descontinuidade do tratamento em função do esquema posológico, que envolve múltiplas doses diárias e possui efeitos adversos sistêmicos e/ou locais. Uma alternativa a esses problemas seriam os insertes oftálmicos, que consistem em sistemas de liberação prolongada de fármacos e permitem, por exemplo, o aumento da biodisponibilidade e conseqüente redução da perda do ativo por lacrimejamento e/ou por drenagem via ducto lacrimonasal. O diminazeno (DIZE) é um fármaco utilizado na clínica veterinária como antiprotozoário, mas estudos indicam que ele possui potencial como vasodilatador o que permite seu uso no tratamento de outras enfermidades inclusive o glaucoma. Foi levantada a hipótese de que um dos metabolitos do DIZE, a molécula dihidrocloridrato de 4-aminobenzamidina (4-AD), seria a responsável por essa ação farmacológica observada. Neste estudo, foram utilizados dois polímeros biodegradáveis, biocompatíveis e com potencial mucoadesivo (quitosana – Chs – e sulfato de condroitina - SC) para formular quatro tipos de insertes oftálmicos em diferentes proporções poliméricas. Para realizar o doseamento e ensaios de liberação do 4-AD foi desenvolvido e validado um método analítico. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi o método de escolha e a validação seguiu as normas da RDC nº 166/2017 da ANVISA e do guia ICH. Observou-se que dentro dos limites estabelecidos (5-25 µg/mL) o método foi linear, seletivo, preciso, exato e robusto. Os insertes foram preparados pelo método de evaporação de solvente e caracterizados com relação ao potencial de hidratação e à força de aderência, a formulação com resultado mais satisfatório continha Chs e SC na proporção 50:50% (m/m). Esse inserte não apresentou fragilidade diante do entumescimento e demonstrou possuir a maior força de mucoadesão dentre as formulações testadas, conforme estudo realizado de acordo com o método de Hassan e Gallo. Em seguida foi realizada a caracterização físico-química através da análise térmica, espectroscopia no infravermelho e microscopia eletrônica de varredura, em conjunto, essas técnicas sugeriram que o ativo encontrava-se

disperso homogeneamente na matriz polimérica. O teste *in vivo* demonstrou que o inserte manteve a pressão intraocular reduzida por no mínimo três semanas, além de evitar a morte das células da camada ganglionar da retina quando analisado o grupo tratado em relação ao grupo controle, que recebeu inserte o placebo. Portanto, o dispositivo formulado é viável e o ativo demonstrou eficácia na terapia do glaucoma. Em conjunto, isso conferiu caráter inovador ao trabalho, pois o dispositivo descrito poderá ser uma estratégia terapêutica mais cômoda e eficaz no tratamento do glaucoma.

**Palavras-chave:** Glaucoma, Inserte ocular, Enzima Conversora de Angiotensina 2, Polímeros, Liberação de Fármacos, CLAE.



## ABSTRACT

Glaucoma is the second leading cause of preventable and irreversible blindness in the world, so it is a social impact disease. The preservation of vision and the reduction of damage on the retinal ganglion cell (RGC) and to optic disc are the fundamentals of its therapy, which consists in the topical application of eye drops in order to reduce intraocular pressure (IOP). It is not uncommon, however, the discontinuation of treatment due to the dosing schedule, which involves multiple daily doses and has systemic and/or local adverse effects. An alternative to these problems could be the ophthalmic inserts, a prolonged drug release dispositive that allow, for example, an increase in bioavailability and a consequent reduction on the loss of the asset by tearing and/or by drainage via the lacrimonasal duct. Diminazene (DIZE) is an antiprotozoan drug, but some studies indicates that it has potential as a vasodilator which allows the use in the treatment of other diseases including glaucoma. The hypothesis was raised that one of the metabolites of DIZE, 4-aminobenzamidine dihydrochloride (4-AD), would be responsible for this observed pharmacological action. In this study, two polymers with biodegradable, biocompatible and mucoadhesive characteristics (chitosan - Chs - and chondroitin sulfate - SC) were used to formulate four types of ophthalmic inserts in different polymeric proportions. An analytical method was developed and validated to perform 4-AD assay and release tests. High performance liquid chromatography (HPLC) was the method of choice and validation followed the rules of RDC n° 166/2017 of ANVISA and the ICH guide. It was observed that within the established limits (5-25 µg/mL) the method was linear, selective, precise, accurate and robust. The inserts were prepared by the solvent evaporation method and characterized in relation to the hydration potential and the adhesion force, the formulation with the most satisfactory result contained Chs and SC in the proportion 50: 50% (m/m). This insert did not present fragility in the face of swelling and demonstrated to have the greatest mucoadhesion strength among the tested formulations, according to a study carried out according to the method of Hassan and Gallo. Then, the physical-chemical characterization was performed through thermal analysis, infrared spectroscopy and scanning electron microscopy, together, these techniques suggested that the asset was dispersed homogeneously in the polymer matrix. The in vivo test demonstrated

that the insert kept the intraocular pressure reduced for at least three weeks, in addition to preventing the death of the RSG when the treated group was analyzed in relation to the control group, which received the placebo insert. Therefore, the formulated device is viable and the active has demonstrated efficacy in glaucoma therapy. Together, this gave the work an innovative character, since the device described could be a more comfortable and effective therapeutic strategy in the treatment of glaucoma.

**Key words:** Glaucoma, Ocular insert, Angiotensin-Converting Enzyme 2, Polymer, Drug Delivery, HPLC.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Anatomia do olho humano e sua divisão nos segmentos anterior e posterior.....	19
Figura 2: Elementos da câmara anterior do olho e representação das vias de drenagem uveoescleral e convencional do humor aquoso em um olho humano saudável.....	20
Figura 3: Estrutura da retina.....	21
Figura 4: Representação esquemática da diminuição do fluxo de drenagem e acúmulo do humor aquoso no glaucoma primário de ângulo aberto (esquerda) e a obstrução da passagem do humor aquoso através da íris no glaucoma primário de ângulo fechado (direita).....	22
Figura 5: Esquema da cirurgia de trabeculectomia. ....	25
Figura 6: Novos dispositivos de liberação prolongada para o tratamento do glaucoma .....	27
Figura 7: Representação esquemática da regulação do sistema renina-angiotensina (ACE 2) que ocorre no olho através do receptor MAS .....	28
Figura 8: Estrutura molecular da substância dihidrocloridrato de 4-aminobenzamidina .....	29
Figura 9: Estágios do processo de mucoadesão.....	31
Figura 10: Estrutura molecular da quitosana.....	33
Figura 11: Estrutura molecular do sulfato de condroitina. ....	34
Figura 12: Esquema dos estudos realizados com os insertes oftálmicos no Manuscrito II.....	87
Figura 13: Inserte de quitosana para liberação prolongada de bimatoprost colocado no fórnice conjuntival superior do olho direito .....	87

Figura 14: Esquema dos experimentos realizados no Manuscrito II .....	89
Figura 15: Análise por MEV do ativo 4-AD .....	91
Figura 16: MEV para os filmes obtidos em estudo. Em que: (a) fratura do inserte 50:50 contendo ativo e (b) sua superfície; (c) fratura do inserte 50:50 placebo e (d) sua superfície. ....	92
Figura 17: Análises de DTA,e TG para (a) insertes placebo (b) inserte Ativo. ....	93
Figura 18: Representação esquemática do modelo experimental de indução de glaucoma e grupos de tratamento e controle utilizados. ....	97
Figura 19: Análise histológica de células ganglionares da retina. ....	98

## **MANUSCRITO I**

Figure 1: Chemical representation for the structure of 4-AD .....	53
Figure 2: Chromatogram obtained for active substance 4-AD through the developed method .....	53
Figure 3: Chromatograms indicating that CS (1), ChS (2); Lissamine (3) do not come out in the same retention time as the active 4-AD (a). ....	53
Figure 4: Residue analysis demonstrating the normal distribution with homoscedasticity.....	54

## **MANUSCRITO II**

Figure 1: Swelling index. Black line represents the inserts with 4-AD and grey line represents placebo inserts: (a) insert 30:70, (b) insert 50:50, (c) insert 75:25 and (d) Chitosan insert. Values expressed as mean (n=3). ....	66
Figure 2: DSC analysis for the first (a) and second run (c) for 4-AD insert and first (b) and second run (d) for the placebo .....	69

Figure 3: FTIR-ATR spectra of inserts. On the left: (a) Placebo insert; (b) Insert with the active molecule 4-AD. On the right side: the spectra of the polymers (c) Chondroitin sulphate and (d) Chitosan. And below (e) the 4-AD spectra with the 840  $\text{cm}^{-1}$  band with a star indicating. .... 69

Figure 4: In vitro release of the insert 50:50 Chs:CS %. Values expressed as mean  $\pm$  SD, n=4. .... 70

Figure 5: Effects of 4-AD 50:50 inserts in the intraocular pressure (IOP, n=7 per group). It is possible to observe that 4-AD was able to reduce the IOP in glaucoma (GLA) group and placebo group (One-way ANOVA followed by the Bonferroni post test,  $p < 0.05$ ). Where (#) indicates a significant difference of the control group (CTRL) versus the treated group (GLA+Treatment) and the placebo insert (GLA+Placebo) group. And (\*) express the difference of the (GLA+Placebo) versus (CTRL) group and (GLA+Treatment) group. .... 71

Figure 6: : Quantification of the RGC in the retinas of rats (n=7) and \*P < 0.001 versus control eyes (One-way ANOVA followed by the Bonferroni post test). Where (#) indicates a significant difference of the treated group with the placebo insert in relation to the control group and the group treated with the active..... 72

Figure 7: Histological analysis of optic nerve excavation. In the figures in the top row, it is possible to observe the decrease in the RGC in the placebo group, while the number is similar in the treated and control group. In the photos in the figure below, the optical disks are represented, with the excavation marked by an arrow..... 72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Medicamentos utilizados no tratamento do GPAA .....	26
Tabela 2: Teorias gerais do processo de mucoadesão .....	322

## MANUSCRITO I

Table 1: Values for Intra-day and inter-day precision for the developed method.....	55
Table 2: Concentrations obtained from the analyses were performed by varying the chromatographic parameters by 10%.....	55

## MANUSCRITO II

Table 1: Calculated mucoadhesion force $F$ ( $n = 3$ ). Where $\eta_t$ is the viscosity of the solution containing mucin and gel, $\eta_{tm}$ the viscosity of the solution containing only mucin, $\eta_f$ the viscosity of the solution containing only the formulation and $\eta_{ma}$ the viscosity of formulation in cP.....	67.
---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

4-AD	Hidrocloridrato de 4-aminobenzamidina
AH	Ácido hialurônico
Ang(1-7)	Angiotensina(1-7)
FTIR-ATR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier e refletância total atenuada
CGR	Células da camada ganglionar da retina
ChS	Quitosana
DPR	Desvio padrão relativo
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
HAQ	Humor Aquoso
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
SC	Sulfato de Condroitina
SRA	Sistema renina-angiotensina
PIO	Pressão intraocular
GPAA	Glaucoma primário de ângulo aberto
GPAF	Glaucoma primário de ângulo fechado
DIZE	Diminazeno
IA	Insertes contendo ativo
IP	Insertes placebo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
2.1	GLAUCOMA.....	22
2.1.1	<i>Diagnóstico.....</i>	<i>23</i>
2.1.2	<i>Epidemiologia.....</i>	<i>24</i>
2.1.3	<i>Tratamento.....</i>	<i>24</i>
2.1.3.1	Ativação da enzima conversora de angiotensina-2.....	27
2.2	FARMACOCINÉTICA OCULAR .....	29
2.2.1	<i>Sistemas de liberação ocular de fármacos.....</i>	<i>30</i>
2.2.2	<i>Sistemas mucoadesivos.....</i>	<i>31</i>
2.2.2.1	Quitosana.....	33
2.2.2.2	Sulfato de Condroitina.....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
	<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>85</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>86</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>ANEXO A – PROTOCOLO CETEA.....</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>ANEXO B – PATENTE SOLICITADA .....</b>	<b>111</b>



## 1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

O glaucoma é uma neuropatia óptica que promove a perda progressiva da visão periférica, podendo levar à cegueira quando não tratada corretamente (SHARIF, 2017). Essa doença afeta aproximadamente de 70 milhões de pessoas, e tende a aumentar para cerca de 100 milhões de indivíduos, até 2040 (THAM *et al.*, 2014; WEINREB *et al.*, 2014; JONAS *et al.*, 2017). O glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) é o tipo de manifestação mais comum, dentre seus fatores de risco estão: idade, etnia (principalmente indivíduos africanos ou asiáticos e seus descendentes), miopia, fatores genéticos, diabetes, disfunções vasculares e principalmente a pressão intraocular (PIO) aumentada. Esse último fator é o único clinicamente controlável, sendo o alvo de diversas formas terapêuticas (MCMONNIES, 2017; SHARIF, 2017).

A terapia do GPAA é realizada, principalmente, através da administração de colírios com o objetivo de reduzir a PIO. Apesar de suas vantagens, como administração local não invasiva, conforto em relação a outras formas farmacêuticas (géis e pomadas oftálmicas), a terapia não possui a adesão esperada devido à necessidade do uso crônico, efeitos adversos sistêmicos e/ou toxicidade local (KAUR *et al.*, 2002; HENDERER *et al.*, 2012). Uma solução para aumentar a adesão seria a administração de dispositivos de liberação prolongada, como insertes oftálmicos.

Os insertes oftálmicos são formulações sólidas, administradas no saco conjuntival ocular, que liberam o fármaco por um tempo prolongado, promovendo, desta forma, maior biodisponibilidade (GHATE *et al.*, 2008). Além disso, eles são clinicamente mais aceitos por reduzirem os efeitos adversos e o desconforto da instilação diária (HORNOF *et al.*, 2003; KARKI *et al.*, 2016).

França e colaboradores (2014) e Foureaux e colaboradores (2015) desenvolveram insertes de quitosana veiculando bimatoprost e com dorzolamida e demonstraram seu potencial na terapia do GPAA. A quitosana é um polímero natural derivado da acetilação da quitina, ela é biocompatível, atóxica e biodegradável. Estas características são compartilhadas por outro polímero natural, o sulfato de condroitina (YUAN *et al.*, 2008).

Ambos são polissacarídeos capazes de interagir com a mucina, principal componente da camada mucosa ocular, essa interação permite o aumento do período de residência pré-corneal promovendo um aumento na biodisponibilidade do fármaco (LUDWIG, 2005). Concomitantemente, uma molécula descrita como reagente químico está sendo estudada por nosso grupo - Núcleo de Estudos Pesquisa e Desenvolvimento em Ciências Farmacêuticas (NEPDCFAR) - e revelou ação vasodilatadora, sugerindo que poderia atuar como agente anti-hipertensivo e também antiglaucomatoso, por meio da redução da PIO (FARACO *et al.*, 2018).

Neste trabalho foram desenvolvidas quatro formulações de insertes compostos por quitosana e sulfato de condroitina (em diferentes proporções) carreando como ativo uma benzamidina para-substituída. Os dispositivos foram caracterizados por resistência à hidratação, força de aderência, análise térmica, espectroscopia no infravermelho, e perfil de dissolução. Em seguida foram realizados estudos *in vivo* a fim de avaliar a atividade terapêutica do composto ativo. O caráter inovador é conferido ao trabalho se deve à descrição da nova atividade terapêutica para uma molécula existente.

No Manuscrito I é relatado o desenvolvimento e a validação de um método analítico capaz que quantificar o ativo veiculado nos insertes poliméricos.

No Manuscrito II é relatado o desenvolvimento dos insertes poliméricos de quitosana e sulfato de condroitina e, a partir da caracterização físico-química, a seleção da formulação com maior potencial para a continuidade dos estudos. Nesta formulação, foram realizadas caracterizações físico-químicas e morfológicas adicionais além do estudo de liberação controlada da benzamidina testada, com a finalidade de testar sua atividade *in vivo*.

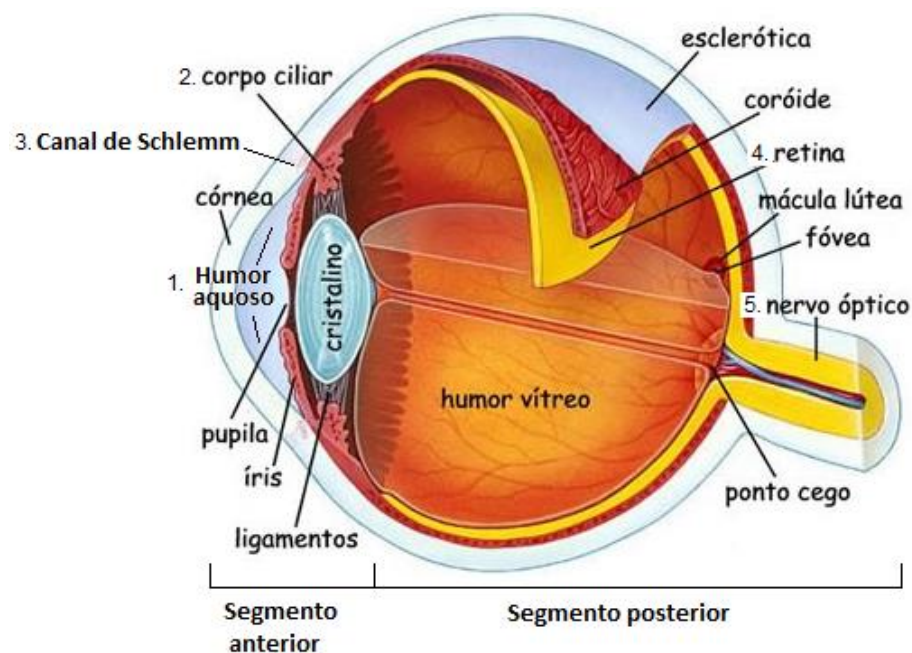
# **PARTE I**

REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVOS

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O globo ocular é dividido no segmento anterior e posterior. O segmento anterior é formado pela córnea, íris, cristalino, corpo ciliar, canal de Schlemm e é preenchido pelo humor aquoso (HAQ), conforme pode ser observado na Figura 1 (BRASILEIRO FILHO, 2016). O HAQ é produzido pelos processos ciliares e flui da câmara posterior para a câmara anterior através da íris (Figura 2). Ele é responsável pela nutrição das células do cristalino e da córnea, além disso, ele atua na remoção de metabólitos, células mortas e outros resíduos tóxicos presentes nesse segmento ocular. Por fim, o HAQ é drenado principalmente através da malha trabecular atingindo a circulação venosa (SHARIF, 2017). Outra forma de drenagem do HAQ é a uveoescleral ela é menos comum e corresponde aos 10% restante da drenagem (HENDERER *et al.*, 2012; SHARIF, 2017).

**Figura 1: Anatomia do olho humano e sua divisão nos segmentos anterior e posterior.**

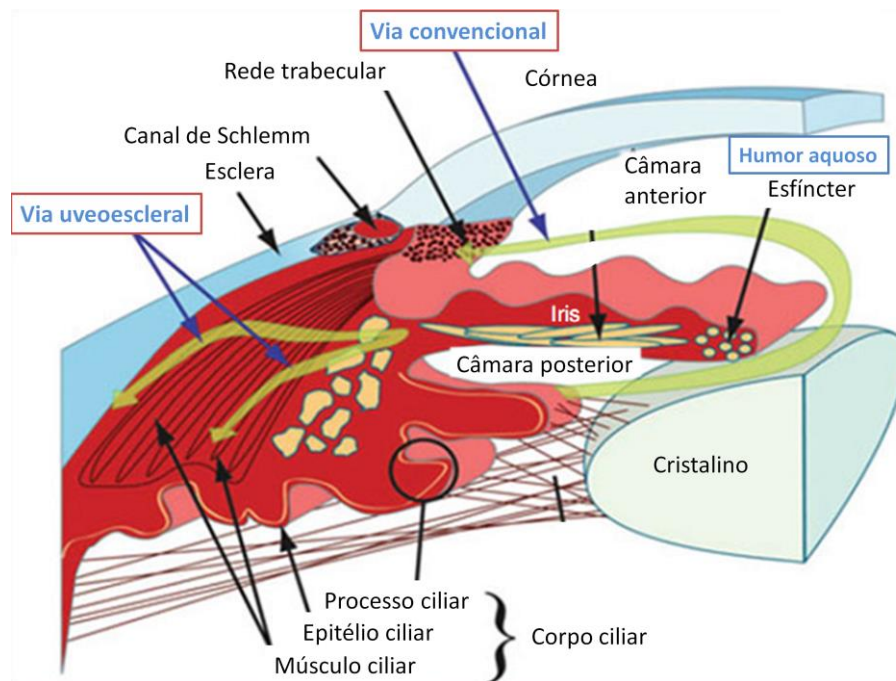


**Figura adaptada de Google Imagens.**

O segmento posterior do globo ocular é preenchido pelo humor vítreo, suas estruturas constituintes de destaque são a retina e o nervo óptico. A retina tem a função de transformar os estímulos luminosos em estímulo nervoso, enviando-o para o sistema nervoso central através do nervo óptico, sendo, portanto a estrutura responsável pela captação de imagens. Esse tecido ocular é constituído por diversas

camadas celulares, sendo a camada das células ganglionares, além disso, os axônios dessas células ganglionares se unem na região posterior do olho para formar o nervo óptico, portanto, se essa porção for danificada, a comunicação que envolve a visão ficará prejudicada (BRASILEIRO FILHO, 2016; HENDERER e RAPUANO, 2012).

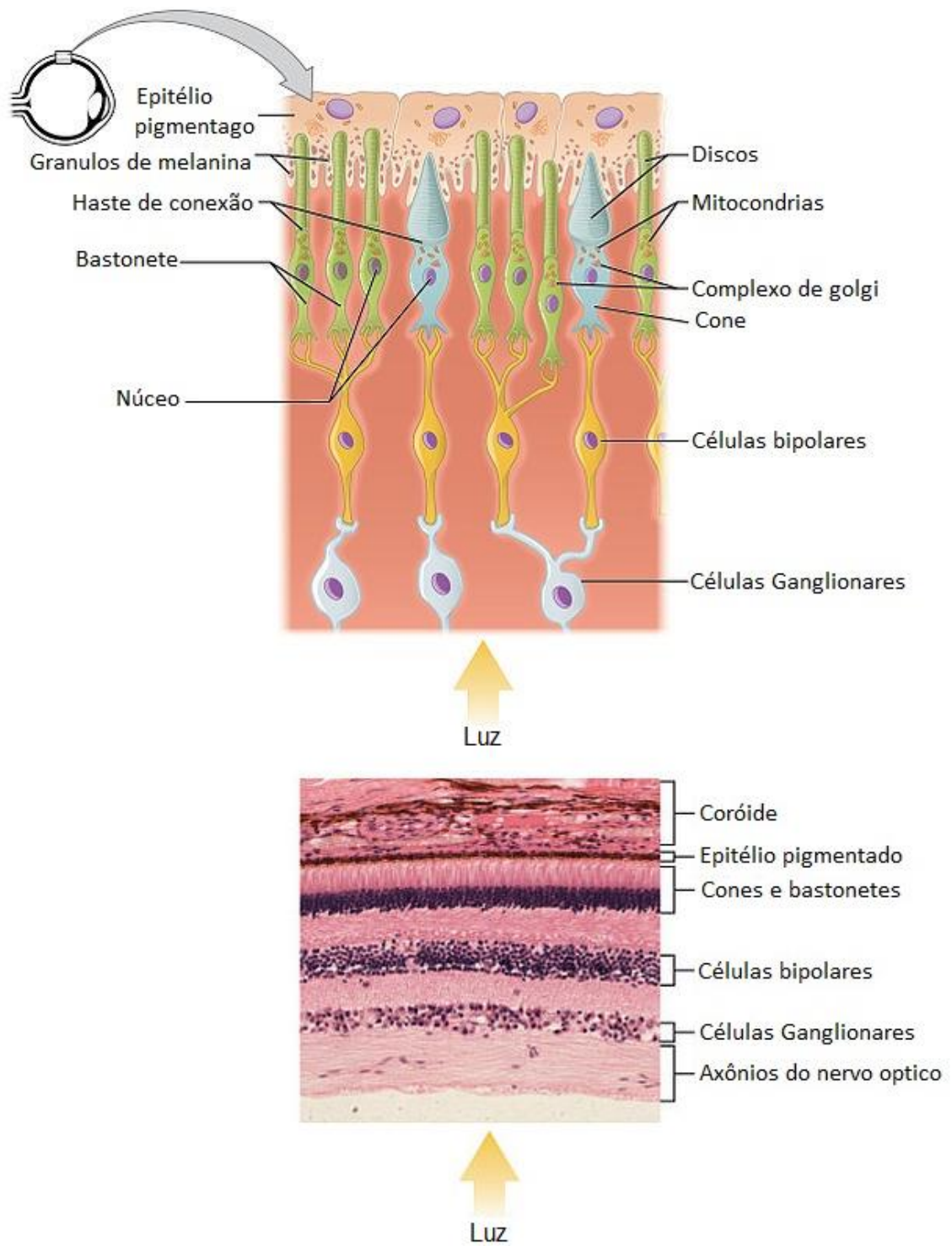
**Figura 2: Elementos da câmara anterior do olho e representação das vias de drenagem uveoescleral e convencional do humor aquoso em um olho humano saudável.**



**Fonte: Adaptado de SHARIF, 2017.**

Além das ganglionares, a retina é histologicamente constituída por fotorreceptores (cones e bastonetes), células horizontais, células bipolares, células amácrinas, células gliais (células de Muller) e por células epiteliais pigmentadas (Figura 3).

**Figura 3: Estrutura da retina**



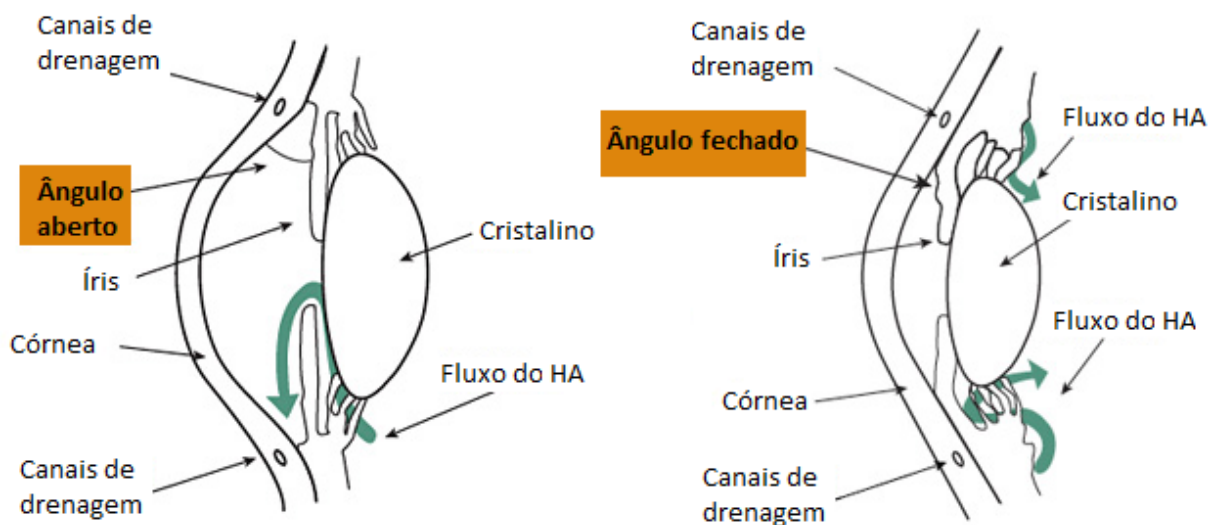
Fonte: Adaptado de ER services (2019)

## 2.1 Glaucoma

O glaucoma é um exemplo de doença capaz levar à cegueira irreversível quando não tratado. Trata-se de um conjunto de doenças caracterizadas pela perda das células da camada ganglionar da retina, afinamento da camada de fibras nervosas e escavação do disco óptico (SHARIF, 2017). De acordo com a morfologia da câmara anterior do olho, o glaucoma pode ser dividido em primário de ângulo fechado (GPAF) e glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) (KUMAR *et al.*, 2014; WEINREB *et al.*, 2016). Esses dois tipos principais de glaucoma são diferenciados de acordo com o mecanismo de aumento da PIO, que depende da via anatômica de drenagem do HAQ (Figura 4).

No GPAF a via de drenagem encontra-se bloqueada fisicamente pela íris. Ao passo que no GPAA a rede de drenagem trabecular está fisicamente acessível, no entanto, o fluxo de passagem do HAQ é menor do que sua taxa de produção (WEINREB *et al.*, 2016). Portanto, o equilíbrio resultante entre a drenagem e a produção do HAQ é capaz de controlar a pressão intraocular (PIO), o que poderia evitar o aparecimento do glaucoma (HENDERER *et al.*, 2012; SHARIF, 2017).

**Figura 4: Representação esquemática da diminuição do fluxo de drenagem e acúmulo do humor aquoso no glaucoma primário de ângulo aberto (esquerda) e a obstrução da passagem do humor aquoso através da íris no glaucoma primário de ângulo fechado (direita).**



Fonte: Adaptado de GLAUCOMA RESEARCH FOUNDATION, 2017.

É consenso que a PIO elevada é o maior fator de risco para o GPAA, sendo proposto que, primeiramente, ocorre um dano devido à força mecânica sobre a retina. Em um segundo momento, ocorre o desencadeamento do estresse oxidativo nas células da camada ganglionar da retina (CGR) levando à morte celular. Por fim, o aumento da pressão dificulta o suprimento sanguíneo celular (WÓJCIK-GRYCIUK *et al.*, 2016).

O GPAA pode ser uni ou bilateral e quando não tratado pode progredir acarretando a diminuição da acuidade visual (visão em túnel) com possibilidade de levar à cegueira total num período de 3 a 15 anos. Uma vez que a perda da visão ocorre de maneira lenta e indolor o paciente geralmente só percebe o dano visual, quando o glaucoma já está em estagio avançado (NATIONAL EYE INSTITUTE, 2015).

Além da PIO elevada, os outros fatores de risco para o surgimento do GPAA são o aumento da idade, etnia (principalmente pessoas com raízes africanas ou asiáticas), miopia, fatores genéticos e diabetes (MCMONNIES, 2017; SHARIF, 2017). Existem, também, outros tipos menos comuns de glaucoma como o secundário a doenças oculares (tais como inflamações, traumatismos, hemorragias e neoplasias), o glaucoma de pressão normal e o glaucoma congênito (BRASILEIRO FILHO, 2016; WÓJCIK-GRYCIUK *et al.*, 2016).

### 2.1.1 Diagnóstico

Sabendo que o principal tipo de glaucoma é passível de ser tratado de forma medicamentosa o presente trabalho focou na forma primaria de ângulo aberto. O diagnóstico do GPAA é realizado através da avaliação clínica, que inclui a biomicroscopia, aferição da PIO, avaliação do ângulo da câmara anterior, exame de oftalmoscopia e o teste de campo visual funcional (MANTRAVADI *et al.*, 2015). A oftalmoscopia avalia possíveis alterações no nervo óptico, mas por ser de baixa sensibilidade cerca de 30% a 50% das células podem já estar danificadas antes do diagnóstico, daí a necessidade de múltiplos exames e acompanhamento médico (WEINREB *et al.*, 2014).



### 2.1.2 Epidemiologia

Apesar de ser evitável, por meio do diagnóstico adequado e tratamento correto, a perda de visão provocada pelo glaucoma é irreversível (WEINREB *et al.*, 2016). Segundo a Organização Mundial de Saúde ele é a segunda causa mundial de cegueira evitável, que acomete 8% dos pacientes (70 milhões de pessoas) e está atrás apenas da catarata, que é responsável por 51% dos casos de cegueira registrados (WHO, 2015; WEINREB *et al.*, 2016).

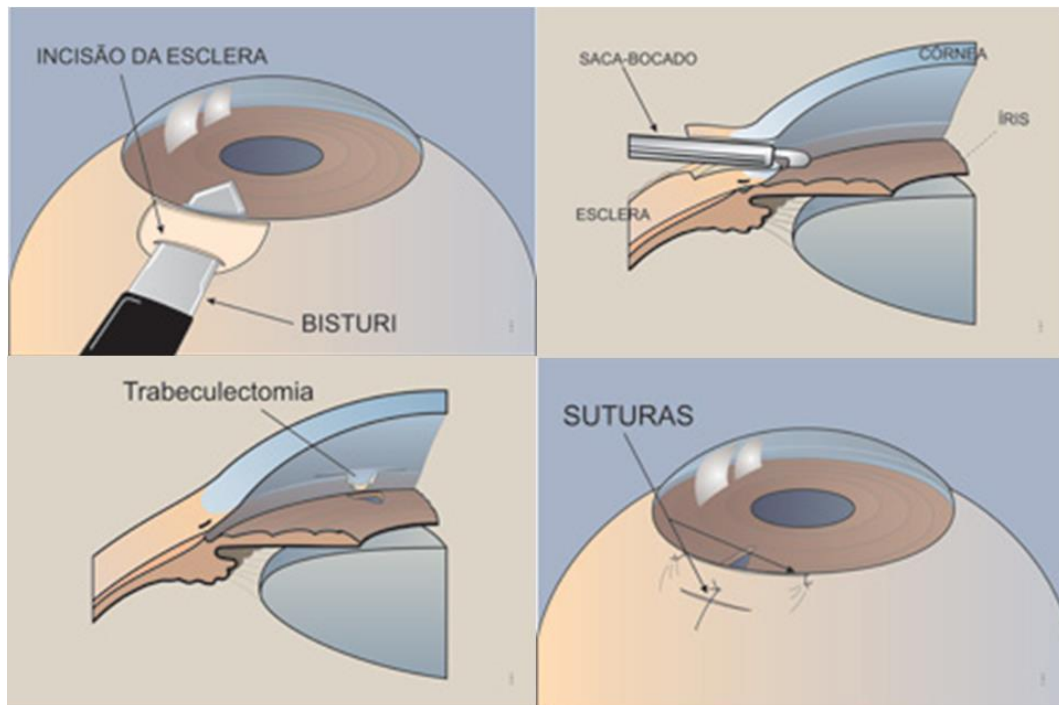
No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, foram investidos cerca de 175 milhões de reais em consultas e cirurgias para o tratamento do glaucoma no ano de 2015. Isso corresponde a aproximadamente dois milhões de atendimentos, um crescimento de 47% em relação ao número de atendimentos registrados no ano de 2012 (BRASIL, 2016).

### 2.1.3 Tratamento

O tratamento do glaucoma tem como objetivo evitar a progressão da doença, de modo a manter a qualidade de vida do indivíduo e provocar o mínimo de desconforto decorrente de efeitos adversos. O manejo da PIO (único fator de risco clinicamente modificável) consiste na base do tratamento. Existem três modalidades principais de tratamento: trabeculectomia, cirurgia a laser e terapia medicamentosa (WÓJCIK-GRYCIUK *et al.*, 2016).

A trabeculectomia (Figura 5) é uma técnica cirúrgica comum, geralmente indicada nos casos em que ocorre baixa adesão ao tratamento medicamentoso, efeitos adversos relacionados ao uso do medicamento e dificuldade de adquiri-lo. A cirurgia produz um canal, que facilita a drenagem do HAQ. No entanto, essa técnica pode gerar complicações como endoftalmite, inflamação conjuntival, fluxo excessivo, descolamento de retina ou mesmo atrofia do globo ocular (IOBH, 2019; WÓJCIK-GRYCIUK *et al.*, 2016).

**Figura 5: Esquema da cirurgia de trabeculectomia.**



**Fonte: (IOBH, 2019)**

Como alternativas à trabeculectomia existem os procedimentos a laser. Mais de um tipo de laser pode ser aplicado na malha trabecular sendo que a diferença entre eles está no tempo de exposição, tamanho da mira, tipo de aplicação (luz pulsada ou contínua) e intensidade. A cirurgia a laser também pode provocar complicações como a uveíte (WÓJCIK-GRYCIUK *et al.*, 2016).

A terapia medicamentosa visa reduzir a PIO por meio do controle da produção do HAQ no corpo ciliar e/ou sua drenagem pela rede trabecular. É objetivo, também, dessa terapia evitar a lesão glaucomatosa progressiva no nervo óptico com o mínimo de efeitos colaterais tópicos e sistêmicos (HENDERER e RAPUANO, 2012; TORIS *et al.*, 2010). A classe de fármacos mais utilizada atualmente são os análogos de prostaglandina, pois exigem menor frequência de administração, provocam menos efeitos sistêmicos e demonstram efetividade. Os efeitos adversos relatados para os análogos de prostaglandina são o escurecimento gradual e irreversível da íris (por aumento de melanossomas), escurecimento de sobancelha, hipertricose dos cílios, hiperemia da conjuntiva e ceratite (WEINREB *et al.*, 2004; HENDERER *et al.*, 2012).

Falar que no nosso estudo o insert pode durar um mês

Segundo dados de 2009 da ANVISA, aproximadamente, 24% dos pacientes tratados com análogos de prostaglandina tiveram 25% ou mais de sua renda comprometida com o tratamento e 45% relataram dificuldade em adquirir a medicação em algum momento do tratamento, a dificuldade em adquirir a medicação pode ser considerada uma falha terapêutica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Outras classes e exemplos de medicamentos utilizados na terapia do glaucoma estão resumidos na Tabela 1.

**Tabela 1: Medicamentos utilizados no tratamento do GPAA**

Classe do anti-hipertensivo	Mecanismo de ação	Efeitos adversos
<b>Análogos de prostaglandina</b> (bimatoprost, latanoprost, travoprost)	↑ Drenagem HAQ <sup>§</sup>	Aumento dos cílios Escurecimento da íris Diminuição da gordura periorbital
<b>Betabloqueadores *</b> (timolol, levobunolol, metipranolol, carteolol, pindolol, betaxolol, metoprolol)	↓ Produção HAQ	Irritação ocular Olho seco
<b>Parassimpaticomiméticos</b> (pilocarpina)	↑ Drenagem HAQ	Diminuição da visão
<b>Inibidores da anidrase carbônica **</b> (dorzolamida e a brinzolamida)	↓ Produção HAQ	Síndrome de Steven-Johnson Mal-estar Cálculo renal
<b>Hiperosmóticos</b> (manitol)	↑ osmolaridade sanguínea	Insuficiência cardíaca congestiva Retenção urinária

\* *contraindicado em pacientes com asma, doença obstrutiva pulmonar crônica e bradicardia.*

\*\* *contraindicado para pacientes com histórico de nefrolitíase ou cálculo renal*

\*\*\* *contraindicado para pacientes com asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, arritmias cardíacas.*

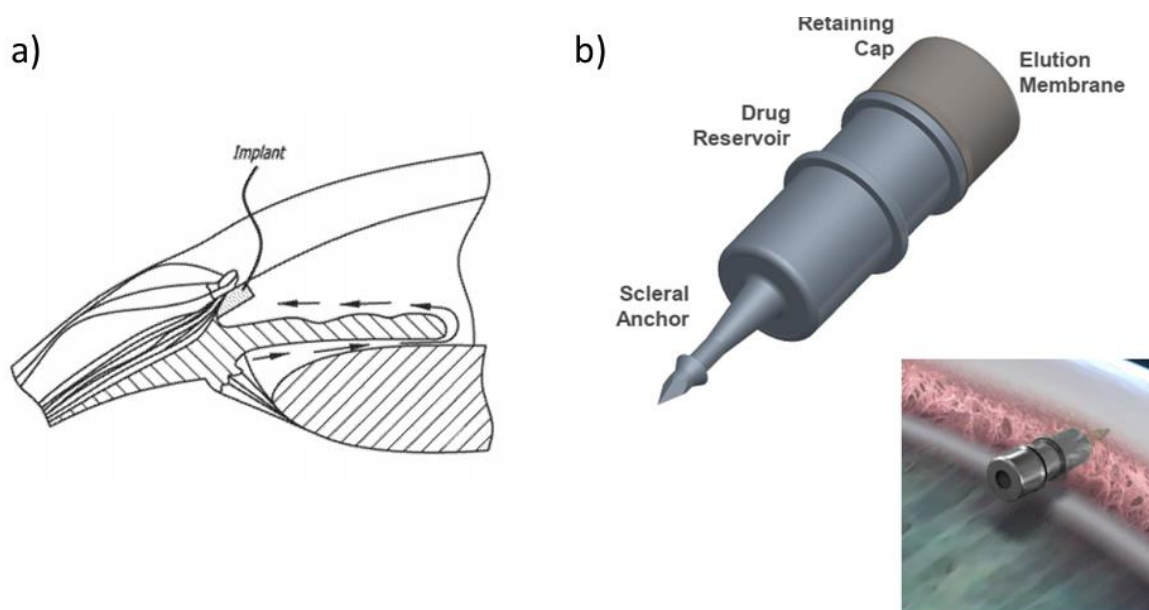
§ *Humor aquoso*

**Fonte: Adaptado de HENDERER et al., 2012.**

Além disso, como ocorre em qualquer doença crônica, a eficácia do tratamento é limitada pela adesão do paciente, que é reduzida por fatores como esquecimento, politerapia ou até mesmo a dificuldade no momento da instilação, pois em sua maioria os pacientes são idosos (WEINREB et al., 2014).

Alguns dispositivos de liberação prolongada já foram desenvolvidos para o tratamento do glaucoma, como dispositivos intracamerais e implantes oftálmicos (iDose®), eles ainda não estão disponíveis no Brasil e estão em período de teste no FDA (GLAUKOS, 2020, NAVRATIL et al., 2017)

**Figura 6: Novos dispositivos de liberação prolongada para o tratamento do glaucoma**



Fonte: GLAUKOS, 2020; NAVRATIL et al., 2017

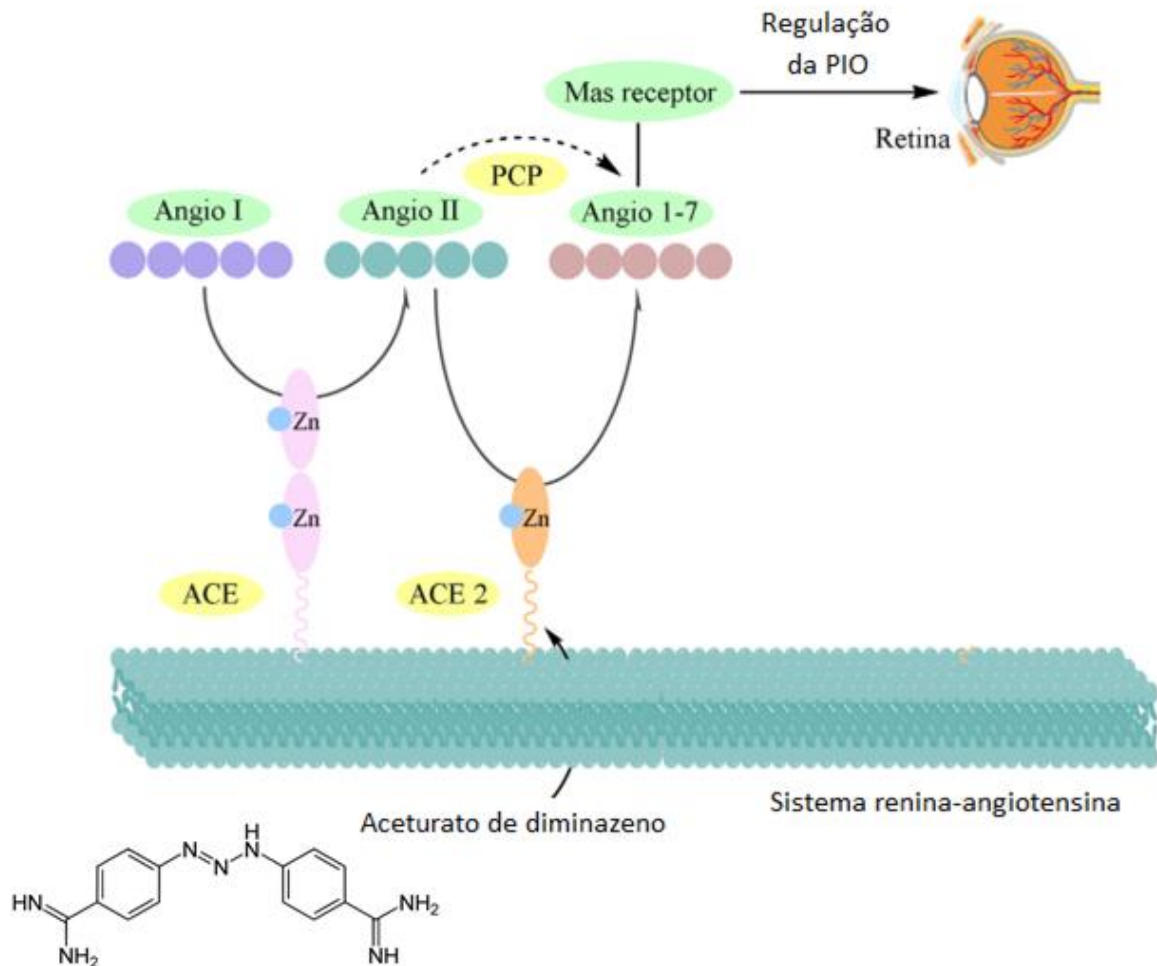
### 2.1.3.1 Ativação da enzima conversora de angiotensina-2

A enzima conversora de angiotensina 2 (ACE 2) é homóloga à enzima conversora de angiotensina (Ang). Ela é responsável por manter o balanço entre a angiotensina (1-7) e a angiotensina II, uma vez que degrada a Ang-II aumentando a formação da Ang-(1-7). Dessa forma, a ACE-2 e seus receptores podem representar um novo alvo terapêutico para o tratamento de doenças relacionadas ao sistema renina-angiotensina (SRA), que é responsável por controlar a pressão arterial (DA SILVA *et al.*, 2015).

Um exemplo da aplicação desse novo alvo terapêutico foi descrito por Foureaux e colaboradores (2013) no estudo que utilizou o acetato de diminazeno (Dize - 1 mg/kg/dia) no qual foi possível observar a atividade neuroprotetora do fármaco em relação a apoptose de células da retina, possivelmente por aumentar a expressão de ACE 2 na retina de ratos com glaucoma induzido (Figura 6). Em outras palavras, ocorre a neutralização dos efeitos da Angio II, que transformado-a em Angio (1-7) e, assim, aumenta o estímulo do receptor Mas, o Dize ativa a expressão de ACE 2, que aumenta a síntese de Angio (1-7). Desta forma, Angio (1-7) interage com o receptor

Mas na retina para exercer sua função farmacológica que consiste na regulação da PIO. Portanto o Dize foi capaz de aumentar e prevenir o aumento da PIO, trazendo uma nova alternativa para o tratamento do GPAA (FOUREAUX *et al.*, 2013).

**Figura 7: Representação esquemática da regulação do sistema renina-angiotensina (ACE 2) que ocorre no olho através do receptor MAS**

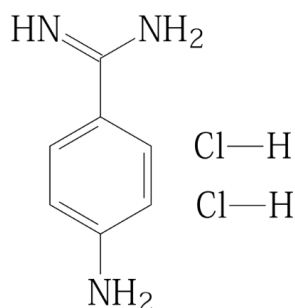


Adaptado de DA SILVA *et al.*, 2015

Este mesmo grupo de Foureaux e colaboradores (Núcleo de Estudos Pesquisa e Desenvolvimento em Ciências Farmacêuticas) vêm estudando uma substância inédita derivada do diminazeno denominada dihidrocloridrato de 4-aminobenzamidina (4-AD – Figura 7), que possui atividade vasodilatadora (FARACO *et al.*, 2018). Devido a essa atividade o 4-AD demonstra ação antiglaucomatosa semelhante ao Dize, a mesma substância é descrita na literatura como inibitória de serino-proteases (DA SILVA *et al.*, 2015). No entanto, estas investigações estão,

ainda, no nível básico e não foi desenvolvida nenhuma formulação de interesse para a indústria farmacêutica.

**Figura 8: Estrutura molecular da substância dihidrocloridrato de 4-aminobenzamidina**



Neste sentido, para viabilizar a utilização da substância 4-AD, ocorre a necessidade de conduzir novos testes para verificação da atividade no tratamento do glaucoma induzido em cobaias através de sistemas de liberação prolongada com mucoadesão melhorada e, conseqüentemente, maior do tempo de ação.

## 2.2 Farmacocinética ocular

A maioria dos medicamentos oftálmicos é na forma de soluções ou suspensões (no caso de ativos pouco solúveis). Géis, pomadas, insertes sólidos, lentes de contatos, dentre outras formas, também podem ser utilizadas. Nesse caso elas também prolongam o tempo de contato do fármaco com a superfície ocular, facilitando a absorção do ativo. Em geral a forma de administração oral não é muito utilizada, pois olho é isolado das vias de distribuição sistêmica pelas barreiras hematorretiniana, hematoaquosa e hematovítrea (HENDERER *et al.*, 2012).

Quando aplicado topicamente o fármaco precisa ultrapassar as barreiras da córnea e conjuntiva. A córnea constitui uma barreira não vascularizada, com diversas camadas e exibe resistência à difusão passiva de íons, ao passo que conjuntiva é uma barreira a difusão passiva de um modo geral. Assim, os ativos aplicados topicamente são normalmente absorvidos através de transportadores ativos como a glicoproteína-p e alguns aminoácidos. Além disso, acima da córnea e a conjuntiva está o filme lacrimal e a camada mucosa, que também exercem função de barreira (DE LA FUENTE *et al.*, 2010).

O filme lacrimal exerce influência na absorção sistêmica do ativo, pois ele é capaz de drená-lo *via* ducto lacrimonasal, esse efeito pode ser aumentado pela indução da produção de lágrimas provocada pela instilação de colírios. Por exemplo, depois de instilado o colírio é eliminado por diversas vias, sendo que apenas 5% da dose administrada alcançam os tecidos intraoculares (WEINREB *et al.*, 2014). Neste caso a produção de lágrimas contribui para uma baixa biodisponibilidade dos ativos no local de absorção. Adicionalmente, o fármaco pode se ligar a proteínas das lágrimas ou pode ser metabolizado localmente (CALLES *et al.*, 2015; HENDERER *et al.*, 2012; NAGARWAL *et al.*, 2009; FRANÇA *et al.*, 2014.a). Dessa forma, pode-se concluir que a taxa e extensão da absorção são determinadas pelo tempo de contato da formulação com o olho, especificamente com o saco conjuntival e com a película pré-corneal (HENDERER *et al.*, 2012).

### *2.2.1 Sistemas de liberação ocular de fármacos*

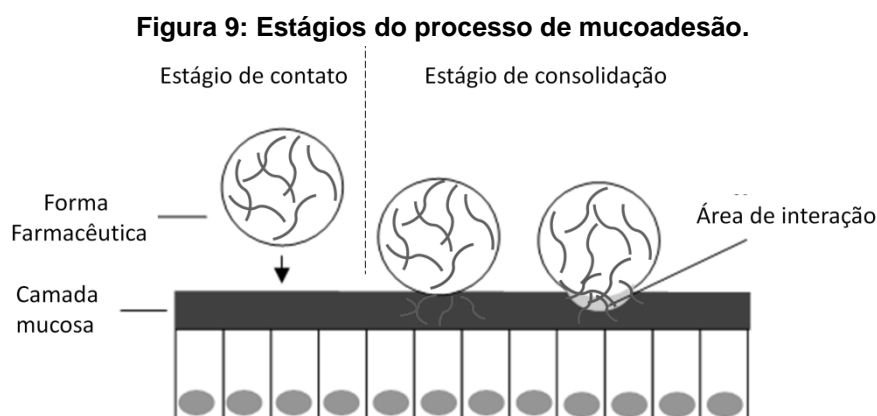
No tratamento do glaucoma os colírios são, atualmente, a forma farmacêutica mais utilizada quando comparados aos géis e pomadas oftálmicas (as outras formas mais comuns disponíveis), pois são mais convenientes quanto à administração, econômicos e seguros. Suas desvantagens incluem o cuidado durante a instilação, falha no processo de adesão ao tratamento, em essencial quando há a necessidade de múltiplas administrações. Ademais, seu uso pode acarretar toxicidade local, como irritação e hiperemia, além de efeitos adversos sistêmicos provocados devido à absorção *via* ducto lacrimonasal do ativo instilado (ANDREWS *et al.*, 2009; HENDERER *et al.*, 2012).

Com a finalidade de aperfeiçoar as formulações oculares formulações inovadoras vêm sendo desenvolvidas, alguns exemplos são colírios contendo lipossomas (ABURAHMA *et al.*, 2011; PISAL *et al.*, 2014) ou microesferas (PEK *et al.*, 2016). Além de lentes de contato (PENG, 2017) e insertes oftálmicos (SHIVAKUMAR, 2007). Essas formulações citadas são formas farmacêuticas de liberação prolongada, elas garantem uma maior comodidade ao paciente, em função do espaçamento do intervalo entre as doses, ajudam a controlar a flutuação natural da PIO, que ocorre ao longo do dia, além de diminuir os efeitos adversos sistêmicos (GHATE *et al.*, 2008; GOOCH *et al.*, 2012; FRANÇA *et al.*, 2014.a)

Dentre os dispositivos citados destacamos os insertes oftálmicos, que são preparações sólidas ou semissólidas, cujo tamanho e forma foram especificamente desenvolvidos para a aplicação ocular (CALLES *et al.*, 2015). Eles geralmente são produzidos com polímeros, podendo possuir características de acordo com sua matriz constituinte: bioerodíveis, biocompatíveis e mucoadesivos (CALLES *et al.*, 2015; GOOCH *et al.*, 2012).

### 2.2.2 Sistemas mucoadesivos

A mucoadesão é um fenômeno caracterizado pela aderência de um material a uma mucosa (p. ex. a mucosa presente na superfície ocular). Isso ocorre por meio da interação deste material com as cadeias de mucina, sendo o mecanismo de aderência didaticamente dividido em duas etapas. Na etapa de contato há o espalhamento e intumescimento da formulação, em seguida (etapa de consolidação), ocorre a deformação plástica do sistema, tornando possível interações entre a mucina e a formulação por meio de ligações iônicas, covalentes, ligações de hidrogênio ou forças de van der Waals (SMART, 2005; BERNKOP-SCHNURCH, 2005). No caso de um sistema formulado com polímeros mucoadesivos o entrelaçamento das cadeias poliméricas com a superfície mucosa é um ponto relevante, a partir do qual se possibilita as interações descritas entre as cadeias e a mucina (Figura 8).



Adaptado de SMART *et al.*, 2005

Dispositivos farmacêuticos mucoadesivos são capazes de aumentar o tempo de contato da formulação com seu local de ação, por exemplo, a mucosa ocular, nasal,



oral, vaginal e gastrointestinal (FRANÇA *et al.*, 2014.a; FOUREAUX *et al.*, 2015; VILLANOVA *et al.*, 2010). Dessa forma, há um aumento na concentração do ativo em seu local de ação e, conseqüentemente, na eficácia terapêutica, pois ocorre maior absorção do fármaco. Levando-se em consideração o que foi dito, outro benefício dos sistemas de liberação prolongada é a redução na frequência da administração do medicamento (CARVALHO *et al.*, 2014).

Para um polímero ser classificado como mucoadesivo, ele deve possuir grupos funcionais que permitam sua interação a mucina (por exemplo, os grupamentos –OH e –COOH, que interagem por meio de interações de hidrogênio), propriedades molhantes adequadas e flexibilidade suficiente para o entrelaçamento com a rede de muco do tecido (de acordo com as teorias gerais do processo de mucoadesão – ver Tabela 2) (ANDREWS *et al.*, 2009; VILLANOVA *et al.*, 2010).

**Tabela 2: Teorias gerais do processo de mucoadesão**

Processo envolvido	
Teoria eletrônica	Transferência de elétrons entre a camada mucosa e a formulação, devido a diferenças nas estruturas eletrônicas. Isso permitiria a formação de uma rede de forças atrativas entre as duas superfícies.
Teoria da molhabilidade	Considera a superfície de contato e a energia interfacial. Descreve a penetração da formulação nas irregularidades da superfície mucosa; a afinidade do sistema adesivo é definida de acordo com o ângulo de contato.
Teoria da adsorção	Interação do material adesivo devido a interações de van der Waals e ligações de hidrogênio.
Teoria da difusão	Interpenetração de cadeias poliméricas através de uma interface adesiva permitindo a ocorrência de ligações adesivas semi-permanentes. A profundidade atingida pelas cadeias poliméricas está relacionada ao coeficiente de difusão e ao tempo de contato com superfície mucosa. Esse processo depende diretamente do tamanho da cadeia molecular e de sua molhabilidade.
Teoria mecânica	A aderência surge da interligação de substâncias adesivas com superfícies mucosas irregulares (ex. córnea que apresenta, também, um tipo celular com microvilosidades). As irregularidades correspondem a maior superfície de contato para a formulação se dispersar, o que é um fator importante no processo de aderência.

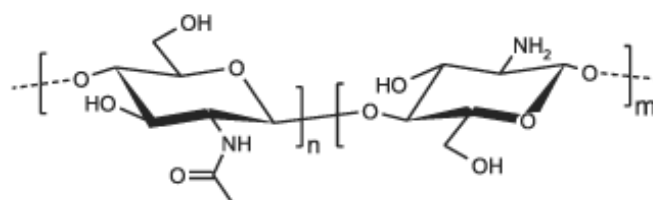
**Adaptado de SMART, 2005 e ANDREWS *et al.*, 2009**

O sulfato de condroitina (SC), um polímero aniônico, e o polímero catiônico quitosana (ChS) possuem elevado potencial mucoadesivo além de baixa toxicidade e boa biocompatibilidade (ANDREWS *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2009; VILLANOVA *et al.*, 2010).

### 2.2.2.1 Quitosana

A quitosana (ChS – Figura 9) é um polissacarídeo proveniente da desacetilação da quitina (presente no exoesqueleto de insetos e crustáceos), quimicamente ela é composta por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicose (CHOURASIA *et al.*, 2003). Sistemas baseados em quitosana tais como géis, nanopartículas e insertes, demonstram potencial mucoadesivo permitindo a melhora da biodisponibilidade e a absorção do fármaco veiculado em sua matriz (MISHRA *et al.*, 2008).

**Figura 10: Estrutura molecular da quitosana.**

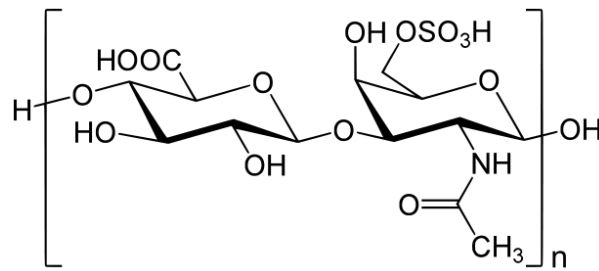


A ChS apresenta baixa toxicidade, é biodegradável e possui boa tolerância ocular. Além disso, ela possui a capacidade de melhorar a permeabilidade de certas substâncias, por fim, sua conhecida capacidade de formar filmes a torna um material de interesse para a formulação de insertes oftálmicos (MISHRA *et al.*, 2008; FRANÇA *et al.*, 2014.a).

### 2.2.2.2 Sulfato de Condroitina

O sulfato de condroitina (SC) é um polissacarídeo quimicamente constituído por sequências alternadas de dissacarídeos de N-acetil-D-galactosamina ligados por ligações  $\beta$  ao ácido D-glicurônico (Figura 10). Sua cadeia linear é polidispersa e pode ser encontrada em grande variedade de tecidos humanos incluindo cartilagem, ossos, aorta, dentes e córnea (DOPPALAPUDI *et al.*, 2014; HORI *et al.*, 2001; VOLPI, 2011).

**Figura 11: Estrutura molecular do sulfato de condroitina.**



O SC é um dos mais abundantes glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular da córnea, com várias funções biológicas como regulação da inflamação, redução da atividade da colagenase e controle do espaçamento das fibras de colágeno na córnea (WANG et. al., 2017). Além dessas propriedades, o SC também é mucoadesivo e, de maneira análoga à ChS, pode aumentar o tempo de residência pré-corneal da preparação e a biodisponibilidade do fármaco (CARVALHO et al., 2010; VOLPI, 2011).

Tudo isso sugere que o SC tem potencial aplicabilidade como componente de sistemas de liberação modificados de fármacos. Além disso, sugere-se que sua formulação com a ChS pode apresentar um potencial mucoadesivo aumentado de maneira sinérgica, o que seria extremamente benéfico para solucionar o problema identificado por nosso grupo em relação aos testes em humanos com relação à aderência não satisfatória do dispositivo de quitosana pura ao tecido ocular. (FRANÇA et al., 2014.a).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar o perfil de liberação *in vitro* de filmes poliméricos mucoadesivos e biodegradáveis contendo a substância (4-AD). Avaliar a atividade *in vivo* do dispositivo na redução da pressão intraocular (PIO) de ratos com glaucoma induzido, com a finalidade de tratar a doença.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método de quantificação do 4-AD Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC);
- Caracterizar morfologicamente os filmes poliméricos, com (IA) e sem o ativo (IP), por microscopia eletrônica de varredura
- Caracterizar físico-quimicamente por análise térmica e espectrometria no infravermelho, potencial de hidratação e pH de superfície;
- Caracterizar o potencial de liberação do ativo utilizando o perfil de liberação *in vitro*;
- Avaliar a atividade dos dispositivos na redução da PIO de ratos Wistar com glaucoma induzido.

## **PARTE II**

TRABALHO EXPERIMENTAL: Desenvolvimento e validação de método analítico

MANUSCRITO II

**Development and validation of analytical method by HPLC-DAD for  
determination of vasodilator active in pharmaceutical ophthalmic forms**

Artigo submetido à revista Journal of Basic and Applied Pharmaceutical  
Sciences

**Development and validation of analytical method by HPLC-DAD for determination of vasodilator active in pharmaceutical ophthalmic forms**

Aina Liz A. Cesar<sup>1</sup>, Larissa Caldeira Navarro<sup>1</sup>, Alaíde de Matos Silva<sup>1</sup>, Rachel Oliveira Castilho<sup>1</sup>, Gisele Assis Castro Goulart<sup>1</sup>, Giselle Foureaux Heida<sup>2</sup>, Anderson J. Ferreira<sup>2</sup>, Sebastião Cronemberger<sup>3</sup>, André A. Gomes Faraco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

<sup>3</sup>Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

**Corresponding author:** André Augusto Gomes Faraco, PhD

**Address:** Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil.

**Phone:** +55 31 3409-6396; **Fax:** +55 31 3409-6961

**E-mail:** [andrefaraco@ufmg.br](mailto:andrefaraco@ufmg.br)

**Short running title:** HPLC-DAD determination vasodilator

## **Development and validation of analytical method by HPLC-DAD for determination of vasodilator active in pharmaceutical ophthalmic forms**

**Abstract:** 4-Aminobenzamidine dihydrochloride (4-AD) is one of the degradation products of diminazene aceturate, which has been demonstrating antiglaucomatous potential. Glaucoma is the second leading cause of blindness worldwide, so it is relevant to study new therapeutic alternatives, for example, the molecule 4-AD into polymeric inserts of prolonged release. The present work aims to develop and validate an analytical method for the quantification of 4-AD in pharmaceutical ophthalmic forms. It was used an HPLC with UV-Vis detector, at 290 nm and ACE® C18 column (125x4.6 mm, 5 µm), the mobile phase consists of phosphate buffer (pH 7.4) and triethylamine (30 mmol/L), under an isocratic flow of 1.0 mL/min. It was observed the retention time of 3.2 minutes. The method was developed and validated in accordance with ANVISA recommendations and ICH guides. The linearity range was established between the concentrations of 5 and 25 µg/mL (correlation coefficient = 0.997), the accuracy, repeatability, intermediate precision tests showed a relative standard deviation less than or equal to 5%, in addition the method was also considered selective, exact and robust, pH being its critical factor. Therefore, the HPLC analysis method is robust and can be used to quantify the substance 4-AD in pharmaceutical forms for ocular application.

**Keywords:** HPLC, method validation, ophthalmic insert, 4-AD, diminazene aceturate.



## **Desenvolvimento e validação de método analítico em HPLC-DAD para determinação de ativo vasodilatador em formas farmacêuticas oftálmicas.**

**Resumo:** O dicloridrato de 4-aminobenzamidina (4-AD) é um dos produtos de degradação do aceturato de diminazeno, que vem demonstrando potencial antiglaucomatoso. O glaucoma é a segunda principal causa de cegueira em todo o mundo, por isso é relevante estudar novas alternativas terapêuticas, por exemplo, a molécula 4-AD em inserções poliméricas de liberação prolongada. O presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método analítico para a quantificação de 4-AD em formas oftalmológicas farmacêuticas. Utilizou-se HPLC com detector UV-Vis, a 290 nm, e coluna ACE® C18 (125x4,6 mm, 5 µm), a fase móvel consiste em tampão fosfato (pH 7,4) e trietilamina (30 mmol/L), sob um fluxo isocrático de 1,0 mL/min. Foi observado o tempo de retenção de 3,2 minutos. O método foi desenvolvido e validado de acordo com as recomendações da ANVISA e os guias ICH. A faixa de linearidade foi estabelecida entre as concentrações de 5 e 25 µg/mL (coeficiente de correlação = 0,997), os testes de exatidão, repetibilidade e precisão intermediária mostraram um desvio padrão relativo menor ou igual a 5%, além disso, o método também foi considerado seletivo, exato e robusto, sendo o pH o fator crítico. Portanto, o método de análise por HPLC é robusto e pode ser usado para quantificar a substância 4-AD em formas farmacêuticas para aplicação ocular.

**Palavras-chave:** HPLC, método de validação, inserto oftálmico, 4-AD, aceturato de diminazeno.

## 1 INTRODUCTION

Primary open-angle glaucoma (POAG) is characterized by increased intraocular pressure (IOP) in the anterior chamber and a damage to the optic nerve, therefore classified as the second leading cause of blindness worldwide (d'Azy et al., 2016). Its therapy requires multiple daily instillations to obtain a suitable therapeutic response, but this may compromise patient's compliance. In addition, more than 90% of the administered dose is drained by the nasolacrimal duct, reaching the systemic circulation leading to adverse effects (Karki et al., 2016; Mu et al., 2018, Sharif, 2017, Zhu et al., 2018).

In order to overcome the problems reported above many formulations have arisen, such as contact lenses (Carvalho et al., 2015, Desai et al., 2018, Alvarez-Lorenzo et al., 2019), nanosuspensions, nanoparticles (Gupta et al., 2010, Mu et al., 2018), polymeric nanocarriers (cyclodextrins, dendrimers) (Calles et al., 2015, Carta et al., 2015, Rodriguez-Aller et al., 2015) and lipid nanoparticles (Gooch et al., 2012, Wang et al., 2015, Wang et al., 2017). Ophthalmic inserts, consists on another formulation that can be used. It is a prolonged release system that allows the reduction on systemic side effects and the frequency of administration, and consequently leading to better treatment outcomes (Karki et al., 2016, Wang et al., 2018, Yadav et al., 2019). The inserts are less associated to eye irritation and they do not leave sticky sensation on the application side, which is advantageous over other forms of drug release (Franca et al., 2014, de Souza et al., 2016, Karki et al., 2016).

Diminazene aceturate (DIZE) can be degraded into two molecules; 4-aminobenzamidine and 4-amidinophenyldiazonium salt (Campbell et al., 2004). The use of 4-Aminobenzamidine Dihydrochlorid (4-AD, Figure 1) consists on an innovation of the therapies available for the treatment of glaucoma, as some studies have shown that this compound is able to reduce intraocular pressure and protect the retinal ganglion cells from degeneration caused by the pathological process of glaucoma (Foureaux et al., 2015, Faraco et al., 2018).

Since 4-AD is not considered a drug yet, there is no official assay method available in compendia (pharmacopoeias). Atsriku et al (2002) and Campbell et

al (2004) describes the determination and identification of DIZE and its degradation products by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). However these methods are not suitable for 4-AD quantification, and also requires complex instrumentation and are expensive when compared to high performance liquid chromatography (HPLC) (Maia et al., 2015). In this way, it is necessary the development of an analytical method for the detection and identification of 4-AD in pharmaceutical forms. Therefore, a quantitative method in high performance liquid chromatography was developed and validated.

## **2 MATERIAL AND METHODS**

All reagents used were of analytical grade and the solutions were prepared in Milli-Q purified water (Millipore, Billerica, USA). 4-Aminobenzamidine Dihydrochloride was purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Germany), batch #MKBV0640V, content of 98%. Chondroitin sulphate (chondroitin 4-sulfate sodium salt, 45000 Da) was purchased from Galena Chemical and Pharmaceutical Ltda. (Campinas, Brazil), medium molecular weight chitosan (200000 Da) and the dye Lissamine™ Green B was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA).

### **2.1. Insert preparation**

Chitosan (Chs) and chondroitin (CS) inserts, stained with Lissamine™ Green B, and carrying the active 4-AD were produced by the solvent casting technique (Rodrigues et al., 2009). First, 180 g of 4-AD and 25 µL of dye solution were added in 1% w/v acetic acid, and then 1 g of each polymer was solubilized and homogenized. The final gel was magnetically stirred overnight, poured into circular silicone-molded trays containing individual wells (5x2 mm), and left at room temperature for drying. The final inserts were calibrated using a 5 mm punch.

### **2.2. HPLC parameters and validation method**

The analytical method validation was performed in accordance with RDC n° 166/2017, Brazilian pharmacopoeia and ICH guides (ICH 2005, Brasil, 2017, ANVISA, 2019, Maia et al., 2015). The chromatographic analysis were

performed on Chromatograph Agilent Technologies 1260, coupled to EzChrom program (Agilent Technologies, CA, USA) with a ACE<sup>®</sup> C18 column (125x4.6 mm, 5 µm) at 30°C. The mobile phase was phosphate buffer (pH 7.4) with TEA 30 mmol/L at the ideal flow (1.0 mL/min) were established. For this purpose, the system was adapted based on the parameters defined in the literature: number of theoretical plates >3000, asymmetry <1.5 and relative standard deviation <2% (Snyder et al., 1997, ICH 2005, ANVISA, 2019, Maia et al., 2015).

For the validation of the analytical method, placebo inserts were contaminated with a known concentration of 4-AD, then it were dried again and finally solubilized in acetic acid 1% (v/v). The final solution was filtered through 0.45 µm and dilutions were performed in order to obtain the desired concentrations.

The validation followed in accordance with the resolution of the collegial board of directors RDC n° 166/2017 and the ICH guide for validation. The selectivity was evaluated by overlapping the matrix components and also by the evaluation of the peak purity of the active 4-AD (ICH, 2005; ANVISA, 2019).

The linearity was demonstrated by reading five different levels of concentration (5, 10, 15, 20 and 25 µg/ml). The solutions were prepared in triplicate and the graph "Concentration x Area" was plotted. According to the current legislation, the acceptance criteria involves the correlation coefficient greater than 0.990 and the angular significantly different from zero ( $p < 0.05$ ). The statistical analysis was performed in the GraphPad Prism 5.0 program (GraphPad Software, San Diego) (Brasil, 2017).

The detection limit (DL) shows the smallest detectable amount (but not necessarily quantifiable) of the analyte in a sample and the limit of quantification (LQ) is the smallest amount of analyte that can be determined with precision and accuracy. Both limits were calculated with the formulas:  $DL = 3,3 \times \sigma / IC$  and  $LQ = 10 \times \sigma / IC$  respectively. Where  $\sigma$  is the standard deviation of the intercept with the y-axis and IC is the slope of the calibration curve (ANVISA, 2019).

The precision must be demonstrated by calculating the relative standard deviation (RSD) of nine measurement series (low, medium and high concentrations, contemplating the linear range) according to the formula

$RSD=(SD/MCD) \times 100$ , where SD is the standard deviation and MCD is the mean concentration determined (ICH, 2005).

Repeatability analysis was evaluated using the means of nine triplicates in concentrations 5, 15 and 25 µg/mL, which refers to the agreement between the results in a short period of time with the same analyst and the same instrumentation. The intermediate precision was also analyzed by a triplicate of points on different days with solutions prepared by different analysts; the result should not exceed 5% RSD (ICH, 2005).

The accuracy was determined by the degree of agreement between the quantification results of the method in relation to the known concentration of 4-AD in presence of the components of the formulation, nine measurement series (5, 15 and 25 µg/mL concentrations in triplicate). For this, nine inserts consisting of chondroitin sulfate and chitosan (Chs:SC) were fortified with 4-AD solution of the active and the results were expressed as the percentage of the active recover (ICH, 2005; França et al., 2015; ANVISA, 2019).

Changes in the chromatographic parameters were evaluated as recommended in RDC n° 166/2017 for robustness. Some conditions of the analytical method were modified such as conditions of flow ( $\pm 0.1$  mL/min), temperature ( $\pm 3$  °C) and the TEA concentration in the mobile phase ( $\pm 3$  mmol/L). Nine determinations were performed in three concentrations (low, medium and high). It was compared the results obtained with the modified parameter with the expected result under the standard chromatographic conditions (Maia et al., 2015; ANVISA, 2019).

### **2.3. Statistical analysis**

The software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., USA) was used. The analysis of variance (ANOVA,  $p < 0.05$ ) was performed and the relative standard deviation (RSD) was defined as acceptable when  $< 5\%$ .

## **3 Results**

The best method consists on a column ACE<sup>®</sup> C18 (125x4.6 mm, 5 µm) with isocratic elution at 1.0 mL/min (30 °C) and phosphate buffer (TEA 30 mmol/L;

pH 7.4) as mobile phase. The volume of injection was 20  $\mu\text{L}$  and the detection was performed at 290 nm (Figure 2). The chromatographic parameters (asymmetry and peak purity) were adjusted according to the system suitability specifications: the tailing factor for the active was 1.2 ( $<1.5$ ). The others parameters also evaluated was the number of plates 5034 ( $>3000$ ) and RSD between replicates ( $<2\%$ ) (Snyder et al., 1997, ANVISA, 2019). These data demonstrate that the peak obtained for substance 4-AD can be used in its quantification. The method proved to be selective for the quantification of the active 4-AD, an insert sample was analyzed, it was found that the components of the matrix (chitosan, chondroitin and the dye) did not interfere in the retention time similar to that of the active (Figure 3).

Also it was linear under the range of 5 to 25  $\mu\text{g/mL}$ , the suitability of the model was confirmed by Analysis of Variance (ANOVA), performed in GraphPad Prism 5.0 Software, the linear trend is significant with  $p < 0.05$ , and there is a significant overlap between the three calibration curves ( $p < 0.05$ ). The residue analysis was performed according to Ribeiro et al. (2007), as can be seen on the graph shown in Figure 4, the data has normal distribution with homoscedasticity. The equation of the calibration curve was  $y = 11800000x - 819900$ , so the method was considered linear (ANVISA 2019).

Based on the equation described, it was verified that the detection limit is 0.2337  $\mu\text{g/mL}$  and the limit of quantification is 0.7791  $\mu\text{g/mL}$ . Intra-day and inter-day precision values are shown in Table 1, all are close to 100%, that is, and it was possible to verify that there was no variation in the data obtained between the repetitions. It was calculated by means of the ratio between the experimental average concentration and the theoretical concentration (França et al., 2015).

As shown in Table 1, this method present adequate Repeatability and Intermediate precision for 4-AD assay on a series of measurements (RDS $<5\%$ ), which is in accordance with current legislation (ANVISA, 2019). The accuracy is also in accordance with current legislation, the percentage of recovery is on the established range of 98 to 102%, that is, the method is capable of correctly dosing 4-AD into ophthalmic insert, and has 99% of accuracy (2% RSD). The

robustness measured the sensitivity of the method to small variations ( $\pm 10\%$ ) in the parameters of concentration of TEA, flow and temperature. The method presented adequate robustness, since the analysis in the triplicate of three levels of concentration did not present RSD greater than 5%. The robustness was evaluated by comparing the values obtained from the concentrations in the modified conditions in relation to the concentrations in normal condition. The analysis of the variables was assessed by the ANOVA with Dunnet post-test (95% of confidence interval). The data treated using GraphPad Prism 5.0 Software demonstrated statistical differences between the values ( $p < 0.05$ ) indicating that the method developed is robust

Using the proposed method, the assay was performed. The test was conducted in triplicate with a pool of 10 inserts solubilized in acetic acid. The amount of 30  $\mu\text{g}$  of 4-AD per insert was obtained (0.016%).

#### **4 DISCUSSION**

There was no known method on the literature which specifically describes the identification and quantification of 4-Aminobenzamidine Dihydrochloride in ocular inserts. But this substance appears in the method described by Atsriku et al. (2002) to detect diminazene aceturate, as the 4-AD was one of its degradation products, this method, however, needs to be adapted since the retention time of the molecule of interest was very small, which makes its quantification imprecise. In addition, it involves HPLC-coupled mass spectrometry and this equipment makes the analysis more expensive (Snyder et al., 1997; Atsriku et al., 2002; Campbell et al., 2004; Foureaux et al., 2015). High-performance liquid chromatography is a simpler and low cost method, which brings advantages with regard to its use. Therefore, this was the method of choice for this work (Maia et al., 2015; França et al., 2015).

The parameters used by Atsriku et al. (2002) were the starting point for the development of this method. The retention factor was the first variable analyzed it should be the closest to one and it should take in consideration the total running time and the dead time. To adjust this factor the composition of the mobile phase (buffer), the pH proved to be critical. Also at this stage we chose

to add the triethylamine (TEA) in order to achieve suitable peak symmetry, as it prevents that amino 4-AD groups interacts with the column (Snyder et al., 1997; Maia et al., 2015).

It was chosen as mobile phase a buffer with pH 7.4, as in this value the compound was predominantly in its ionized form. The protonated form interact strongly with silanol groups of the column, which would lead to an increase of the retention of the particles in the column causing a tail at the peak, which increases the parameter denominated tail factor (Snyder et al., 1997).

The selectivity was the following parameter to be analyzed, and it was kept under constant supervision should there be any change (Silva, 2014). The chromatograms resulting from these analyses can be observed in Figure 3, through this analysis it was possible observe that the matrix components did not leave at the 4-AD retention time (Figure 3-a). The chondroitin sulphate (CS) solution shows a small signal in 1.4 minutes and the chitosan (ChS) solution in 1.6. Both of them are far from the retention time of 4-AD, which is 3.2 minutes; there was also no absorption at the wavelength of 290 nm chosen for the determination of the active.

The correlation coefficient was equal to 0.997 that is, the obtained points were little dispersed and were ideal for use in the calibration curve. This value is in accordance with the one recommended by ANVISA and the ICH guide for validation of analytical methods (ICH, 2005; ANVISA, 2019). The recovery percentage was close to 100%, proving everything that was previously said and demonstrating that the method can be considered effective

Robustness was evaluated by varying the following chromatographic conditions by  $\pm 10\%$ : flow, temperature and TEA concentration. We did not perform pH variation because during the development of the method this parameter proved to be critical for the method. The present method proved to be robust since the changes made did not caused changes outside in the parameters determined (Table 2) (ICH, 2005; ANVISA, 2019).

## **5 CONCLUSION**



The analytical method for determination of 4-AD in pharmaceutical formulations, in particular, ophthalmic inserts, using HPLC-DAD proved to be simpler and cheaper than the existing methods, as it does not use mass spectrometry technique. In addition, it was demonstrated that the method is accurate, precise and robust and can be applied in routine analyzes of the described formulation.

## 6 ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank CAPES, CNPq and FAPEMIG for financial support.

## 7 REFERENCES

Alvarez-Lorenzo C, Anguiano-Igea S, Varela-García A, Vivero-Lopez M, Concheiro A. Bioinspired hydrogels for drug-eluting contact lenses. *Acta Biomater.* 2019; 84:49-62. doi: 10.1016/j.actbio.2018.11.020.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019.

Atsriku C, Watson DG, Tettey JN, Grant MH, Skellern GG. Determination of diminazene aceturate in pharmaceutical formulations by HPLC and identification of related substances by LC/MS. *J. Pharm Biomed Anal.* 2002; 30(4):979-986. DOI: 10.1016/s0731-7085(02)00450-8.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. DOU de 25 de julho de 2017 [Internet]. [cited 2019 Jul 24] Available from: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401)

Calles JA, Bermúdez J, Vallés E, Allemandi D, Palma S. Polymers in ophthalmology. In: Puoci F. (eds) *Advanced Polymers in Medicine*. Springer International Publishing. 2015; 147-176.

Campbell M, Prankerd RJ, Davie AS, Charman WN. Degradation of berenil(diminazene acetate) in acidic aqueous solution. *J Pharm Pharmacol*. 2004; 56(10):1327-1332. DOI: 10.1211/0022357044409.

Carta F, Osman SM, Vullo D, Gullotto A, Winum JY, AlOthman Z, Masini E, Supuran CT. Poly(amidoamine) Dendrimers with Carbonic Anhydrase Inhibitory Activity and Antiglaucoma Action. *J Med Chem*. 2015; 58(9):4039-45. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00383.

Carvalho IM, Marques CS, Oliveira RS, Coelho PB, Costa PC, Ferreira DC. Sustained drug release by contact lenses for glaucoma treatment-a review. *J Control Release*. 2015; 202:76-82. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.01.023.

d'Azy CB, Pereira B, Chiambaretta F, Dutheil F. Oxidative and Anti-Oxidative Stress Markers in Chronic Glaucoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016; 11(12): e0166915. DOI: 10.1371/journal.pone.0166915.

Desai AR, Maulvi FA, Pandya MM, Ranch KM, Vyas BA, Shah SA, Shah DO. Co-delivery of timolol and hyaluronic acid from semi-circular ring-implanted contact lenses for the treatment of glaucoma: in vitro and in vivo evaluation. *Biomater Sci*. 2018; 6(6):1580-1591. DOI: 10.1039/c8bm00212f.

Faraco AAG et al. Inventor. Universidade Federal de Minas Gerais (BR/MG); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (BR/MG); Universidade Federal de Goiás (BR/GO), assignee. BR 10 2018 070564 4 A2. 2020 Apr 22.

Foureaux G et al. Ocular inserts for sustained release of the angiotensin-converting enzyme 2 activator, diminazene acetate, to treat glaucoma in rats. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0133149. DOI: 10.1371/journal.pone.0133149.

França JR, Batista LD, Ribeiro TG, Fernandes C, Castilho RO, Faraco AA. Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for determination of bimatoprost in chitosan-based ocular inserts. *Anal Lett*. 2015; 48(3):531-540. DOI: 10.1080/00032719.2014.947533.

Franca JR et al. Bimatoprost-Loaded Ocular Inserts as Sustained Release Drug Delivery Systems for Glaucoma Treatment: In Vitro and In Vivo Evaluation. PLoS One. 2014; 9(4):1-11. DOI: 10.1371/journal.pone.0095461.

Gooch N, Molokhia SA, Condie R, Burr RM, Archer B, Ambati BK, Wirostko B. Ocular drug delivery for glaucoma management. *Pharmaceutics*. 2012; 4(1):197-211. DOI 10.3390/pharmaceutics4010197.

Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quím. Nova*. 2008. 31(1): 164-171. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000100029>.

Gupta S, Samanta MK, Raichur AM. Dual-Drug Delivery System Based on *In Situ* Gel-Forming Nanosuspension of Forskolin to Enhance Antiglaucoma Efficacy. *AAPS PharmSciTech*. 2010; 11(1):322–335. DOI: 10.1208/s12249-010-9388-x.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonization. Geneva, Switzerland. 2005:1-17.

Karki S, Kim H, Na SJ, Shin D, Jo K, Lee J. Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian J Pharm Sci*. 2016; 11: 559 - 574. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.05.004>

Maia ALC, Fernandes, C, Silva TD, Oliveira CNP, Silveira JN, Ramaldes GA. Development and validation of high performance liquid chromatographic and derivative spectrophotometric methods for determination of gadodiamide in liposomal formulations. *Anal Methods*. 2015; 7(19): 8315-8325. DOI: 10.1039/c5ay01709b

Mu C, Shi M, Liu P, Chen L, Marriott G. Daylight-mediated, passive, and sustained release of the glaucoma drug Timolol from a contact lens. *ACS Cent Sci*. 2018; 4(12):1677-1687. DOI: 10.1021/acscentsci.8b00641

Rodrigues LB, Leite HF, Yoshida MI, Saliba JB, Cunha AS Jr, Faraco AA. In vitro release and characterization of chitosan films as dexamethasone carrier. *Int J Pharm* 2009; 368(1–2):1–6. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.09.047

Rodriguez-Aller M, Guinchard S, Guillarme D, Pupier M, Jeannerat D, Rivara-Minten E, Veuthey JL, Gurny R. New prostaglandin analog formulation for glaucoma treatment containing cyclodextrins for improved stability, solubility and ocular tolerance. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015; 95(Pt B):203-14. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.04.032

Sharif NA. Ocular hypertension and glaucoma: A review and current perspectives. *Int Jour Ophth Vis Sci.* 2017; 2(2):22-36. DOI: 10.11648/j.ijovs.20170202.11

Silva JA, Guimarães GP, Patriota YBG, Silva NES, Sousa CEM, Junior FJBM, Santana DP, Damasceno BPGL. Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para quantificação de um derivado tiofênico em sistemas microemulsionados. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2014; 35(4):643-649. ISSN 1808-4532

Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch, JL. Practical HPLC method development. 2nd ed. New York: Wiley-Blackwell, 1997

Souza J, Maia K, Patricio P, Fernandes-Cunha G, da Silva M, Jensen CE, Silva G. Ocular inserts based on chitosan and brimonidine tartrate: Development, characterization and biocompatibility. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2016; 32:21-30. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.01.008>.

Wang BB, Lin MM, Nguyen T, Turalba AV. Patient attitudes toward novel glaucoma drug delivery approaches. *Digit J Ophthalmol.* 2018; 24(2):16-23. DOI: 10.5693/djo.01.2018.07.001

Wang J, Zhao F, Liu R, Chen J, Zhang Q, Lao R, Wang Z, Jin X, Liu C. Novel cationic lipid nanoparticles as an ophthalmic delivery system for multicomponent drugs: development, characterization, in vitro permeation, in vivo pharmacokinetic, and molecular dynamics studies. *Int J Nanomedicine.* 2017; 12:8115-8127. DOI: 10.2147/IJN.S139436

Wang Y, Rajala A, Rajala RV. Lipid Nanoparticles for Ocular Gene Delivery. *J Funct Biomater*. 2015; 6(2):379-94. DOI: 10.3390/jfb6020379.

Yadav KS, Rajpurohit R, Sharma S. Glaucoma: Current treatment and impact of advanced drug delivery systems. *Life Sci*. 2019; 221:362-376. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.02.029.

Zhu Q, Cheng H, Huo Y, Mao S. Sustained ophthalmic delivery of highly soluble drug using pH-triggered inner layer-embedded contact lens. *Int J Pharm*. 2018; 544(1):100-111. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.04.004.

## FIGURES

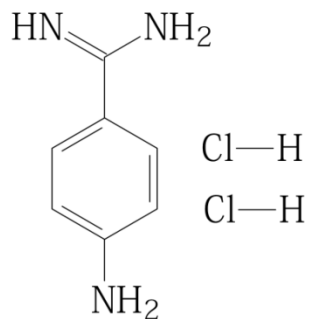


Figure 1: Chemical representation for the structure of 4-AD

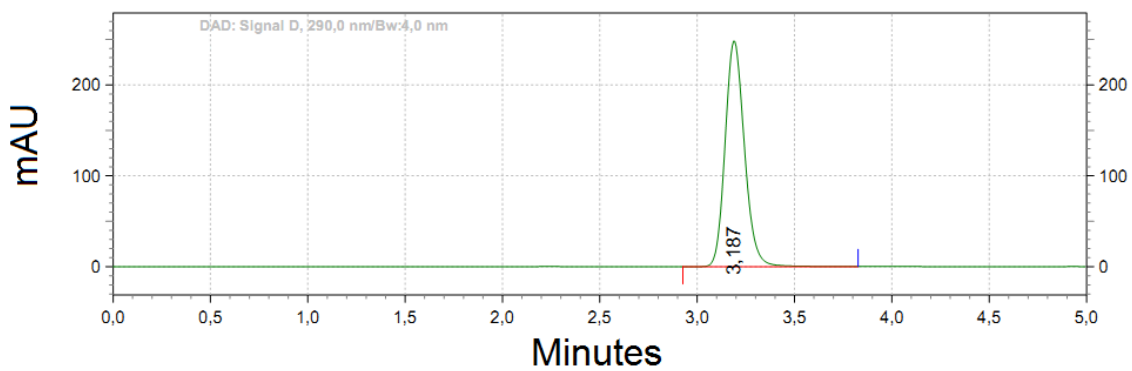


Figure 2: Chromatogram obtained for active substance 4-AD through the developed method

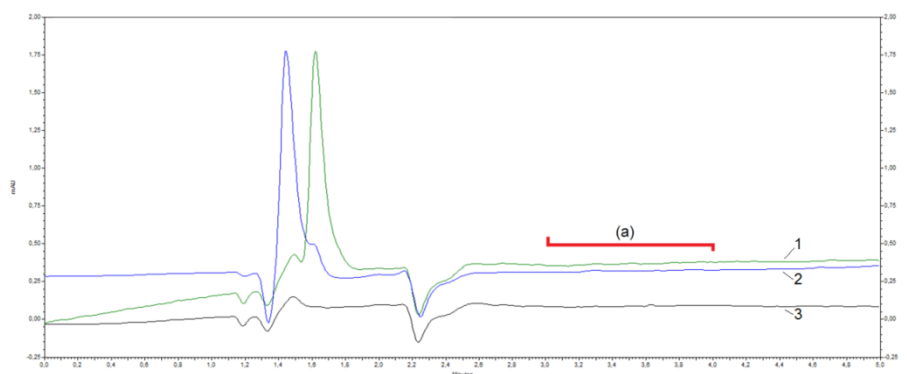
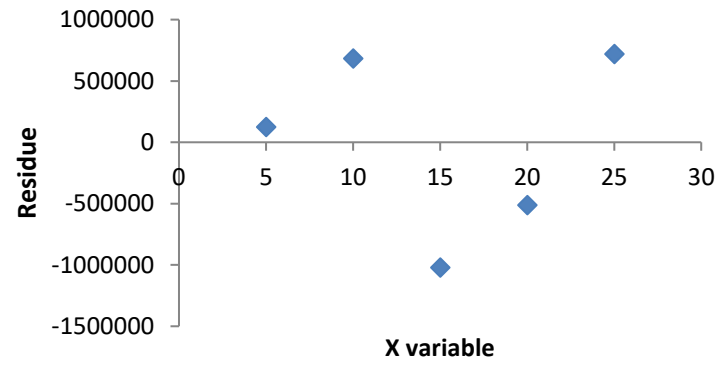


Figure 3: Chromatograms indicating that CS (1), ChS (2); Lissamine (3) do not come out in the same retention time as the active 4-AD (a).



**Figure 4: Residue analysis demonstrating the normal distribution with homoscedasticity.**

## TABLES

**Table 1: Values for Intra-day and inter-day precision for the developed method.**

C <sub>t</sub> (µg/mL)	Repeatability		Intermediate precision		Accuracy	
	MMC (n=3)	RSD	MMC (n=6)	RSD	Recovery (%)	RSD
5.0	4,9050	0,03%	4,9567	0,03%	98%	3%
15.0	14,6667	0,07%	14,7869	0,02%	99%	2%
25.0	25,1409	0,01%	24,8978	0,01%	101%	1%

**C<sub>t</sub> = theoretical concentration, MMC = Mean measured concentration and RSD = relative standard deviation**

**Table 2: Concentrations obtained from the analyses were performed by varying the chromatographic parameters by 10%.**

Chromatographic conditions	Mean 5 µg/mL <sup>-1</sup> n=3	Mean 15 µg/mL <sup>-1</sup> n=3	Mean 25 µg/mL <sup>-1</sup> n=3
0.9 ml min <sup>-1</sup>	98%	100%	102%
1.1 ml min <sup>-1</sup>	99%	98%	100%
27 °C	103%	101%	101%
33 °C	98%	104%	104%
27 mmol of TEA	102%	100%	100%
33 mmol of TEA	101%	101%	101%



**PARTE III:**  
**DESENVOLVIMENTO DOS FILMES POLIMÉRICOS**  
**CONTENDO QUITOSANA E SULFATO DE CONDROITINA**

MANUSCRITO II

**New antiglaucomatous agent for the treatment of open angle glaucoma:  
polymeric inserts for drug release and in vitro and in vivo study**

Artigo submetido à revista Journal of biomedical materials research part A

**New antiglaucomatous agent for the treatment of open angle glaucoma:  
polymeric inserts for drug release and in vitro and in vivo study**

Aina Liz A. Cesar<sup>1</sup>, Larissa Caldeira Navarro<sup>1</sup>, Rachel Oliveira Castilho<sup>1</sup>, Gisele Assis Castro Goulart<sup>1</sup>, Giselle Foureaux Heida<sup>2</sup>, Anderson J. Ferreira<sup>2</sup>, Sebastião Cronemberger<sup>3</sup>, André A. Gomes Faraco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

<sup>3</sup>Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

**Corresponding author:** André Augusto Gomes Faraco, PhD

**Address:** Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil.

**Phone:** +55 31 3409-6396; **Fax:** +55 31 3409-6961

**E-mail:** [andrefaraco@ufmg.br](mailto:andrefaraco@ufmg.br)

## 1 **Abstract**

2 A novel angiotensin-converting enzyme-2 inhibitor was tested for the treatment of  
3 primary open-angle glaucoma. This drug was incorporated into mucoadhesive  
4 polymeric inserts prepared using chitosan (Chs) and chondroitin sulfate (CS). The  
5 mucoadhesion is interesting to increase the contact time with the ocular surface  
6 resulting in improved bioavailability, also the inserts are made to act as prolonged  
7 release system. In the present work the inserts were prepared by the solvent casting  
8 method using different polymeric proportions (30:70, 50:50, 75:25 % w/w Chs:CS and  
9 100 % Chs). Thermal analysis and infrared spectroscopy both demonstrated physical  
10 dispersion of the active. The most promising was the 50:50 % Chs:CS who  
11 demonstrated that it was not fragile, has an *in vitro* release profile of up to 180  
12 minutes. In addition, it presented greater adhesion strength in relation to the other  
13 formulations. These physicochemical results corroborate the *in vivo* tests performed.  
14 In this sense, we also demonstrated that the treatment with 50:50 % insert can  
15 control the intraocular pressure (IOP) for at least three weeks and it does prevent  
16 damage on the retinal ganglion cells (RGC) compared to the placebo insert. It  
17 indicates thus that the new drug is quite viable and promising in glaucoma treatment.

18 **Keywords:** Glaucoma, Ocular insert, Angiotensin-Converting Enzyme 2, polymer,  
19 drug delivery.

## 20 1 Introduction

21 Worldwide, glaucoma affects about 70 million people, and the most common  
22 type is primary open-angle glaucoma (POAG), characterized by the accumulation of  
23 aqueous humor (AH) in the anterior chamber of the eye, due to lower drainage flow in  
24 relation to its production rate, this leads to increase the intraocular pressure (IOP) <sup>(1)-</sup>  
25 <sup>(3)</sup>. The elevated pressure causes apoptosis of retinal ganglion cells (RGC),  
26 progressive loss of axons and excavation of the optic nerve with consequent  
27 reduction of visual acuity and may progress to blindness <sup>(2)</sup>.

28 Since elevated IOP is the most important risk factor for glaucoma, there are  
29 several drugs that can control IOP by decreasing the production of the AH and/or  
30 increasing its drainage <sup>(4)</sup>. Prostaglandin analogues are currently the most common  
31 class of drugs used to decrease IOP (by increasing AH drainage); examples are  
32 bimatoprost and latanoprost. Other classes also used are beta-blockers,  
33 sympathomimetic agonists, carbonic anhydrase inhibitors,  $\beta$ -adrenergic antagonists,  
34 hyperosmotic agents and, more recently, angiotensin-converting enzyme (ACE)  
35 inhibitors <sup>(5)-(10)</sup>.

36 Eye drops consists on the first line therapy of ocular diseases such as  
37 glaucoma but it is has some problems due to its low bioavailability. Only 5% of the  
38 administered drug reaches the intraocular tissues and the remaining dose is drained  
39 via nasolacrimal duct causing undesirables side effects. Moreover, formulations often  
40 have high doses to reach the therapeutic concentration of the drug <sup>(11), (12)</sup>. The  
41 success of the glaucoma treatment with eye drops requires multiple daily instillations,  
42 patient acceptance (which is normally low) and ability to properly apply the eye drops  
43 <sup>(7),(13)</sup>.

44 Thus, formulations that may increase the efficiency of POAG treatment have  
45 been sought in order to decrease side effects, improve bioavailability and treatment  
46 adherence. Many formulations have been developed to circumvent these problems  
47 related to the treatment with eye drops. Examples of such systems are contact  
48 lenses <sup>(13)</sup>, liposomes <sup>(14),(15)</sup>, microspheres <sup>(16)</sup> and solid inserts <sup>(17)</sup>.

49 Recently, our research group has developed formulations for the release of  
50 antiglaucomatous drugs such as carbonic anhydrase inhibitors and prostaglandin  
51 inhibitors for the treatment of glaucoma <sup>(18)-(20)</sup>. Studies were carried out with the  
52 chitosan polymer e SC in the form of an ocular insert, allowing the treatment for a  
53 longer period than the eye drops. In addition to formulations, we have also worked  
54 with new antiglaucomatous substances.

55 Indeed, Foureaux *et al.* demonstrated that the increased in ACE-2 expression  
56 on the retina of rats with induced glaucoma is able to prevent the increase of IOP  
57 and, more important, it is also able to reduce the elevated IOP <sup>(18)</sup>. The substance  
58 used in this study was diminazene aceturate (DIZE - 1 mg/kg/day). This drug also  
59 presented a neuroprotective activity against apoptosis of RGC and was also tested in  
60 a formulation developed with chitosan <sup>(18),(20)</sup>.

61 In this work, we report the antiglaucomatous activity of a diminazene  
62 derivative, a benzamidine (4-Aminobenzamidine dihydrochloride, for short 4-AD). We  
63 developed and characterized a new polymeric device with chitosan and chondroitin  
64 sulfate. These polymeric formulations were proposed in order to obtain an insert with  
65 improved and tailored to resistance, adhesion strength and release profile for ocular  
66 delivering of active 4-AD. This is a contribution towards learning of new therapeutic  
67 alternatives to POAG treatment.

## 68 **2 Materials and methods**

### 69 **2.1 Material**

70 Chondroitin sulfate - CS (chondroitin 4-sulphate sodium salt), medium  
71 molecular weight Chitosan - Chs, Lissamine™ Green B and active substance (4-AD)  
72 were purchased from Sigma-Aldrich, (São Paulo, Brazil). All chemicals were reagent  
73 or analytical grade and were used as received without further purification.

### 74 **2.2 Preparation of inserts**

75 The inserts were prepared by the solvent casting method, as previously  
76 described <sup>(19),(21)</sup>. Initially it was prepared a 0.4 % w/v solution of 4-AD in 1 % w/v  
77 acetic acid, followed by addition of Lissamine™ Green B dye. Chondroitin sulfate  
78 (CS) were added in this solution and completely solubilized. Posteriorly chitosan  
79 (Chs) was slowly added to the preparation until the formation of a gel with different  
80 viscosity according to the polymeric ratio used (75:25, 50:50, 30:70 % w/w Chs:CS  
81 and 100 % Chs). Then the semi-solid system was stirred for 24h, and  
82 homogeneously spread over circular perforated silicone plates containing individual  
83 wells to ensure uniformity of size of the inserts. After complete drying, the inserts  
84 were stored protected from light and air humidity. Placebo inserts were also made  
85 according to the same procedure <sup>(19)</sup>.

### 86 **2.3 Swelling and surface pH**

87 The swelling studies were performed according to the methods described in the  
88 literature <sup>(22),(23)</sup>. Tests were performed with 0.5 cm diameter inserts; each one  
89 weighed and placed in 0.1 mL phosphate buffer saline (pH 7.4). The swelling was  
90 determined by the weight difference before and after the immersion has carried out at  
91 predetermined period of time (5, 10, 20, 40, 60, 90 min) according to the equation:

92 Swelling index =  $[(X_t - X_0) \times 100 / W_0]$ . In this equation,  $X_t$  is the film swollen weight  
93 after time ( $t$ ) and  $X_0$  is the original film weight at initial time. The surface pH was  
94 controlled using paper strips, which were placed in contact to the moisten surface  
95 (300 miliQ  $\mu$ L water) of the insert <sup>(24)</sup>.

## 96 **2.4 Mucoadhesion *in vitro***

97 Mucoadhesion tests were performed according to Hassan *et al.* (1990) <sup>(25)</sup>.  
98 Briefly, a 20 % w/v suspension of porcine stomach mucin type II (Sigma-Aldrich®)  
99 was prepared and reserved. A 340 mg of each formulation was solubilized in acetic  
100 acid 1 % w/v and the volume was completed to 20 mL with acetate buffer (pH 5.5).  
101 Next, three parts of the mucin suspension were mixed to one part of gel obtained by  
102 the film; the mixture was then stirred for 15 minutes. The prepared formulation  
103 viscosity was measured afterward. A Brookfield viscometer was used with Spindle 31  
104 and 3 RMP rotations (Brookfield Eng. Labs. Inc. Stoughton, USA) and the viscosities  
105 recorded after 3 minutes of shear force application, the mucoadhesion capacity ( $\eta_{ca}$ )  
106 was calculated according to the formula:  $\eta_{ma} = \eta_t - (\eta_{tm} + \eta_f)$ , where  $\eta_t$  is the  
107 viscosity of the solution containing mucin and gel,  $\eta_{tm}$  the viscosity of the solution  
108 containing only mucin,  $\eta_f$  the viscosity of the solution containing only the formulation  
109 and  $\eta_{ma}$  associated viscosity.

## 110 **2.5 Physical-Chemical Characterization**

111 Differential scanning calorimetry (DSC) was performed in Shimadzu DSC50  
112 under a heating rate of 10 °C/min. First, run 1, the samples were heated from -50 to  
113 200 °C. Then it was cooled under nitrogen atmosphere, and second run (run 2) was  
114 carried on and heated to 400 °C. Attenuated Total Reflectance Infrared spectroscopy  
115 (FTIR-ATR) was performed on a PerkinElmer FTIR Spectrometer (Spectrum One,



116 USA) with the samples in the solid state, the inserts were ground for analysis to be  
117 performed.

## 118 **2.6 Dissolution profile**

119 The *in vitro* release was conducted using the Franz cell system at 37 °C on a  
120 0.45 µm acetate cellulose membrane separating the donor medium from the acceptor  
121 (MF-Millipore). Each film was placed on the membrane and the receptor  
122 compartment was filled with phosphate saline buffer pH 7.4 (PBS), in order to place  
123 the analysis of dissolution profile. To do that, the acceptor medium was collected and  
124 replaced at predetermined time intervals (5, 10, 30, 60, 120, 180 min). In order to  
125 quantify the active we used a high performance liquid chromatography (HPLC). It  
126 was used a column C18, 125x4.6 mm (5 µm), the mobile phase consists of a  
127 phosphate buffer (pH 7.4, with 0.05 buffer strength) with triethylamine 30 mmol/L in  
128 isocratic flow of 1.0 mL/min at a constant temperature (30°C), the injection volume  
129 was 20 µL and the detection was performed at 290 nm (data not yet presented).

## 130 **2.7 IOP measurement and glaucoma induction**

131 *Wister* male rats (180 a 220g) were provided by CEBIO (Federal University of  
132 Minas Gerais). The animals were maintained in a controlled room (22–23 °C) with  
133 12–12 hour light-dark cycle with water and food *ad libitum*. The experiment was  
134 performed according to the protocol approved by the local Ethics Committee for  
135 Animal Experimentation of Federal University of Minas Gerais (Protocol 13/2018).

136 Glaucoma was induced by injection of 25µL of hyaluronic acid 1 %w/v into the  
137 anterior chamber of the right eye using a hypodermic needle (22 gauge) once a  
138 week, for four weeks, always on the same calendar day and hour. The left eye was  
139 used as control of the animal <sup>(28)</sup>. Before the procedure the animal was anesthetized

140 intramuscularly with ketamine (70 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and locally  
141 anesthetized by instillation of anesthetic eye drops (1% tetracaine hydrochloride and  
142 0.1% phenylephrine hydrochloride).

143 The IOP was measured using TonoPen XL tonometer (Mentor, Norwell, MA)  
144 and values were accepted with standard error less than 10%. It was performed one  
145 first measure to establish the baseline value of all groups (T<sub>-1</sub>). The insert with the  
146 active and placebo insert were placed in the eye of the animal in the second week  
147 (T<sub>0</sub>). In the subsequent weeks pressure was measured the day before the  
148 administration of hyaluronic acid (HA). In the final week the animals were euthanized  
149 and enucleated <sup>(28),(29)</sup>.

## 150 **2.8 Histological analysis**

151 Two sagittal cuts were made in the collected eyes and they were fixed for 24h,  
152 and dehydrated with ethanol 70%, then the sample was diaphanized in paraffin.  
153 Semi-serial 4µm sections were obtained using a microtome and the cuts were  
154 stained with hematoxylin (HE) and eosin. The optic nerve excavation was evaluated  
155 as well as the number of RGC, which were counted manually using a microscope  
156 (BX 53, Olympus, USA).

## 157 **2.9 Statistical Analysis**

158 Data are shown as the mean ± standard deviation. Statistical analysis was  
159 calculated employing the software GraphPad Prism, version 5.0 (GraphPad Software  
160 Inc., USA). It was evaluated by using one-way ANOVA followed by the by the  
161 Bonferroni post-test. When  $p < 0.05$ , the results were considered to be statistically  
162 significant.

### 163 3 Results

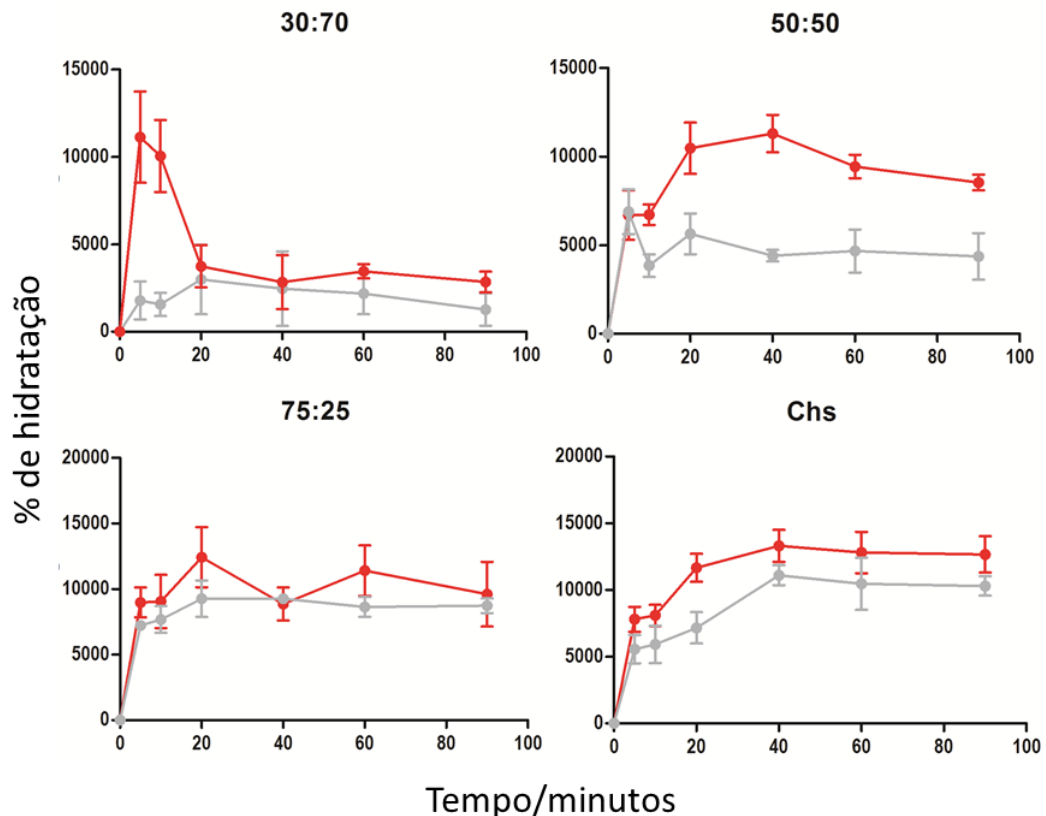
#### 164 Preparation of inserts

165 The inserts were successfully prepared for all polymer proportions (75:25,  
 166 50:50, 30:70 % w/w Chs: CS and 100 %Chs). All inserts have surface pH equivalent  
 167 to 5. The tests described below are intended to select the insert that best suits the  
 168 antiglaucomatous active (4-aminobenzamidine chloride – 4AD), and for this the  
 169 formulation must have swelling resistance, mucoadhesion capacity and a good  
 170 release profile. The 50:50 % w/w insert was the best mach, as describe below.

#### 171 *Characterization studies – surface pH and swelling*

172 The values found for the surface pH were equivalent to 5.0 for the film with the  
 173 polymer blends and 4.9 with pure chitosan.

**Figure 1: Swelling index. Black line represents the inserts with 4-AD and grey line represents placebo inserts: (a) insert 30:70, (b) insert 50:50, (c) insert 75:25 and (d) Chitosan insert. Values expressed as mean (n=3).**



174 In the swelling test, it was observed that the inserts undergo rapid hydration  
 175 with time varying according to the polymer ratio (Figure 1). The hydration is more  
 176 expressive for the inserts 30:70 and 75:25 (1.a and 1.c, respectively). The insert  
 177 30:70 hydration index dropping after a few minutes of exposition due its solubilization  
 178 during the study (Figure 1.a) in other words, this formulation is fragile due to the lack  
 179 of cohesion between the polymers chains in the proportion used <sup>(23)</sup>.

180 Due to this fragility the formulation 30:70 was not approved in the first test and  
 181 excluded of following tests and studies.

#### 182 *Evaluation of mucoadhesion in vitro*

183 The mucoadhesion tests were performed for formulations 50:50, 75:25 and  
 184 100 % Chs (the 30:70 formulation does not have a necessary physical integrity, as  
 185 reported above). The data obtained for the tested formulations using Brookfield  
 186 viscometer are displayed at **Table 1**. The mucoadhesion strength was calculated  
 187 according to Hassan *et al.* formula, previously described in the methods section.

**Table 1: Calculated mucoadhesion force F (n = 3). Where  $\eta_t$  is the viscosity of the solution containing mucin and gel,  $\eta_{tm}$  the viscosity of the solution containing only mucin,  $\eta_f$  the viscosity of the solution containing only the gel and  $\eta_{ma}$  the viscosity of system in cP.**

Medium	$\eta_t$	$\eta_{tm}$	$\eta_f$	$\eta_{ma}$	F
50:50+M (1:3)	1218,00	480	273	465	7
75:25+M (1:3)	1462,50	480	726	257	6
Ch+M (1:3)	1043,33	480	483	80	4

188 The insert Chs were discarded due to its low bioadhesive strength and this  
 189 first screen indicates the 50:50 and 75:25 formulations as the most promising. But the  
 190 75:25 formulation was also discarded because when compared to 50:50 insert it has

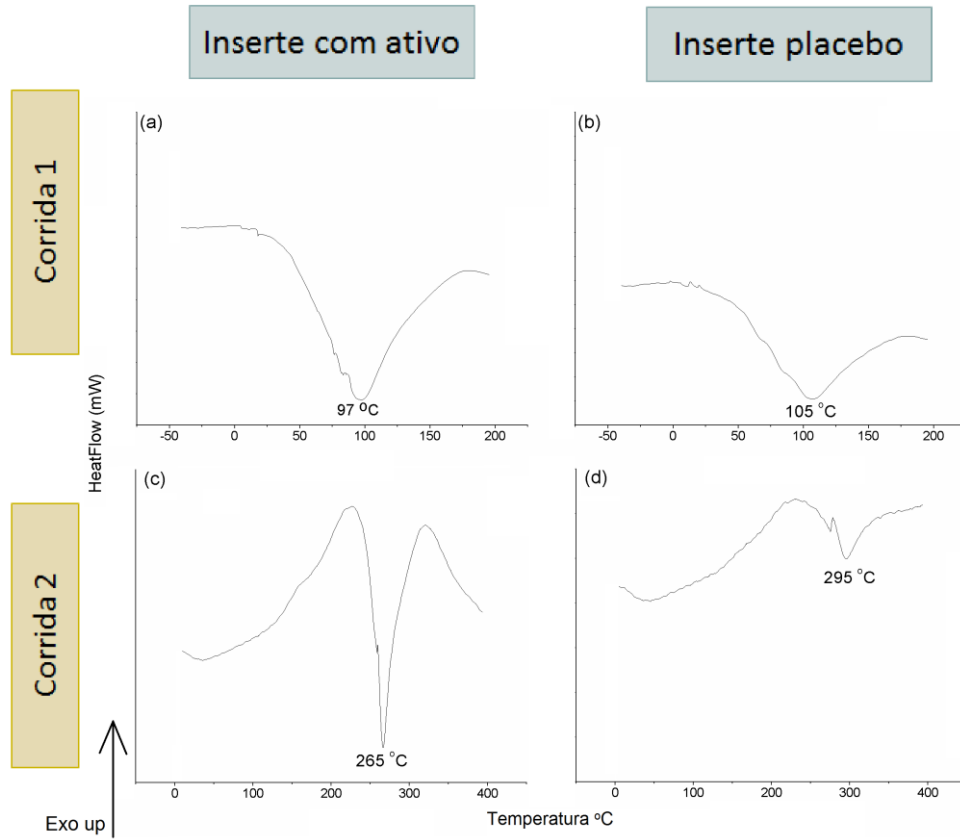
191 lower adhesion strength. In this way, the characterization continued with formula  
192 50:50.

### 193 Physical-Chemical Characterization

194 The analysis of the of the two DSC curves (Figure 2) shows the presence of  
195 an endothermic peaks near 100 °C , and on the second run an exothermic peak which  
196 increases significantly and shifts, by decreasing the temperature, in the presence of  
197 the 4-AD, suggesting its presence <sup>(21)</sup>.

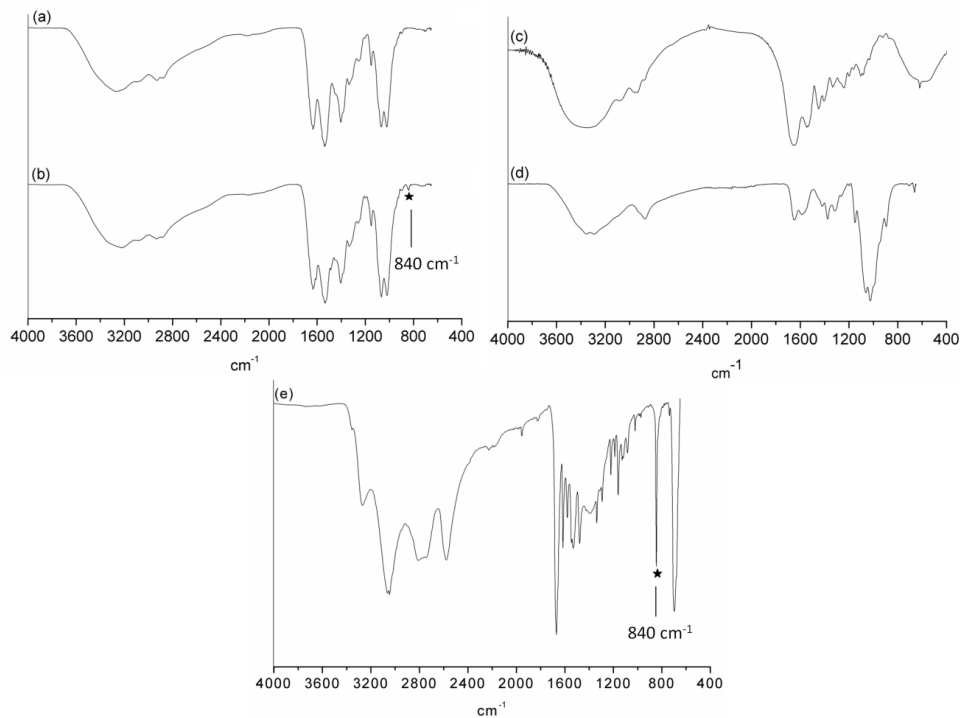
198 The FTIR-ATR spectra of the substances analyzed are shown in Figure 3. It is  
199 seen that there are no significant changes when comparing the placebo spectrum  
200 with the film containing the active (Fig. 3.a and 3.b). On the other hand, a  
201 characteristic band of the 4-AD substance in 840 cm<sup>-1</sup> is observed in Figure 3.b. In  
202 addition to this band, we observe those characteristics of the polymers that make up  
203 the insert, chondroitin sulfate and chitosan. Thus, it can be observed in the spectra of  
204 the placebo insert and insert with active substance (Fig. 3.a and 3.b), for example,  
205 bands at 3250 cm<sup>-1</sup> O-H deformation characteristics in both polymers; bands at 1640  
206 and 1540 cm<sup>-1</sup> for the amide carbonyl group (amide band I) and stretching the N-H  
207 bond observed on amides (amide band II). It is also possible to observe the system  
208 of bands between 1000 and 1100 cm<sup>-1</sup> characteristic of the chitosan polymer. In  
209 Figures 3.c and 3.d the spectra of the pure polymers that gave rise to the inserts are  
210 observed. As in Figures 3.a and 3.b, it was possible to observe the characteristic  
211 bands of each polymer highlighted above. In these two figures, it is also observed, a  
212 widening of the bands when compared to those observed in the inserts. Finally, in  
213 Figure 3.e, it is possible to observe, in addition to the characteristic bands of the  
214 drug, that in 840 cm<sup>-1</sup>, highlighted with a star to correlate the same with that observed  
215 in the spectrum of the insert with substance 4-AD.

**Figure 2: DSC analysis for the first (a) and second run (c) for 4-AD insert and first (b) and second run (d) for the placebo.**



216

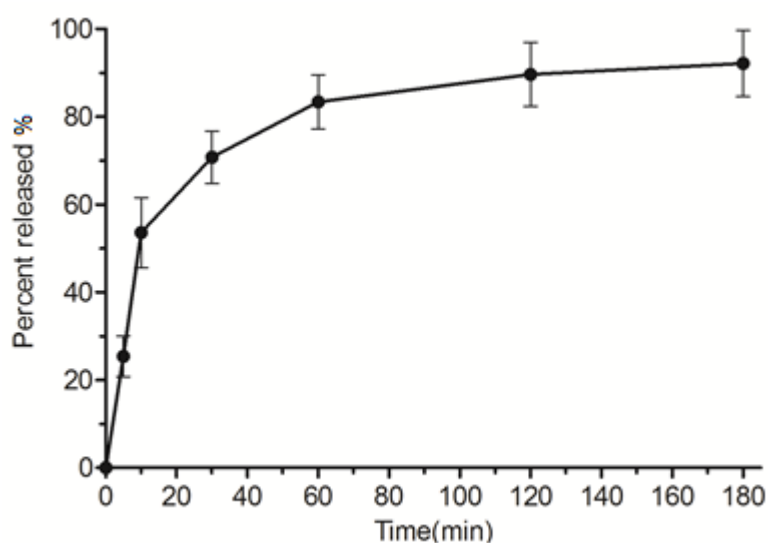
**Figure 3: FTIR-ATR spectra of inserts. On the left: (a) Placebo insert; (b) Insert with the active molecule 4-AD. On the right side: the spectra of the polymers (c) Chondroitin sulphate and (d) Chitosan. And below (e) the 4-AD spectra with the 840  $\text{cm}^{-1}$  band with a star indicating.**



217 Dissolution profile

218 The HPLC method developed was robust and efficient to detect 4-AD, the  
219 quantification range was 5 to 25 $\mu$ g/mL with standard solutions in mobile phase ( $y =$   
220  $1.18 \times 10^7 x - 819900$ ,  $R^2=0.993$ ,  $n=3$ ). It was used a column ACE<sup>®</sup> C18, 125x4.6  
221 mm (5  $\mu$ m), the mobile phase was phosphate buffer (pH 7.4) with triethylamine 30  
222 mmol/L in isocratic flow of 1.0 mL/min under constant temperature, the injection  
223 volume was 20 $\mu$ L and the detection was performed at 290nm. The graphical  
224 representation of release profile is shown in Figure 4. The formulation release at least  
225 50% of the active substance in the first 30 minutes.

**Figure 4: In vitro release of the insert 50:50 Chs:CS %. Values expressed as mean  $\pm$  SD, n=4.**

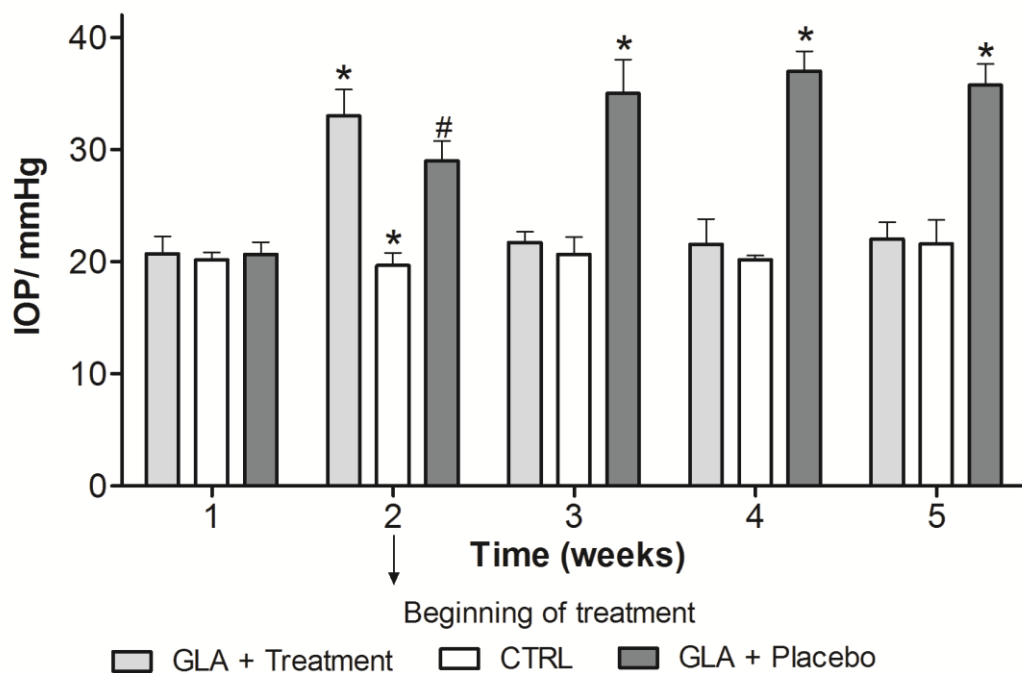
226 *In vivo studies*

227 The glaucoma model induced by hyaluronic acid injection in rats may be  
228 pathophysiologically compared to glaucoma that occurs in humans since their ocular  
229 structure similarity<sup>(30)</sup>. Figure 5 shows that in the first week, the baseline pressure did  
230 not show any difference between IOP values ( $p > 0.05$ ). After the induction, it was  
231 possible to observe that without the treatment the IOP remained elevated until the

232 end of the experiment, with statistical difference between the other groups (control  
 233 and treatment) under study. After the first week of treatment, the effect on pressure  
 234 reduction has already been observed, noting that the IOP value of the treated group  
 235 was equal to the baseline value observed in the control groups. Until the end of the  
 236 experiment it is possible to observe a significant difference in the group of animals  
 237 that received the insert with the active and in the placebo group.

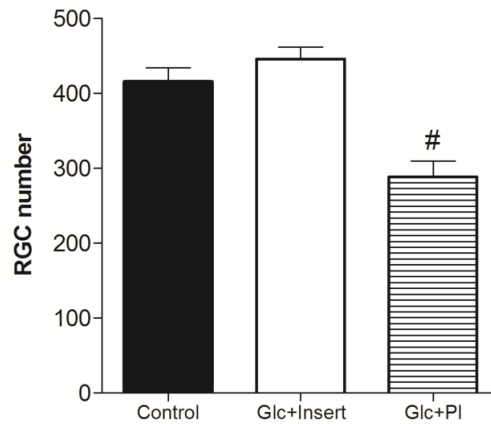
238 It was also performed the histological analysis as can be seen in Figure 6  
 239 RGC was counted in histological sections in order to evaluate the death of these  
 240 cells induced by glaucoma. There is no statistical difference between the control  
 241 group ( $416.0 \pm 43.5$  cells) and the glaucoma group treated with insert (Glc+Insert,  
 242  $445.8 \pm 35.3$  cells), but there is difference with the glaucoma group treated with  
 243 placebo insert (Glc+PI,  $288.3 \pm 52.4$  cells).

**Figure 5: Effects of 4-AD 50:50 inserts in the intraocular pressure (IOP, n=7 per group). It is possible to observe that 4-AD was able to reduce the IOP in glaucoma (GLA) group and placebo group (One-way ANOVA followed by the Bonferroni post test,  $p < 0.05$ ). Where (#) indicates a significant difference of the control group (CTRL) versus the treated group (GLA+Treatment) and the placebo insert (GLA+Placebo) group. And (\*) express the difference of the (GLA+Placebo) versus (CTRL) group and (GLA+Treatment) group.**



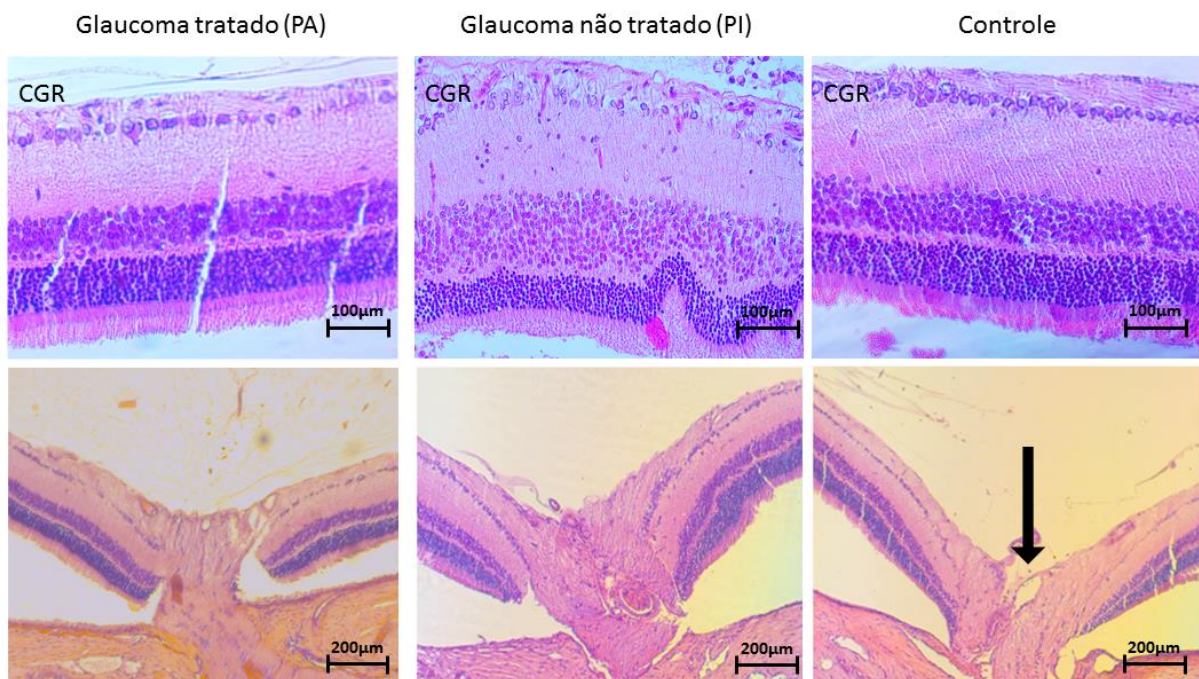


**Figure 6: Quantification of the RGC in the retinas of rats (n=7) and \*P < 0.001 versus control eyes (One-way ANOVA followed by the Bonferroni post test). Where (#) indicates a significant difference of the treated group with the placebo insert in relation to the control group and the group treated with the active.**



244

**Figure 7: Histological analysis of optic nerve excavation. In the figures in the top row, it is possible to observe the decrease in the RGC in the placebo group, while the number is similar in the treated and control group. In the photos in the figure below, the optical disks are represented, with the excavation marked by an arrow**



245

#### 246 4 Discussion

247 Chitosan is a polymer insoluble in basic aqueous medium. Thus, to form the  
 248 polymer films, it became necessary to solubilize in an aqueous solution of acetic acid.

249 The addition of chondroitin sulfate to the chitosan solution may lead to the  
250 protonation of the chitosan amino groups by the chondroitin acid groups, and it is  
251 possible to obtain a homogeneous solution and, after drying, formation of the  
252 polymer films <sup>(31)</sup>. The devices were removed from the silicone plate and sized by a  
253 5mm diameter punch knife, thus standardizing the size and weight (average weight of  
254 1.7mg) of each insert.

255 As stated in the results, different blends for the production of the films using  
256 different proportions of chondroitin and chitosan, as well as the pure chitosan film,  
257 were made. The different formulations were employed to guarantee the choice of the  
258 one that best behaved in the tests performed, that is, there could be no degradation  
259 and no low mucoadhesion strength.

#### 260 *Surface pH and swelling*

261 The determination of the surface pH of the inserts is important to verify if the  
262 values found are suitable to be applied by the ocular via. The acidic character of the  
263 samples is due to the use of acetic acid during the preparation of the films. The pH  
264 for ocular preparations can vary between 4 and 10 without ocular irritation, whereas  
265 for values outside this range, damage to the eye may occur <sup>(32)</sup>. In this way, the  
266 inserts presented a pH adequate for their ocular use. No significant difference was  
267 observed between the films containing chitosan and chondroitin and the film  
268 composed only of chitosan, all of them were within the safe range for ocular use.

269 In the swelling tests, it was observed that a rapid absorption of water occurs in  
270 all the inserts. The difference in absorption between the inserts with and without drug  
271 (placebo) can be justified by the presence of the substance 4-AD, which has groups  
272 capable of making hydrogen bonds. The more sites for hydrogen bond formation  
273 makes it has a greater chance of binding with water molecules and consequently

274 increases the swelling index <sup>(19),(21),(33)</sup>. This rapid increase in water inflow, mainly  
275 observed in the insert with the ratio 30:70 w/w (Chs: CS), may have been the cause  
276 for its disintegration during the test. This fact led to the failure of subsequent tests for  
277 this insert.

#### 278 *Evaluation of mucoadhesion in vitro*

279 The adherence to the ocular surface is extremely relevant for the inserts since  
280 the contact time of the formulation with the ocular mucosa can consequently increase  
281 the bioavailability <sup>(21)</sup>. The method described by Hassan *et al.* (1990) <sup>(25)</sup> is simple and  
282 allows the mucoadhesion force to be evaluated based on the observed  
283 mucin/formulation mixtures viscosities.

284 The polymer matrix and mucin (glycoprotein) network present in the mucosal  
285 layer interacts by interlacing their chains mediated by electrostatic (dipole-dipole  
286 bonds and induced dipole) and hydrogen bonds. These interactions are responsible  
287 for the changes observed on the solution viscosity and it makes possible the  
288 proportional relationship between the shear force and the adhesion force <sup>(25)</sup>. We find  
289 that the inserts with the greatest adhesion strength was the 50:50 followed by the  
290 75:25 insert and finally the pure chitosan insert. The first two formulations behave as  
291 expected by the swelling test, has a good bioadhesive potential, due to the presence  
292 of the negative charges present in the molecule of CS. These negative charges,  
293 formed by the presence of the ionic pair with the chitosan and also by the hydration  
294 caused by the buffer solution (basic pH) allow, as well as chitosan with positive  
295 charge, a better interaction with the mucin. Although the chitosan inserts presents  
296 great potential of hydration, its amino groups are not fully protonated in the buffer  
297 solution pH, therefore it does not interact adequately with the mucin, which reflects in  
298 its low bioadhesive force <sup>(23)</sup>.

299 Analogously to that described above, and according to Table 1, it was chosen to  
300 continue the tests with the 50:50 w/w CS:Chs insert because it showed better  
301 mucoadhesion force (F).

### 302 *Physical-Chemical Characterization*

303 Thermal analysis by DSC allows the verification of possible drug-polymer  
304 interactions as well as thermal events related to the crystalline structure of the  
305 formulation components (eg fusion) as well as those events related to their thermal  
306 integrity (decomposition).

307 In the thermograms of Figure 2 two runs were made for each insert: the first  
308 for the insert with drug (Fig 2a e c) and the second for insert placebo (Fig 2b e d). In  
309 this case, it was chosen to perform the thermogram for the 50:50 w/w Chs:CS in  
310 function of the previously highlighted properties, such as hydration and  
311 mucoadhesion.

312 One can observe the first two thermograms corresponding to the first run to  
313 insert with drug and insert without drug, placebo (Figure 2a and 2b, respectively). In  
314 these first two thermograms an endothermic peak is observed around 100 °C  
315 corresponding to the evaporation of residual water present in the inserts and are in  
316 agreement with those described in the literature <sup>(19),(34)</sup>.

317 It can be observed in the first two thermograms, corresponding to the first run  
318 to insert with drug and to placebo insert (Figure 2 a and 2 b, respectively), an  
319 endothermic peak around 100 °C. This result corresponds to the evaporation of  
320 residual water present in the inserts and it is in agreement with the data described in  
321 the literature for the loss of water in hydrophilic films <sup>(19)(34)</sup>.

322 Figures 2c and 2d show the runs made on the inserts after the removal of  
323 residual water. In these figures can be observed an exothermic peak related to the

324 decomposition of the polymer matrix. In Figure 2c, to insert it with the drug 4-AD, this  
325 peak was detected at 265 °C and in Figure 2d, in the placebo insert, this same peak  
326 was detected at 295 °C. These data allow us to infer that the presence of the drug in  
327 the insert exerts a type of plasticizing effect, distancing the polymer chains and  
328 consequently facilitating their decomposition process at lower temperature.  
329 Furthermore, it was not possible to observe the melting point of the 4-AD drug  
330 demonstrating that it is molecularly dispersed in the insert. These data corroborate  
331 with those described for the swelling index where at a higher inflow of water on the  
332 insert with drug, when compared with the respective placebos inserts.

333 Thus, thermal analysis of the samples shows that the film formed between the  
334 compounds is thermally stable, having a degradation temperature above 250 °C, and  
335 can therefore be sterilized at high temperatures. This fact is of importance for ocular  
336 preparations that should be sterile.

337 Characterizations by infrared spectrometry were made with the polymer films  
338 with and without the 4-AD substance. The analysis of Figure 3 allows to evaluate that  
339 some significant changes in the polymeric film composed of chitosan and chondroitin  
340 after the addition of Chemical compound 4-AD occurred in the characteristic region of  
341 hydroxyl, amino and carbonyl stretches. A displacement and enlargement of the  
342 carbonyl band of 1651 (chitosan) and 1627 of chondroitin and of 1670 of the  
343 substance 4-AD for a broad band at 1634  $\text{cm}^{-1}$  is observed. This fact suggests a  
344 possible interaction between the drug and the polymers.

345 Therefore, it supports the interpretation that 4-AD is incorporated into system  
346 and not chemically bound to the polymers (21). An additional evidence for this  
347 conclusion is the observation of the narrow and intense 835  $\text{cm}^{-1}$  highlighted by an  
348 star (Figure 3), like observed at the IR spectrum of 4-AD, Fig. 3e. This line, although

349 tiny and weak is still observed, and it is characteristic of a para-disubstituted AA'BB  
350 'system of the aromatic ring of the substance 4-AD, being compatible with data of the  
351 literature <sup>(35)</sup>.

### 352 *Dissolution profile*

353 In vitro release tests are very important tools in drug development, both in  
354 development and in quality control, since it ensures that the drug, present in the  
355 pharmaceutical form, is quantitatively determined and can relate this release with the  
356 time.

357 Figure 4 demonstrates the rapid release of the drug from the tested inserts.  
358 This profile could be explained on the basis of the charges formed at pH 7.9 (PBS  
359 buffer), the sulfate and carboxylic groups of CS are ionized, which facilitates  
360 repulsion between the charges of the polymer film. This allows the structure to  
361 acquire certain mobility and thus the polymer network is expanded, which allows a  
362 greater degree of swelling and consequently greater ease of release <sup>(36)</sup>. This test  
363 also finds support in previous tests demonstrating rapid release of the drug from the  
364 polymer matrix.

### 365 *In vivo studies*

366 In Figure 5, there is the demonstration of the experiment performed as well as  
367 the evolution of the treatment with the groups tested in this work. After the first week  
368 of the experiment, the animals are induced with glaucoma (with the exception of the  
369 control group) and it is possible to observe in the graph the elevation of the IOP. After  
370 the second week there is the introduction of the inserts containing substance 4-AD in  
371 the eyes with high IOP. At the beginning of the third week, there is a decrease in the  
372 IOP reduction in these animals treated with the insert containing the 4-AD drug (the

373 IOP was reduced from 33 mmHg to approximately 21 mmHg). This reduction was not  
374 observed in animals treated with the placebo insert. It is highlighted in this  
375 experiment that the insert is applied only once. There is no dose replacement during  
376 the experiment. The result found in the third week was repeated for the subsequent  
377 two weeks (4th and 5th weeks). In this case, the action of a single insert was  
378 maintained for three uninterrupted weeks.

379         This result is very important when we speak of a disease in which one of the  
380 causes of its complication (blindness) is exacerbating the lack of application of the  
381 eye drops.

382         Blindness caused by glaucoma is associated with a reduction in the number of  
383 RGC. This reduction comes from elevated IOP leading to a severe loss of neural  
384 fibers with consequent enlargement of the optic nerve excavation.

385         To check if the 4-AD substance could also decrease the deterioration of the  
386 optic nerve, we did the retinal ganglion cell count and checked the optic nerve  
387 excavation (Figure 6). It is possible to observe in Figure 6a difference (statistically  
388 significant) between the number of cells in the treated group (insert loaded with 4-AD  
389 substance) and the number of cells in the glaucoma group treated with placebo insert  
390 (PI). In Figure 6b (upper frame), it is possible to observe a smaller excavation in the  
391 head of the optic nerve in the group treated with the substance 4-AD. On the other  
392 hand, in Figure 6b (lower frame) it is possible to observe a greater excavation in the  
393 head of the optic nerve.

394         These data indicate that the extended release device promoted  
395 neuroprotection by preventing the death of ganglion cells. The reduction in RGC  
396 caused by elevation of intraocular pressure led to loss of neuronal fibers with a

397 consequent optic nerve excavation. It is partially possible to reverse these effects by  
398 the treatment with 4-AD.

399         These ganglion cell protection data are consistent with the data described by  
400 our group for drugs used in the treatment of glaucoma such as prostaglandin  
401 analogues (bimatoprost), for example <sup>(19)</sup>.

## 402 **Conclusion**

403 The insert proposed in the present work is as a polymeric formulation of Chs, CS and  
404 active 4-aminobenzamidine chloride. Out the various formulations tested, the 50:50  
405 %Chs:CS reveals to be a promising due to its hydration potential, surface pH,  
406 extended release capacity and bioadhesive force. Tests *in vivo* demonstrated that it  
407 was capable to keep the IOP value reduced for the three weeks period of studied  
408 time. This formulation with the active 4-AD give us good motivation and solid  
409 perspectives for a new use of this substance as an antiglaucomatous agent.

## 410 **Acknowledgment**

411         This work was supported by PRPq-UFMG, CNPq (for Development  
412 Technologic fellowship - 310347/2014-9), and FAPEMIG (Brazil). The author would  
413 like to thank CAPES for the scholarship (CAPES-Brasília/Brazil).



## REFERENCES

1. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*. 2006; 90(3):262–7.
2. Weinreb RN, Leung CK, Crowston JG, Medeiros FA, Friedman DS, Wiggs JL, Martin KR. Primary open-angle glaucoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2(16067):1-19.
3. McMonnies CW. Glaucoma history and risk factors. *J Optom*. 2017; 10(2):71–78.
4. Henderer JD, Rapuano CJ. Farmacologia ocular. In: Brunton, LL, editor. *Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012. p. 1821.
5. Freitas SM, Guedes RAP, Guedes VMP, Paletta LAC, Gravina DM, Chauobah A. Custos não médicos diretos e indiretos relacionados ao glaucoma primário de ângulo aberto no Brasil. *Rev. bras. oftalmol*. 2019; 78(3):166-169.
6. Brandt JD, Sall K, DuBiner H, Benza R, Alster Y, Walker G, Semba CP, Collaborators. Six-Month Intraocular Pressure Reduction with a Topical Bimatoprost Ocular Insert: Results of a Phase II Randomized Controlled Study. *Ophthalmology*. 2016; 123(8):1685-1694.
7. Weinreb RN, Khaw PT. Primary open-angle glaucoma. *Lancet*. 2004; 363(9422):1711-20.
8. Heidelbaugh JJ. Primary Care Ophthalmology, An Issue of Primary Care: Clinics in Office Practice. Saintt Louis: Elsevier Health Sciences. 2015; 42(3).

9. da Silva Oliveira GL, de Freitas RM. Diminazene aceturate-An antiparasitic drug of antiquity: Advances in pharmacology & therapeutics. *Pharmacol Res.* 2015; 102:138-57.
10. Holappa M, Vapaatalo H, Vaajanen A. Many Faces of Renin-angiotensin System - Focus on Eye. *Open Ophthalmol J.* 2017; 11:122-142.
11. Sigurdsson HH, Stefánsson E, Gudmundsdóttir E, Eysteinnsson T, Thorsteinsdóttir M, Loftsson T. Cyclodextrin formulation of dorzolamide and its distribution in the eye after topical administration. *J Control Release.* 2005; 102(1):255-62
12. Järvinen K, Tomi J, Urtti A. Ocular absorption following topical delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1995; 16(1):3-19.
13. Peng CC, Burke MT, Carbia BE, Plummer C, Chauhan A. Extended drug delivery by contact lenses for glaucoma therapy. *J Control Release.* 2012; 162(1):152-8.
14. Abu Hashim II, El-Dahan MS, Yusif RM, Abd-Elgawad AE, Arima H. Potential use of niosomal hydrogel as an ocular delivery system for atenolol. *Biol Pharm Bull.* 2014; 37(4):541-51.
15. Pisal PB, Joshi MA, Padamwar MN, Patil SS, Pokharkar VB. Probing influence of methodological variation on active loading of acetazolamide into nanoliposomes: biophysical, in vitro, ex vivo, in vivo and rheological investigation. *Int J Pharm.* 2014; 461(1-2):82-8.
16. Pek YS, Wu H, Mohamed ST, Ying JY. Long-Term Subconjunctival Delivery of Brimonidine Tartrate for Glaucoma Treatment Using a Microspheres/Carrier System. *Adv Healthc Mater.* 2016; 5(21):2823-2831.

17. Shivakumar HN, Desai BG, Subhash PG, Ashok P, Hulakoti B. Design of ocular inserts of brimonidine tartrate by response surface methodology. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2007; 17(6):421-430.
18. Foureaux G, Nogueira JC, Nogueira BS, Fulgêncio GO, Menezes GB, Fernandes SO, Cardoso VN, Fernandes RS, Oliveira GP, França JR, Faraco AA, Raizada MK, Ferreira AJ. Antiglaucomatous effects of the activation of intrinsic Angiotensin-converting enzyme 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54(6):4296-306.
19. França JR, Foureaux G, Fuscaldi LL, Ribeiro TG, Rodrigues LB, Bravo R, Castilho RO, Yoshida MI, Cardoso VN, Fernandes SO, Cronemberger S, Ferreira AJ, Faraco AA. Bimatoprost-loaded ocular inserts as sustained release drug delivery systems for glaucoma treatment: in vitro and in vivo evaluation. *PLoS One*. 2014; 9(4):95461.
20. Foureaux G, Franca JR, Nogueira JC, Fulgêncio GO, Ribeiro TG, Castilho RO, Yoshida MI, Fuscaldi LL, Fernandes SO, Cardoso VN, Cronemberger S, Faraco AA, Ferreira AJ. Ocular inserts for sustained release of the angiotensin-converting enzyme 2 activator, diminazene aceturate, to treat glaucoma in rats. *PLoS One*. 2015; 10(7):0133149.
21. Rodrigues LB, Leite HF, Yoshida MI, Saliba JB, Cunha AS, Faraco AA. In vitro release and characterization of chitosan films as dexamethasone carrier. *Int J Pharm*. 2009; 368(1-2):1-6.
22. Eroğlu H, Sargon MF, Oner L. Chitosan formulations for steroid delivery: effect of formulation variables on in vitro characteristics. *Drug Dev. Ind. Pharm*. 2007; 33(3):265–271.

23. Tejada G, Barrera MG, Piccirilli GN, Sortino M, Frattini A, Salomón CJ, Lamas MC, Leonardi D. Development and Evaluation of Buccal Films Based on Chitosan for the Potential Treatment of Oral Candidiasis. *AAPS PharmSciTech*. 2017; 18(4):936-946.
24. Khurana G, Arora S, Pawar PK. Ocular insert for sustained delivery of gatifloxacin sesquihydrate: Preparation and evaluations. *Int J Pharm Investig*. 2012; 2(2):70-7.
25. Hassan EE, Gallo JM. A simple rheological method for the in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength. *Pharm Res*. 1990; 7(5):491-5.
26. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. *Practical HPLC method development*. 3rd ed. Wiley: New York, 2012.
27. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, 24 July 2017. Brasília, Brasil. 2017.
28. Moreno MC, Marcos HJ, Oscar Croxatto J, Sande PH, Campanelli J, Jaliffa CO, Benozzi J, Rosenstein RE. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. *Exp Eye Res*. 2005; 81(1):71–80.
29. Pirhan D, Yüksel N, Emre E, Cengiz A, Kürşat Yıldız D. Riluzole- and Resveratrol-Induced Delay of Retinal Ganglion Cell Death in an Experimental Model of Glaucoma. *Curr Eye Res*. 2016; 41(1):59-69
30. Johnson TV, Tomarev SI. Rodent models of glaucoma. *Brain Research Bulletin*. 2010; 81(2-3):349-58.
31. Yuan NY, Tsai RY, Ho MH, Wang DM, Lai JY, Hsieh HJ. Fabrication and characterization of chondroitin sulfate-modified chitosan membranes for biomedical applications. *Desalination*. 2008 234(1–3):166-174.

32. Baranowski P, Karolewicz B, Gajda M, Pluta J. Ophthalmic Drug Dosage Forms: Characterisation and Research Methods. *The Scientific World Journal*. 2014; (7):861904.
33. Kaur G, Rana V, Jain S, Tiwary AK. Colon Delivery of Budesonide: Evaluation of Chitosan–Chondroitin Sulfate Interpolymer Complex. *AAPS PharmSciTech*. 2010; 11(1):36–45.
34. Khalid MN, Agnely F, Yagoubi N, Grossiord JL, Couarraze G. Water state characterization, swelling behavior, thermal and mechanical properties of chitosan based networks. *Eur J Pharm Sci*. 2002; 15(5):425-32.
35. Silverstein RM, Webster FX. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6rd ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos, 2000.
36. Fajardo AR, Lopes LC, Caleare AO, Britta EA, Nakamura CV, Rubira AF, Muniz EC. Silver sulfadiazine loaded chitosan/chondroitin sulfate films for a potential wound dressing application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013, 33(2):588-95

## **PARTE IV**

### DISCUSSÃO GERAL

## 4 DISCUSSÃO GERAL

Como visto, a elevação da PIO é um dos fatores de risco para o glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) e o único clinicamente controlável (WEINREB e KHAW, 2004). Os inibidores da enzima conversora da angiotensina 2 (ECA 2) são uma nova proposta como agentes antiglaucomatosos (da SILVA *et al.*, 2015). Uma molécula que está sendo estudada com tal ação é o hidrocloreto de 4-aminobenzamida (4-AD). Sua atividade foi proposta a partir da observação da eficácia do acetato de diminazeno como agente antiglaucomatoso, uma vez que o 4-AD é um de seus produtos de degradação (FOUREAUX *et al.*, 2013; FOUREAUX *et al.*, 2015).

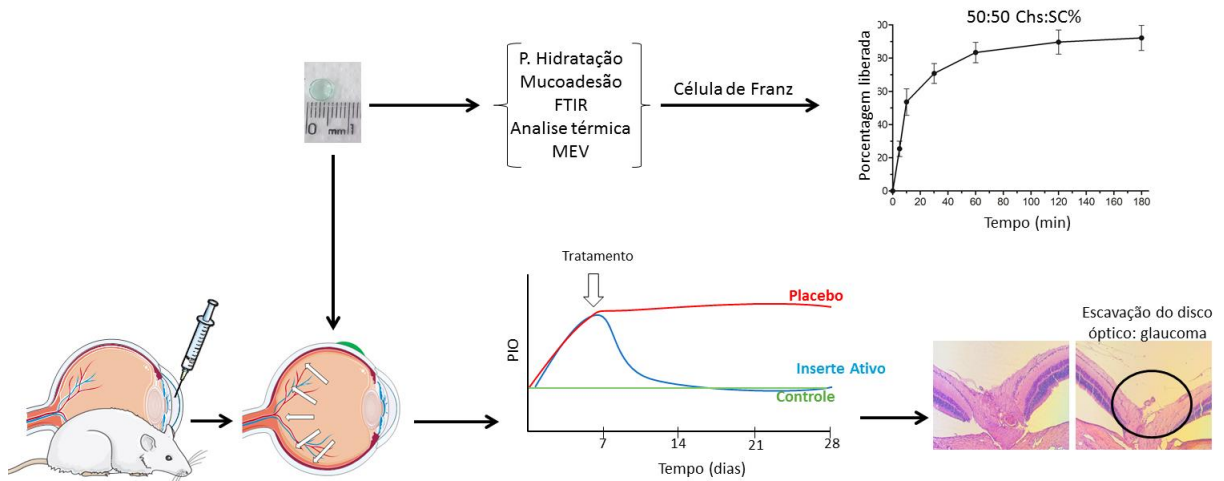
Neste trabalho, algumas perguntas foram levantadas para verificar se seria possível ou não a obtenção de novos dispositivos poliméricos para veiculação da substância 4-AD:

- 1 – Seria a substância 4-AD passível de atuar na redução da pressão intraocular em ratos com glaucoma induzido?
- 2 – Esta substância poderia ser veiculada em insertes semelhantes aos já sintetizados por nosso grupo?
- 3 – Seria possível elaborar um inserte mais fácil de ser identificado quando em meio biológico?
- 4 – O inserte a ser desenvolvido poderia ter uma melhor mucoadesão do que os anteriormente desenvolvidos por nosso grupo?

Diante destes questionamentos, neste trabalho a molécula 4-AD foi proposta para ser veiculada em diferentes formulações de insertes oftálmicos contendo quitosana (ChS) e sulfato de condroitina (SC). Com a utilização da combinação de polímeros aniônicos e catiônicos seria possível melhorar a ação do sistema, conforme também relatado por Farjado e colaboradores (2013). Neste caso haveria um efeito sinérgico entre os polímeros o que promoveria um aumento da mucoadesão do sistema e conseqüentemente a eficiência do tratamento do GPAA. Isso porque a mucoadesão permite um aumento no tempo de contato com o local de ação, promovendo o aumento da biodisponibilidade e a diminuição dos efeitos adversos (ABURAHMA e

MAHMOUD, 2011; AWWAD *et al.*, 2017). O resumo dos experimentos realizados na segunda parte deste trabalho e descritos no “Manuscrito II” está na Figura 11.

**Figura 12: Esquema dos estudos realizados com os insertes oftálmicos no Manuscrito II**



À matriz polimérica também se adicionou o corante Lissamina™ verde B (LV) além do ativo 4-AD. Esse corante foi utilizado para facilitar a visualização do dispositivo oftálmico no globo ocular, o que era relativamente difícil no dispositivo de quitosana preparado por França e colaboradores (Figura 12) para a liberação de bimatoprost (FRANÇA *et al.*, 2014.a). A LV foi o corante de escolha para a formulação apresentada neste trabalho, pois além de possuir baixa toxicidade, apresenta excelente perfil de segurança e é bem aceita por pacientes (HAMRAH *et al.*, 2011). Chan e colaboradores (2016) utilizaram outro corante em seu filme e com uma função diferente da utilizada no presente trabalho, foi utilizado o azul de metileno como marcador para o experimento de solubilização do dispositivo, além disso, no trabalho de Chan o corante também possuía a função de tratar células danificadas presentes na superfície do endotélio da córnea (CHAN *et al.*, 2016).

**Figura 13: Inserte de quitosana para liberação prolongada de bimatoprost colocado no fórnice conjuntival superior do olho direito**



Fonte: CRONEMBERGER, *et al.*, 2017.

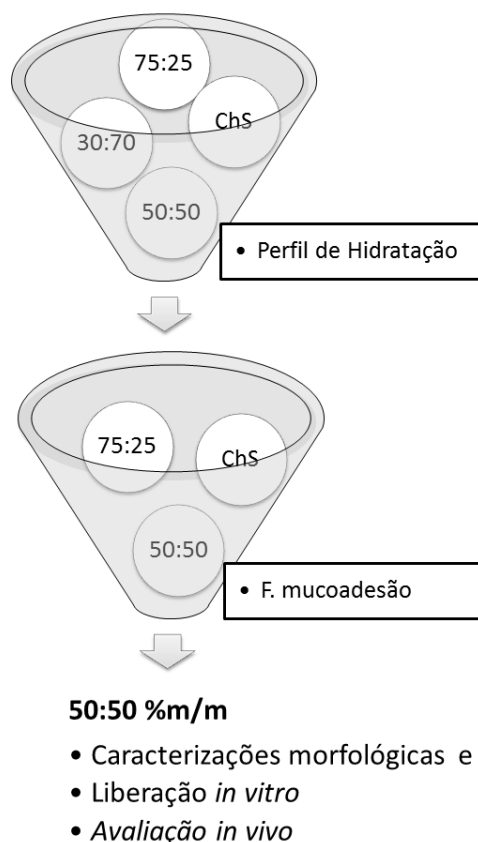


Para quantificar o ativo 4-AD foi necessário desenvolver e validar um método analítico conforme legislação vigente, “Manuscrito I” (ANVISA, 2017). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) foi o método de escolha por ser mais simples e eficaz na detecção do composto de interesse. Comparado com o método descrito por Atsriku e colaboradores (2002), que utiliza o espectrofotômetro de massas acoplado ao HPLC para quantificar o diminazeno e seu produto de degradação 4-AD, o método desenvolvido neste trabalho é mais simples e barato, além de ser eficaz (SNYDER *et al.*, 1997; HARRIS, 2012).

Foram determinados os seguintes parâmetros: uso de coluna ACE<sup>®</sup> C18 (125x4,6 mm; com partículas de 5µm). Fase móvel constituída por tampão fosfato pH 7,4 e trietilamina a 30 mmol/L (fluxo isocrático de 1,0 ml/min, 30 °C). O volume de injeção padronizado foi de 20 µL e o comprimento de onda utilizado para a detecção da molécula de 4-AD foi de 290 nm. Os parâmetros cromatográficos também estavam de acordo com o preconizado pela legislação e de acordo com a literatura internacional: fator de cauda 1,2(<1,5), pratos teóricos 5034 (>3000), desvio padrão entre as replicatas menor que 2%. Foi obtida uma curva linear no intervalo de 5 a 25 µg/mL com coeficiente de regressão ( $r^2$ ) maior que 0,99 (ANVISA, 2017; ICH, 2005).

Após a validação do método de quantificação do ativo prosseguiu-se com os estudos a fim de caracterizar as formulações. Foram testados os insertes preparados nas proporções 30:70, 50:50, 75:25 %m/m de ChS:SC e 100% de ChS. Conforme foram realizadas as caracterizações físico-químicas adotou-se o critério de exclusão após cada teste, para aquelas que não atendiam os parâmetros esperados (conforme descrito no Manuscrito II e na discussão a seguir). Neste caso, dois testes foram destacados: o teste de intumescimento (hidratação) e o teste de mucoadesão. Assim, ao final destas caracterizações, a formulação que apresentou maior resistência física e melhor potencial bioadesivo foi escolhida para dar continuidade ao trabalho. A formulação que atendeu a estes critérios foi a que continha 50:50 %m/m de ChS:SC Após a definição do objeto do trabalho, novas caracterizações físico-químicas foram realizadas para avaliar a liberação *in vitro* da substância do inserte e a avaliação da atividade *in vivo*. As etapas desse processo de exclusão e seleção estão sintetizadas na Figura 13.

**Figura 14: Esquema dos experimentos realizados no Manuscrito II**



Todas as formulações de insertes foram preparadas com sucesso conforme o método de evaporação de solvente. O valor de pH de superfície encontrado para cada formulação testada não diferiu significativamente e foi equivalente a cinco, tanto para as formulações placebo quanto para as formulações que continham o ativo. Apesar de ser ligeiramente ácido quando comparado ao pH do fluido lacrimal (7,4), a formulação não é irritante para a mucosa ocular, que é capaz de resistir a faixa de pH entre 4 a 8. Isso significa que o dispositivo não seria capaz de provocar irritação química nos olhos e, portanto, não irá estimular a produção lacrimal excessiva o que drenaria a dose liberada diminuindo o tempo de atividade do inserte (BARANOWSKI *et al.*, 2014; SCHUERER *et al.*, 2017).

No teste de potencial de hidratação (swelling) observou-se que todas as formulações são higroscópicas e sofreram um rápido intumescimento (Figura 1, Manuscrito II, pág. 53). O inserte 30:70, no entanto, sofreu desintegração após 5 minutos do início do teste, o mesmo fenômeno foi observado por Tejada e colaboradores, que prepararam um filme utilizando quitosana com pectina ou hidroxipropilmetilcelulose

para ser utilizada como sistema de liberação na cavidade oral (2017). Segundo esses autores a perda da integridade está relacionada à grande concentração de polímeros aniônicos na formulação (pectina ou hidroxipropilmetilcelulose), o que aumenta a interação com o meio aquoso do experimento (TEJADA *et al.*, 2017). Isso está de acordo com a composição da formulação 30:70, que possui maior concentração de SC, um polímero aniônico. Dessa forma podemos concluir que essa formulação não possui estabilidade física e, portanto, foi descartada para novos testes.

Após a seleção das melhores formulações em função do teste de hidratação, foi realizada a previsão da força de mucoadesão. Para isso foi utilizada uma suspensão de mucina tipo II de estômago de porco (Sigma) com a finalidade de mimetizar a mucina presente no epitélio mucoso (KESAVAN *et al.*, 2013). Conforme dito anteriormente, espera-se uma maior biodisponibilidade das formulações que tenham maior capacidade de interagir com a mucosa ocular (HENDERER e RAPUANO, 2012).

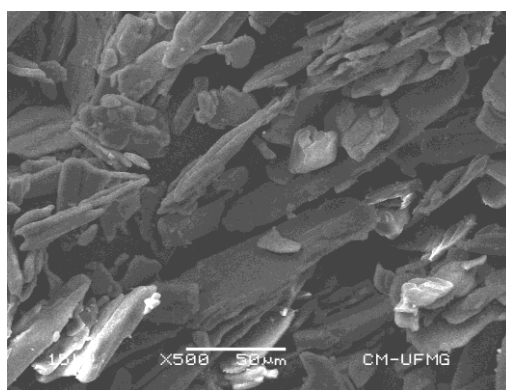
A mucina é um polímero natural que possui uma cadeia de glicoproteínas lineares e flexíveis. A viscosidade de uma dispersão de mucina é proporcional à sua resistência mecânica ao fluxo exercido pelo giro do viscosímetro (HASSAN e GALLO, 1990). A resistência ocorre pelo emaranhamento físico e interações não covalentes (eletrostática e ligações de hidrogênio) entre as cadeias poliméricas da substância testada e da própria mucina. Assim as interações mucina-polímero podem ser determinadas como função da viscosidade, uma vez que a viscosidade da mucina é modificada devido a interações com as cadeias poliméricas. Kesavan, em seu experimento realizado com microemulsão de quitosana para liberação de dexametasona para o tratamento da uveíte, explica que a mucina se comporta como um polieletrólito aniônico que interage por meio de ligações de hidrogênio ou interações iônicas entre os grupos amino carregados positivamente de quitosana e resíduos de mucina com carga negativa, o que está de acordo com a explicação proposta neste trabalho (KESAVAN *et al.*, 2013).

A partir das viscosidades obtidas no viscosímetro de Brookfield para as formulações 50:50, 75:25 %ChS:SC e ChS 100%, foi realizado o cálculo de força "F" de mucoadesão (Tabela 1, Manuscrito II, página 67). A formulação 30:70% ChS:SC foi

excluída dos testes uma vez que não demonstrou integridade física como visto no item anterior. Foi observado que o inserte que apresentou maior potencial mucoadesivo foi o 50:50% ChS:SC, sendo, portanto a formulação escolhida para a realização das demais caracterizações físico-químicas.

A avaliação morfológica foi feita em seguida utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A microscopia do pó ativo 4-AD apresentou formas com cerca de 50  $\mu\text{m}$  (Figura 14).

**Figura 15: Análise por MEV do ativo 4-AD**



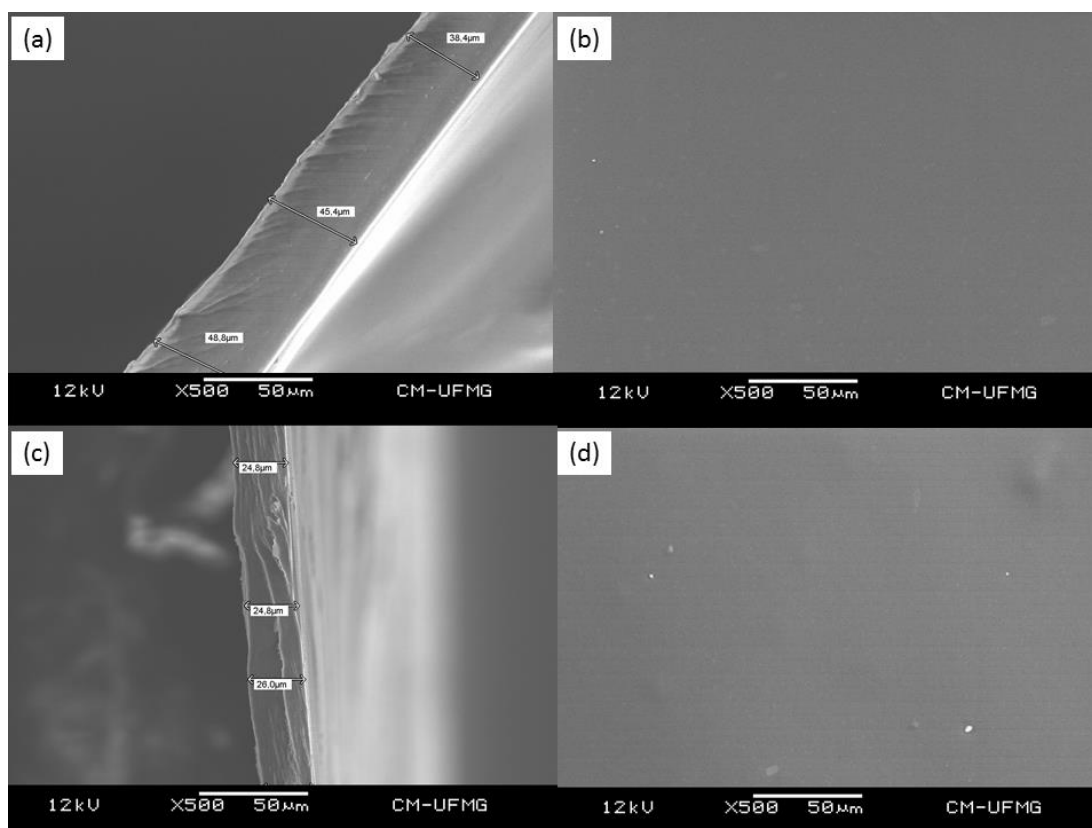
Para serem analisados no microscópio eletrônico de varredura, os insertes foram imersos em nitrogênio líquido e em seguida fraturados. Dessa forma obteve-se uma superfície fraturada lisa, permitindo uma melhor análise. Por meio do MEV verificou-se que o método de espalhamento em placa perfurada foi eficaz para produzir insertes com espessura homogênea (Figura 15).

As imagens da microscopia corroboram com os dados de potencial de hidratação. Nas imagens (a) e (b) podemos ver a fratura e a superfície do filme placebo, uma vez que não é observado nenhum cristal que poderia ser atribuído à presença do ativo sólido na formulação inferimos que ele está diluído no inserte. Já nas imagens (c) e (d) observamos o filme placebo, pela imagem da fratura é possível verificar que o inserte placebo é ligeiramente menos espesso que o inserte que contém o ativo, ou seja, a presença do 4-AD influencia na forma como as cadeias poliméricas interagem entre si, conforme observado no teste de potencial de hidratação.

Isso porque elas confirmam que o dispositivo não será considerado um corpo estranho pelos olhos e, portanto, não causará irritabilidade, tendo em vista que os

insertes possuem espessura menor que 70  $\mu\text{m}$ , valor máximo que um dispositivo pode possuir para não causar desconforto (LAND e BENJAMIN, 1994). Resultado semelhante foi encontrado por França e colaboradores (2014) que produziram insertes com espessura em torno de 40  $\mu\text{m}$  e comprovaram que eles não promoviam irritação ocular (LAND e BENJAMIN, 1994; FRANÇA, 2014.a).

**Figura 16: MEV para os filmes obtidos em estudo. Em que: (a) fratura do inserte 50:50 contendo ativo e (b) sua superfície; (c) fratura do inserte 50:50 placebo e (d) sua superfície.**



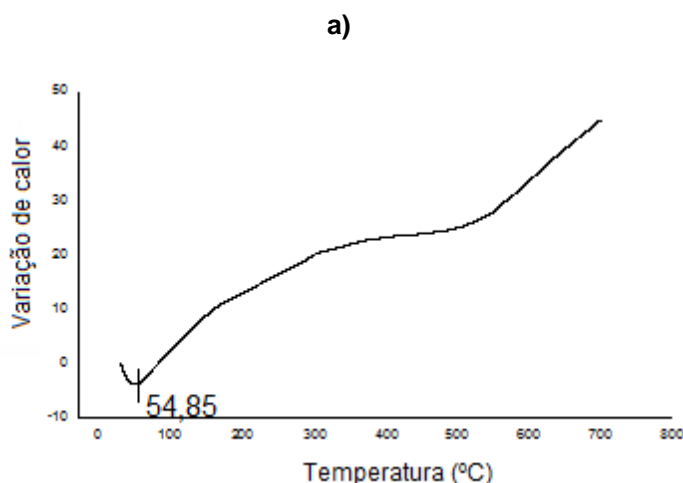
Foi realizada a análise térmica dos insertes 50:50 contendo ativo (IA) e placebo (IP). Nos termogramas de DSC apresentados na Figura 2 (Manuscrito II, página 69) foi possível observar picos endotérmicos próximos a 100°C, atribuídos à evaporação da água residual presente em ambas as formulações de insertes. O mesmo comportamento pode ser observado nos filmes poliméricos de quitosana descritos por Rodrigues e colaboradores e França e colaboradores (RODRIGUES *et al.*, 2009; FRANÇA *et al.*, 2014.a).

Nas curvas correspondentes às segundas corridas de DSC, observou-se um pico exotérmico próximo a 300°C que foi atribuído à degradação das cadeias poliméricas de quitosana, esse pico encontra-se deslocado no IP devido à ausência do

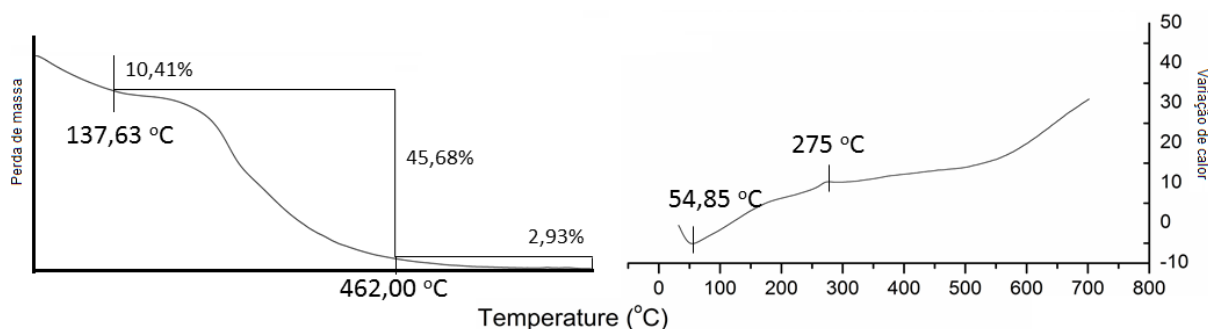
composto ativo 4-AD. Isso indica que ocorreu uma redução na temperatura de degradação da cadeia da matriz polimérica com a adição do ativo. Tal achado pode ser considerado um indício da presença do 4-AD disperso na formulação (KHALID *et al.*, 2002; FRANÇA *et al.*, 2014.a; RODRIGUES *et al.*, 2009). Essa suposição pode ser revalidada observando-se a Figura 15, em que não foi possível identificar partículas cristalizadas no meio dos insertes contendo o ativo, reintegrando a hipótese de que ocorre uma dispersão molecular na matriz polimérica.

As curvas de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) dos insertes com o ativo e placebo estão representadas na Figura 16. Em ambos observa-se um evento próximo a 55°C correspondente à perda de água, conforme visto no experimento de DTA. A perda de massa ocorre de forma contínua no inserte placebo, sendo que o final do processo ocorre a 697°C e a perda de massa total é de 77%. Em paralelo, a perda de massa do IA ocorre em duas etapas, sendo que as duas temperaturas e os términos dos processos de perda de massa são próximas às temperaturas observadas nas curvas de DTA. A primeira perda de massa (10%) corresponde à água residual presente na formulação do inserte, a segunda perda (46%) possui temperatura onset de 462°C, e o máximo da perda ocorre em aproximadamente em 300°C (valor obtido pela análise dos dados da curva de DTG), esse evento pode ser atribuído à degradação da quitosana. Finalizando o processo houve uma pequena perda de massa (3%) que ocorreu de maneira contínua até 700°C.

**Figura 17: Análises de DTA,e TG para (a) insertes placebo (b) inserte Ativo.**



b)



Os polímeros (ChS e SC), o inserte placebo (IP) e inserte ativo (IA) e o composto 4-AD foram analisados pela técnica de FTIR-ATR a fim de avaliar as possíveis alterações que indicariam interações moleculares entre o ativo e a cadeia da matriz polimérica, ou seja, verificar se houve uma mudança química nos constituintes durante o processo de produção do inserte (Figura 3, Manuscrito II, página 69). No espectro de SC destacam-se a banda de estiramento O-H polimérico ( $3250\text{ cm}^{-1}$ ), estiramento C=O de amida I e de ácido carboxílico ( $1640\text{ cm}^{-1}$ ). Em  $1540\text{ cm}^{-1}$  encontra-se a banda de amida II referente à deformação angular de N-H e ao estiramento C-N do grupo C-N-H, por fim em  $1233\text{ cm}^{-1}$  é possível observar a banda referente ao estiramento S=O. Destacam-se a banda em  $3280\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento O-H polimérico da ChS, a sobreposição da banda de amida e vibração de N-H de amina, entre  $1540$  e  $1550\text{ cm}^{-1}$  e entre  $1200$  e  $950\text{ cm}^{-1}$  observa-se a bandas de vibração C-O-C e C-O (SILVERSTEIN *et al.*, 2000; FRANÇA *et al.*, 2014.a).

No espectro de ART-FTIR do inserte a banda que corresponde à presença do ativo é pequena, pois sua proporção em relação à matriz polimérica é pequena, logo se observa que não há mudanças significativas ao comparar o espectro do inserte placebo (IP) com o inserte contendo o ativo (IA), a banda em  $840\text{ cm}^{-1}$  (assinalada por um asterisco) indica a presença da substância 4-AD. Observou-se que no inserte a banda em torno de  $1540\text{ cm}^{-1}$ , atribuída anteriormente aos grupamentos amino presente na ChS, está mais estreita, o que pode ser explicado pela presença de resíduo de ácido acético no inserte (FRANÇA *et al.*, 2014.b).

Conforme detalhado no primeiro capítulo deste trabalho, o método de quantificação por HPLC é robusto e eficiente para detectar o ativo 4-AD na faixa de quantificação

de 5 a 25 µg/mL ( $y = 181,18 \times 10^7 x - 819900$ ,  $r^2=0,993$ ). Dessa forma, suas condições foram utilizadas para a quantificação do ativo. O doseamento foi realizado de acordo com o método preconizado na Farmacopeia Brasileira (2010). Um pool de insertes foi hidratado com 2 mL de ácido acético glacial overnight. Em seguida o volume foi completado para 10 mL com ácido acético 2% p/v e a solução foi mantida sob agitação overnight, para completa solubilização dos dispositivos. Decorrido o período a solução foi filtrada e diluída. O conteúdo do ativo foi quantificado por HPLC. Este teste foi realizado em triplicata. Foi obtida a quantidade de 30µg de 4-AD por inserte.(0,016%)

No experimento de perfil de liberação *in vitro*, (Figura 4, Manuscrito II, página 70). Foi possível observar que a formulação de interesse (50:50) liberou pelo menos 50% da substância ativa nos primeiros 30 minutos. O perfil de liberação corrobora os dados até então obtidos para o intumescimento dos filmes. O maior influxo de água gerado pela presença do fármaco na estrutura polimérica ocasiona uma maior interação entre as moléculas dos polímeros e do fármaco. Além disso, o fato do pH utilizado no teste ser ligeiramente básico (7,4), favorece ainda mais a possibilidade de ionização dos grupos ácidos da estrutura do sulfato de condroitina ajudando ainda mais maior solvatação do ativo e, novamente, favorecendo o influxo de água (FAJARDO *et al.*, 2013). Com o maior influxo e conseqüentemente maior afastamento das cadeias poliméricas, a água passa a dissolver o fármaco, que é liberado da estrutura do filme. por um processo difusional

O tempo de liberação encontrado no teste é relativamente pequeno considerando um sistema de liberação controlada. A explicação para este fato está no modelo experimental proposto para a liberação do fármaco. Quando colocado em célula de Franz, o dispositivo entra em contato íntimo com uma superfície extremamente irrigada com solução tampão. Este contato íntimo e o excesso de solução aquosa faz com que o filme, em função do que já foi discutido anteriormente, libere o ativo de forma rápida. Este não é o perfil que encontramos quando colocamos o dispositivo passou pelo teste *in vivo*. Neste último caso, observa-se uma liberação de 2 semanas. A diferença, neste caso, reside no fato de que no olho do animal não há água (lágrima) em quantidade suficiente para hidratar o dispositivo que ocasionou sua uma liberação rápida *in vitro*, mas sim há uma superfície úmida e que é



constantemente umedecida pelo animal em função do tempo. Neste caso, a liberação tende a ocorrer na medida em que o dispositivo vai sendo hidratado e, portanto, ocorre com um tempo maior de liberação. Estes resultados já foram encontrados de forma semelhante por nosso grupo utilizando outros fármacos e sistemas poliméricos (FOUREAUX *et al.*, 2015; FRANÇA, *et al.*, 2014.a).

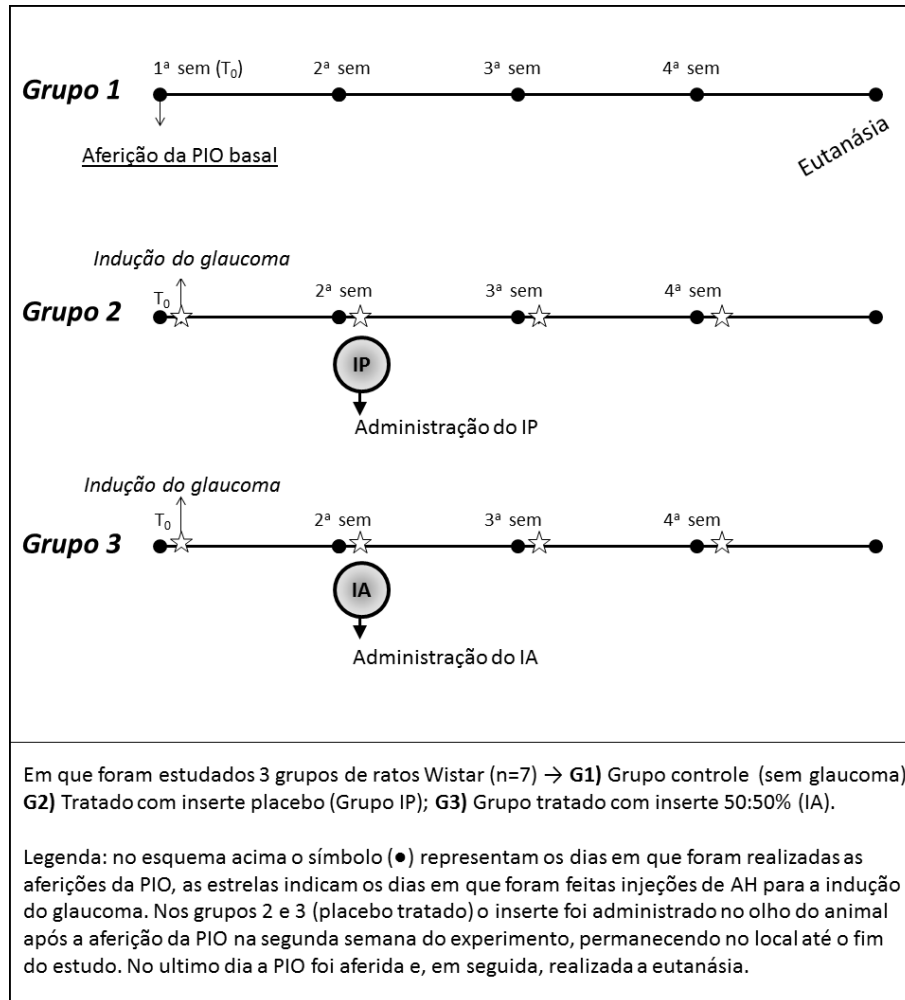
Após a caracterização físico-química, este trabalho teve por objetivo verificar se o inserte que apresentou um tempo de liberação curto do ativo nos testes *in vitro*, o inserte poderia liberar a substância ativa em um maior tempo e conseqüentemente ser utilizado como um sistema de liberação prolongada. Para verificar esta hipótese, foi realizado os testes *in vivo*.

Na Figura 17 está esquematizada a linha temporal do protocolo da experimentação *in vivo*. Os animais foram divididos, randomicamente, em três grupos de 7 indivíduos, todos os animais tiveram sua pressão intraocular (PIO) basal aferida em  $t_0$ , em seguida os grupos 2 e 3 foram submetidos ao processo de indução de glaucoma, conforme descrito na seção de métodos do “Manuscrito II”, seis dias após a indução a PIO foi novamente aferida e no grupo 2 foi administrado o inserte contendo o placebo e no grupo 3 o inserte contendo o ativo. O grupo 1 foi mantido como controle, nele não foi induzido nem administrado tratamento. O resultado do experimento descrito no protocolo esquematizado acima pode ser observado na Figura 5, Manuscrito II, página 71.

Foi possível comprovar que o dispositivo 50:50 foi efetivo na redução da PIO, já que ele foi administrado depois do estabelecimento da hipertensão ocular (na segunda semana do experimento) e seus efeitos foram observados no decorrer de três semanas. Não houve diferença entre os grupos avaliados na primeira semana, quando se estabeleceu a PIO basal. Em seguida, observa-se o aumento da pressão nos grupos que tiveram o glaucoma induzido com a injeção de AH (Semana 2). Conforme descrito no dia subsequente houve uma nova indução e insertes foram alocados no saco conjuntival do olho direito dos animais do grupo tratado com o 4-AD (IA) e do placebo (IP). Na semana seguinte, foi observada uma redução da PIO do grupo tratado. A redução se manteve até o término dos experimentos, ou seja, um inserte foi capaz de atuar na redução e na manutenção da PIO próximo aos valores da linha de base por três semanas consecutivas. O mesmo comportamento

pôde ser observado na avaliação da PIO utilizando insertes de ChS e diminazeno (FOUREAUX *et al.*, 2015).

**Figura 18: Representação esquemática do modelo experimental de indução de glaucoma e grupos de tratamento e controle utilizados.**

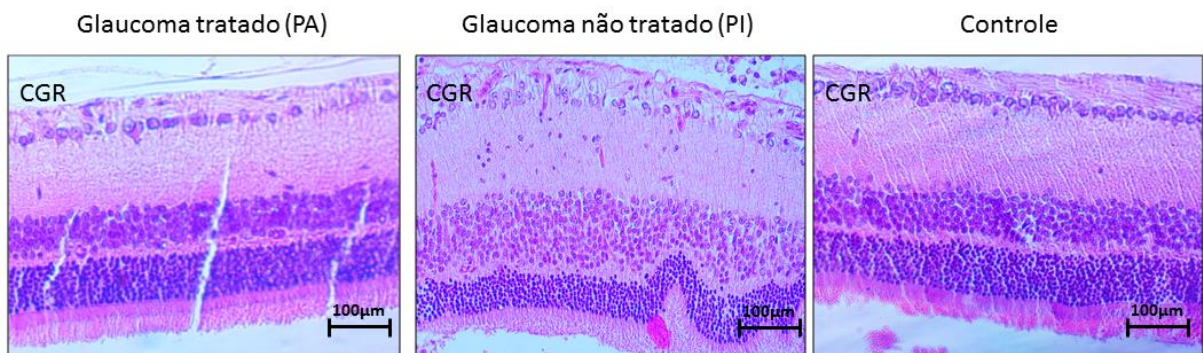


Calles e colaboradores (2013) descrevem um filme com propriedades mucoadesivas formulado a partir de ligações cruzadas entre o ácido hialurônico e ácido itacônico, carreando o maleato de timolol como agente antiglaucomatoso. A PIO foi acompanhada ao longo de 10 horas, em que foi possível observar a maior redução em torno de 2 horas. No entanto, ao contrário do inserte 50:50 não houve manutenção da redução por mais de um dia, ou seja, o dispositivo estudado por Calles necessita de administração diária, dessa forma o inserte proposto por nosso grupo é mais vantajoso uma vez que, ao atuar por maior tempo garante maior comodidade e menor risco de falha terapêutica devido ao esquecimento da administração da dose.

Também foi avaliada a capacidade de a substância 4-AD reduzir a deterioração do nervo óptico, como ocorreu com os insertos de Diminazeno (Foureaux et al., 2015). A análise permitiu observar uma escavação menos significativa na cabeça do nervo óptico do grupo tratado com a substância 4-AD. Por outro lado, é possível observar uma escavação maior na cabeça do nervo óptico no grupo placebo. Estes dados indicam que o dispositivo de liberação prolongada promoveu neuroproteção, evitando a morte de células ganglionares. O dano óptico provocado pelo glaucoma é decorrente da perda de CGR que, por sua vez, está relacionada à pressão intraocular elevada. Isso também leva à perda de fibras neurais, com a consequente escavação do nervo óptico.

Os achados histológicos estão na figura abaixo (Figura 18). A contagem das células da camada ganglionar da retina foi realizada em cortes histológicos de grupos de animais com  $n=7$ . Não houve diferença entre o “grupo controle” ( $416,0 \pm 43,5$  células) e o “grupo glaucoma tratado com ativo” ( $445,8 \pm 35,3$  células), mas houve diferença entre o grupo “glaucoma tratado” e o grupo “placebo” (Glc + PI,  $288,3 \pm 52,4$  células), como pode ser observado no gráfico da Figura 6 (Manuscrito II, página 72).

**Figura 19: Análise histológica de células ganglionares da retina.**



**Fotomicrografias representativas de retinas mostrando o menor número de RCG em ratos glaucomatosos tratados (PA), tratados com PI e animais controle em que não foi induzido o glaucoma.**

No gráfico da Figura 6 (Manuscrito II) os dados histológicos indicam que o inserto promoveu neuroproteção, uma vez que evitou a morte das células da camada ganglionar da retina (CGR), observa-se que os núcleos presentes no grupo placebo estão degenerados, existe acúmulo de líquido nos núcleos e esse processo de

degeneração é irreversível, ao passo que no grupo tratado os núcleos não estão degenerados. No grupo que não recebeu tratamento foi possível observar a escavação do nervo óptico decorrente da morte das CGR causada pela elevação da pressão intraocular. Esses dados de proteção de células ganglionares são consistentes com os achados em estudos com análogos de prostaglandinas (FRANÇA et al., 2014.a). Além disso, eles são consistentes com os dados de redução da PIO, uma vez que os animais com glaucoma não tratado apresentam a pressão intraocular elevada o que resulta na diminuição das CGR, sendo o oposto verdadeiro.

## 5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Essa é uma doença crônica que afeta mais de 70 milhões de pessoas em todo o mundo, cuja terapia, atualmente, se baseia principalmente na administração de colírios, que possuem baixa biodisponibilidade e apresentam possibilidade de toxicidade tópica e sistêmica. A toxicidade sistêmica ocorre devido a drenagem de mais de 90% da dose via ducto lacrimonasal.

Foi possível observar que o inserte com maior potencial foi o de matriz composta por sulfato de condroitina e quitosana na proporção 50:50 %m/m. Em sua caracterização conclui-se que o ativo estava disperso no sistema polimérico, além disso, o pH do inserte também era compatível com a administração ocular. Ainda, este inserte apresentou uma boa capacidade de intumescimento e manutenção da integridade e uma espessura adequada para não induzir a sensação de corpo estranho nos olhos dos pacientes. Os testes de mucoadesão *in vitro* demonstraram que a associação de polímeros tornou a formulação mais adesiva quando comparada ao inserte de ChS puro, que já foi objeto de estudo de nosso grupo. Ou seja, este trabalho apresentou um avanço na linha de pesquisa. O aumento da força adesiva (que foi maior para a formulação 50:50) é relevante, pois permite o aumento da residência pré-corneal do ativo e conseqüentemente sua absorção.

No teste *in vivo* o inserte demonstrou ser capaz de reduzir a pressão intraocular em ratos *Wistar* com glaucoma induzido pela administração de ácido hialurônico. Essa redução foi observada por três semanas após um inserte ser alocado no olho glaucomatoso dos animais. Na avaliação histológica foi observado que houve redução no dano das células ganglionares da retina.

Concluindo, o inserte 50:50 apresentou características físicas e químicas adequadas para ser utilizado como veículo de liberação prolongada, eficaz e seguro na terapia do GPAA, com o objetivo de aumentar a adesão do paciente ao tratamento (por reduzir a frequência de administração) e aumentar a eficácia terapêutica. Foi também demonstrado o potencial da benzamidina como nova substância para o tratamento do glaucoma. Ou seja, este trabalho apresentou um avanço na linha de pesquisa: com a ideia inovadora do uso do composto 4-AD como agente

antiglaucomatoso, ação até então inédita na literatura. Considerando esses resultados promissores, a próxima etapa deste trabalho será o estudo clínico de fase II após a obtenção da aprovação do comitê de ética da UFMG para o desenvolvimento dessa pesquisa.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABURAHMA, M.; MAHMOUD, A. Biodegradable Ocular Inserts for Sustained Delivery of Brimonidine Tartarate: preparation and in vitro/in vivo evaluation. **AAPS PharmSciTech**. 12(4):1335-1347. 2011

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 71(3): 505-518. 2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. Brasília, Brasil. 2017.

ATSRIKU, C; Watson, D. G.; Tettey, J. N.; Grant, M. H.; Skellern, G. G. Determination of diminazene aceturate in pharmaceutical formulations by HPLC and identification of related substances by LC/MS. **J Pharm Biomed Anal.**30(4):979-986. 2002

AWWAD, S; MOHAMED AHMED, AHA; SHARMA, G; HENG, JS; KHAW, PT; BROCCCHINI, S; LOCKWOOD, A. Principles of pharmacology in the eye. **Br J Pharmacol.** 174(23): 4205-4223. 2017

BARANOWSKI, P.; KAROLEWICZ, B.; GAJDA, M.; PLUTA, J. Ophthalmic drug dosage forms: characterisation and research methods. **Scientific World Journal.** 2014.

BERNKOP-SCHNURCH, A. Mucoadhesive polymers: strategies, achievements and future challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 57(11): 1553-1555. 2005.

BRASIL. Portal Brasil. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2016/05/ministerio-da-saude-alerta-para-cuidados-com-glaucoma>. Acesso em: 02 novembro 2016.

BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo: patologia. 9 ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 1501 p.

CALLES, J. A.; BERMÚDEZ, J.; VALLÉS, E.; ALLEMANDI, D.; PALMA, S. Polymers in Ophthalmology. 1° ed. Nova York: **Springer International Publishing**: 147–176. 2015

CALLES, J.A.; TÁRTARA, L.I.; LOPEZ-GARCÍA, A; DIEBOLD, Y; PALMA, S.D.; VALLÉS, E.M. Novel bioadhesive hyaluronan-itaconic acid crosslinked films for ocular therapy. **Int J Pharm.** 455(1-2): 48-56. 2013.

CARVALHO, F.C.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M.P.D. Plataformas bio(muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos - propriedades, metodologias e aplicações. **Polímeros.** 24(2): 203-213. 2014.

CHAN, W.; AKHBANBETOVA, A.; QUANTOCK, A.J.; HEARD, C.M. Topical delivery of a Rho-kinase inhibitor to the cornea via mucoadhesive film. **Eur. J. Pharm. Sci.** 91:256–264. 2016

CHANG, K.Y.; CHENG, L.W.; HO, G.H. Fabrication and characterization of poly (gamma-glutamic acid)-graft-chondroitin sulfate/polycaprolactone porous scaffolds for cartilage tissue engineering. **Acta Biomater.** 5(6): 1937-1947. 2009.

CHOURASIA, M. K.; JAIN, S. K. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. **J. Pharm. Pharm. Sci.** 6(1): 33-66. 2003.

CRONEMBERGER, S.; FRANCA, J.; CEZAR, A.; ARAÚJO, F.; CUNHA, F.; GOMES, A.; FERREIRA, A. Effectiveness and Safety of Topical Bimatoprost Insert for Primary Open-Angle Glaucoma and Ocular Hypertension Treatment. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 2017

DA SILVA, G.L.O.; DE FREITAS, R.M. Diminazene aceturate--An antiparasitic drug of antiquity: Advances in pharmacology & therapeutics. **Pharmacol Res.** 102:138-57. 2015



DE LA FUENTE, M.; RAVIÑA, M.; PAOLICELLI, P.; SANCHEZ, A.; SEIJO, B.; ALONSO, M.J. Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics. **Adv Drug Deliv Rev.** 62(1): 100-17. 2010.

DOPPALAPUDI, S.; JAIN, A.; KHAN, W.; DOMB, A.J. Biodegradable polymers-an overview. **Polym. Adv. Technol.** 25(5):427-435. 2014.

ER services: Anatomy and Physiology I. The Brain and Cranial Nerves. Disponível em: <<https://courses.lumenlearning.com/suny-ap1/chapter/vision/>>. Acesso em: 25 junho 2019.

FAJARDO, A. R.; LOPES, L. C.; CALEARE, A. O.; BRITTA, E. A.; NAKAMURA, C. V.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Silver sulfadiazine loaded chitosan/chondroitin sulfate films for a potential wound dressing application. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.** 33(2):588-95. 2013.

FARACO, A.; FRANÇA, J.; CRONEMBERGER, S.; ALVES, R.; NAVARRO, L.; CESAR, A.; CASTILHO, R.; FERREIRA, A.; FOUREAUX, G.; SILVA, R.; SANTOS, J.; FRAGA, F.; NOGUEIRA, J.; CASTRO, C.; LACERDA, I. Composições farmacêuticas vasodilatadoras contendo para-aminobenzamidina e usos. BR 10 2018 070564 4, 05 Set 2018.

FOUREAUX, G.; FARACO, A. A.; FERREIRA, A. J. Ocular Inserts for Sustained Release of the of the Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activator, Diminazene Aceturate, to Treat Glaucoma in Rats. **PLoS One.** 10(7):1-18. 2015.

FOUREAUX, G.; NOGUEIRA, J.C.; NOGUEIRA, B.S.; FULGÊNCIO, G.O.; MENEZES, G.B.; FERNANDES, S.O.A.; CARDOSO, V.N.; FERNANDES, R.S.; OLIVEIRA, G.P.; FARACO; RAIZADA, M.K.; FERREIRA, A.J. Antiglaucomatous effects of the activation of intrinsic Angiotensin-converting enzyme 2. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 54(6): 4296-306. 2013.

FRANÇA, J. R.; FARACO, A. A. G.; FERREIRA, A. J.; CASTILHO, R. O. Desenvolvimento e avaliação da atividade de insertees poliméricos de quitosana para liberação de fármacos antiglaucomatosos. 2014.b. 179 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia.

FRANÇA, J. R.; FERREIRA, A. J.; FARACO, A. A. Bimatoprost-Loaded Ocular Inserts as Sustained Release Drug Delivery Systems for Glaucoma Treatment: In Vitro and In Vivo Evaluation. **PLoS One**. 9,(4): 1-11. 2014.a.

GHATE, D.; EDELHAUSER, H. Barriers to glaucoma drug delivery. **J Glaucoma**. 17(2), 2008.

GLAUCOMA RESEARCH FOUNDATION, 2017. Types of Glaucoma. Disponível em: <<https://www.glaucoma.org/glaucoma/types-of-glaucoma.php>>. Acesso em: 20 maio 2019.

GLAUKOS. Glaukos: transforming glaucoma therapy. Acesso em: 09 março de 2020 Disponível em: <https://www.glaukos.com/>.

GOOCH, N.; MOLOKHIA; S. A.; CONDIE, R.; BURR, R. M.; ARCHER, B.; AMBATI, B. K.; WIROSTKO, B. Ocular drug delivery for glaucoma management. **Pharmaceutics**. 4(1):197-211. 2012.

HAMRAH, P; ALIPOUR, F.; JIANG, S; SOHN, J.H.; FOULKS, G.N. Optimizing evaluation of Lissamine Green parameters for ocular surface staining. **Eye (Lond)**. 25(11): 1429-1434. 2011.

HASSAN, E.E.; GALLO, J.M. A simple rheological method for the in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength. **Pharm. Res**. 4:491-495. 1990.

HENDERER, J. D.; RAPUANO, C. J. Farmacologia ocular. Em: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **GOODMAN & GILMAN: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. p. 1821. 2012.

HORI, Y.; HOSHINO, J.; YAMAZAKI, C. Effects of chondroitin sulfate on colitis induced by dextran sulfate sodium in rats. **Jpn. J. Pharmacol**. 85(2):155-160. 2001.

HORNOF, M; WEYENBERG, W; LUDWIG, A; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Mucoadhesive ocular insert based on thiolated poly(acrylic acid): development and in vivo evaluation in humans. **J Control Release**. 89(3): 419-428. 2003.

ICH, G. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonization, Geneva. **International Conference on Harmonization**. 2005.

IOBH. Trabeculectomia glaucoma. Disponível em: <<http://www.iobh.com.br/>>. Acesso em: 29 maio 2019.

JONAS, J.; AUNG, T.; BOURNE, R.; BRON, A.; RITCH, R.; PANDA-JONAS, S. Glaucoma. **Lancet**. 390(10108): 2183-2193. 2017.

KARKI, S.; KIM, H.; NA, S.; D.; JO, K.; LEE, J. Thin films as an emerging platform for drug delivery. **Asian J. Pharm. Sci.** 11(5): 559–574. 2016.

KAUR, I.; KANWAR, M. Ocular preparations: the formulation approach. **Drug Dev Ind Pharm**. 28(5): 473-493. 2002.

KESAVAN, K.; KANT, S; SINGH, P.N.; PANDIT, J.K. Mucoadhesive chitosan-coated cationic microemulsion of dexamethasone for ocular delivery: in vitro and in vivo evaluation. **Curr Eye Res**. 38(3):342-52. 2013

KHALID, M.N; AGNELY, F.; YAGOUBI, N.; GROSSIORD, J.L.; COUARRAZE, G. Water state characterization, swelling behavior, thermal and mechanical properties of chitosan based networks. **Eur J Pharm Sci**. 15(5): 425-432. 2002.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 9. ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier. 1408 p. 2014.

LAND, D.L.; BENJAMIN, W.J. Sizes and shapes of conjunctival inserts. **International Contact Lens Clinic**. 21(11-12): 212–217. 1994.

LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**. 57(11): 1595-1639. 2005.

MANTRAVADI, A.V.; VADHAR, N. HEIDELBAUGH, J.J. Primary care phthamology. An Issue of Primary Care: Clinics in Office Practice. 42(3)437–449. 2015.

MCMONNIES, C.W. Glaucoma history and risk factors. **J Optom**. 10(2): 71–78. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Glaucoma. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, ano 1, n. 2, 2009. Disponível em: <Glaucoma. Saúde de Economia, ano 1, ed. 2, 2009.>. Acesso em: 11 de agosto de 2015.

MISHRA, D.N.; GILHOTRA; R.M. Design and Characterization of Bioadhesive In-Situ Gelling Ocular Insertes of Gatifloxacin Sesquihydrate. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**. 16(1):1-8. 2008.

NAGARWAL, R.C.; KANT, S.; SINGH, P.N.; MAITI, P.; PANDIT, J. K. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. **J. Control. Release**. 136(1): 2-13. 2009.

NATIONAL EYE INSTITUTE. Facts About Glaucoma, September 2015. Disponível em: <[https://nei.nih.gov/health/glaucoma/glaucoma\\_facts](https://nei.nih.gov/health/glaucoma/glaucoma_facts)>. Acesso em: 23 abril 2018.

NAVRATIL T, DAS S, GARCIA A, TULLY J. Glaucoma treatment via intracameral ocular implants. WO2017015675A1, 26 Jan 2017

PEK, Y.S.; WU, H; MOHAMED, S.T.; YING, J.Y. Long-Term Subconjunctival Delivery of Brimonidine Tartrate for Glaucoma Treatment Using a Microspheres/Carrier System. **Adv Healthc Mater**. 5(21):2823-283. 2016.

PENG, C.C; BURKE, M.T; CARBIA, B.E; PLUMMER, C; CHAUHAN, A. Extended drug delivery by contact lenses for glaucoma therapy. **J Control Release**. 162(1):152-8. 2012.

PISAL, P.B; JOSHI, M.A; PADAMWAR, M.N.; PATIL, S.S.; POKHARKAR, V.B. Probing influence of methodological variation on active loading of acetazolamide into nanoliposomes: biophysical, in vitro, ex vivo, in vivo and rheological investigation. **Int J Pharm**. 461(1-2):82-8. 2014.

RODRIGUES, L.B.; LEITE, H.F.; YOSHIDA, M.I.; SALIBA, J.B.; CUNHA, A.S.; FARACO, A.A. In vitro release and characterization of chitosan films as dexamethasone carrier. **Int. J. Pharm**. 368(1-2):1-6. 2009.

SCHUERER, N.; STEIN, E.; INIC-KANADA, A.; PUCHER, M.; HOHENADL, C.; BINTNER, N.; GHASEMIAN, E.; MONTANARO, J.; BARISANI-ASENBAUER, T. Implications for Ophthalmic Formulations: Ocular Buffers Show Varied Cytotoxic Impact on Human Corneal–Limbal and Human Conjunctival Epithelial Cells. **Cornea**, 36(6): 712-718. 2017.

SHARIF, N.A. Ocular Hypertension and Glaucoma: A Review and Current Perspectives. **Int J Ophthalmol Vis Sci**. 2: 22-36. 2017.

SHIVAKUMAR, H.N.; DESAI, B.G; SUBHASH, P.G; ASHOK, P; HULAKOTI, B. Design of ocular inserts of brimonidine tartrate by response surface methodology. **J Drug Deliv Sci Technol**. 17(6):421-430. 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos. 460p. 2000

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Adv Drug Deliv Rev**. 57(11):1556-68. 2005.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. Practical HPLC method development. New York: Wiley. 765 p. 1997.

TEJADA, G.; BARRERA, M.G; PICCIRILLI, G.N.; SORTINO, M.; FRATTINI, A.; SALOMÓN, C.J.; LAMAS, M.C.; LEONARDI, D. Development and Evaluation of Buccal Films Based on Chitosan for the Potential Treatment of Oral Candidiasis. **AAPS PharmSciTech**. 18(4):936-946. 2017.

THAM, Y.; LI, X.; WONG, T.; QUIGLEY, H.; AUNG, T.; CHENG, C. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. **Ophthalmology**.121(11): 2081-2090.2014.

TORIS, C. B.; GABELT, B. T.; KAUFMAN, P. L. Update on the mechanism of action of topical prostaglandins for intraocular pressure reduction. **Survey of Ophthalmology**. 53(1):107-120. 2008.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciencia e Tecnologia**. 20(1):51-64. 2010.

VOLPI, N. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulphate: new functions from an old natural macromolecule. **Inflammopharmacology**. 19(6):299-306. 2011.

WANG, X.; MAJUMDAR, S.; MA, G.; SOHN, J.; YIU, S. C.; STARK, W.; AL-QARNI, A.; EDWARD, D. P.; ELISSEEFF, J. H. Chondroitin Sulfate-Based Biocompatible Crosslinker Restores Corneal Mechanics and Collagen Alignment. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 58(10): 3887-3895. 2017.

WEINREB, R. N.; AUNG, T.; MEDEIROS, F. A. The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma: A Review. **JAMA**. 311(18):1901–1911. 2014.


WEINREB, R. N.; KHAW, P. T. Primary open-angle glaucoma. **Lancet**. 363:1711-1720. 2004.

WEINREB, R. N.; LEUNG, C. K. S.; CROWSTON, J. G.; MEDEIROS, F. A.; FRIEDMAN, D. S.; WIGGS, J. L. MARTIN, K. R. Primary open-angle glaucoma. **Nature Reviews Disease Primers**. 2:1-19. 2016.

WHO. WHO releases the new global estimates on visual impairment. World Health Organization, 2015. Acesso em: 05 de agosto de 2015.

WÓJCIK-GRYCIUK, A.; SKUP, M.; WALESZCZYKB, W. J. Glaucoma –state of the art and perspectives on treatment. **Restor Neurol Neurosci**. 34(1): 107–123. 2016.

## 7 ANEXO A – PROTOCOLO CETEA

 UFMG	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> <b>CEUA</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b>
<p>Prezado(a):</p> <p>Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.</p>	
<p><b>Protocolo CEUA:</b> 13/2018 <b>Título do projeto:</b> Desenvolvimento, caracterização e avaliação in vitro e in vivo de inserts poliméricos formados por quitosana e condroitina com ação antiglaucomatosa. <b>Finalidade:</b> Pesquisa <b>Pesquisador responsável:</b> Giselle Foureaux Heida <b>Unidade:</b> Instituto de Ciências Biológicas <b>Departamento:</b> Departamento de Morfologia</p>	
<p><b>Situação atual:</b> <a href="#">Decisão Final - Aprovado</a></p>	
<p>Aprovado na reunião do dia 23/04/2018. Validade: 23/04/2018 à 22/04/2023 Belo Horizonte, 24/04/2018.</p>	
<p>Atenciosamente,</p>	
<p>Sistema Solicite CEUA UFMG <a href="https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/">https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/</a></p>	
<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/ceua">www.ufmg.br/bioetica/ceua</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a></p>	

## 8 ANEXO B – PATENTE SOLICITADA

05/10/2018 870180138102  
12:26

3158861707275637

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2018 070564 4

**Dados do Depositante (71)**

---

**Depositante 1 de 3****Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 17217985000104**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011**Cidade:** Belo Horizonte**Estado:** MG**CEP:** 31270-901**País:** Brasil**Telefone:** (31) 3409-6430**Fax:****Email:** patentes@ctit.ufmg.br

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 05/10/2018 às 12:26, Petição 870180138102



**Depositante 2 de 3**

**Nome ou Razão Social:** FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FAPEMIG

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 21949888000183

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Avenida José Cândido da Silveira, 1500, Bairro Horto

**Cidade:** Belo Horizonte

**Estado:** MG

**CEP:** 31035-536

**País:** BRASIL

**Telefone:** (31) 340 93932

**Fax:**

**Email:** patentes@ctit.ufmg.br

**Depositante 3 de 3**

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS - UFG

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 01567601000143

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Avenida Esperança s/n, Campus Samambaia, Prédio da Reitoria

**Cidade:** Goiânia

**Estado:** GO

**CEP:** 74690-900

**País:** BRASIL

**Telefone:** (31) 340 93932

**Fax:**

**Email:** patentes@ctit.ufmg.br

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 05/10/2018 às 12:26, Petição 870180138102

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de** COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS VASODILADORAS

**Utilidade (54):** CONTENDO PARA-AMINOBENZAMIDINA E USOS

**Resumo:** A presente tecnologia trata de composições farmacêuticas vasodilatadoras contendo para-aminobenzamidina e do uso da para-aminobenzamidina e das composições farmacêuticas para preparar medicamento com atividade vasodilatadora, antiarritmica e antiglaucomatosa, para o tratamento do glaucoma, da disfunção erétil, da hipertensão, de doenças cardiovasculares ou de doenças cujo tratamento envolve o emprego de vasodilatadores.

**Figura a publicar:** 1

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 05/10/2018 às 12:26, Petição 870180138102