

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

LARISSA CALDEIRA NAVARRO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA POLIMÉRICO MUCOADESIVO A
BASE DE QUITOSANA E CONDROITINA PARA VEICULAÇÃO DE
SUBSTÂNCIAS ANTIGLAUCOMATOSAS**

Belo Horizonte
2019

LARISSA CALDEIRA NAVARRO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA POLIMÉRICO MUCOADESIVO A
BASE DE QUITOSANA E CONDROITINA PARA VEICULAÇÃO DE
SUBSTÂNCIAS ANTIGLAUCOMATOSAS**

Dissertação 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 grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. André Augusto Gomes Faraco

Coorientadora: Profa. Giselle Foureaux Heida

Belo Horizonte

2019

Navarro, Larissa Caldeira.

N322d Desenvolvimento de sistema polimérico mucoadesivo para veiculação de substâncias antiglaucomatosas / Larissa Caldeira Navarro. – 2019.
91 f. : il.

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

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

1. Olhos – Doenças – Teses. 2. Glaucoma – Teses. 3. Condroitina – Teses. 4. Quitosana – Teses. 5. Polímeros – Teses. I. Faraco, André Augusto Gomes. II. Heida, Giselle Foureaux. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:615.4

Elaborado por Darlene Teresinha Schuler – CRB-6/1759



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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Desenvolvimento de Sistema Polimérico Mucoadesivo a base de Quitosana e Condroitina para Veiculação de substâncias Antiglaucomatosas

LARISSA CALDEIRA NAVARRO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Prof. André Augusto Gomes Faraco - Orientador
UFMG


Profa. Giselle Fourcaux Heida - Coorientadora
UFMG


Prof. Vinicius de Toledo Ribas
UFMG


Profa. Giselle Assis Castro Goulari
UFMG

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais
Renato e Miriam, que sempre me
incentivaram e me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre iluminar meu caminho e me amparar nos momentos de crise.

Aos meus pais, Renato e Miriam pelo amor incondicional, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todas minhas decisões. A pessoa que sou hoje, devo a vocês, que sempre me apoiaram e incentivaram a estudar, ser independente e evoluir.

Ao meu orientador André Faraco, por todo apoio, suporte e ensinamentos. Obrigada pela confiança, por acreditar no meu potencial e por não desistir de mim.

Agradeço a minha Co-Orientadora Giselle Foureaux por todo apoio, pela paciência em ensinar, e pela confiança depositada.

A Aina pelo apoio e suporte durante todo percurso. Você tornou mais leve e divertido cada dia no laboratório. Agradeço as minhas demais amigas pelo suporte emocional e intelectual, em especial a Thais Lima, por sempre estar do meu lado e não me deixar nunca desacreditar em mim.

Agradeço aos meus irmãos, Mariana e Renato, meus cunhados, Marcio e Hellen e aos meus sobrinhos, Elisa, Otto e Gabriel. Eternamente grata por ter vocês como minha família, não existem palavras que possam descrever meu amor e admiração por vocês.

A faculdade de ciências farmacêuticas da UFMG pela infraestrutura disponibilizada para a realização do meu mestrado.

“Os mais fortes de todos os guerreiros são
estes dois: tempo e paciência”

Liev Tolstói

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AH	Ácido Hialurônico
CGR	Células Ganglionares da Retina
Ch	Quitosana
ChNPS	Nano partículas de quitosana
CME	Componentes da Matriz Extracelular
GAG	Glicosaminoglicanos
GPAA	Glaucoma de ângulo aberto
GPAF	Glaucoma primário de ângulo fechado
GSAF	Glaucoma secundário de ângulo fechado
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução Tampão Fosfato Salino
PEC	Complexos poli eletrônicos
PIO	Pressão Intraocular
SC	Sulfato de condroitina
SLPF	Sistemas de liberação prolongada de fármacos
TAG	Tonômetro de aplanção de Goldmann

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia do olho humano	21
Figura 2: Humor aquoso, produção e escoamento.	22
Figura 3: Comparação da progressão do dano ao nervo óptico. (A) disco óptico saudável, (b) primeiros estágios da degradação do disco óptico, (c) estágio intermediário e (d) estágio avançado de degradação do disco óptico de um indivíduo glaucomatoso.	23
Figura 4: Causas da Cegueira.....	24
Figura 5: Principais fatores de risco para Glaucoma.....	25
Figura 6: Diferença entre glaucoma de ângulo aberto (GPAA) e glaucoma de ângulo fechado (GPAF)	27
Figura 7: Exemplo da progressão da perda de campo visual de pacientes portadores de glaucoma.....	28
Figura 8: Aumento da pressão intraocular e danos ao nervo óptico	29
Figura 9: Tonômetro de Goldman	32
Figura 10: Gonioscopia	33
Figura 11 – Estrutura química do betabloqueador maleato de timolol (a), dos análogos de prostaglandinas latanoprost (b), bimatoprost (c) e travoprost (d), do inibidor de anidrase carbônica cloridrato de dorzolamida (e), do agonista α -2 seletivo tartarato de brimonidina (f) e do agente colinérgico pilocarpina(g).....	36
Figura 12: Obtenção da Quitosana através da Quitina	41
Figura 13: Estrutura Química da Quitosana	42
Figura 14: Fórmula molecular do sulfato de condroitina (SC)	44
Figura 15: Mecanismo proposto de interação entre a quitosana e a condroitina.	45

Figura 16: Célula de Franz.....	55
Figura 17: Filmes poliméricos na placa de silicone após secagem (a), padronização do tamanho com auxílio da faca punch 2mm (b) e inserte com tamanho definido (c).	60
Figura 18: Propostas de sítios de interações entre filme de quitosana e filme de quitosana/condroitina com a mucina.	64
Figura 19: Espectro de absorção na região do infravermelho para o Sulfato de Condroitina	65
Figura 20: Espectro de absorção na região do infravermelho para a Quitosana	66
Figura 21: Espectro no IV da substancia SAF14.....	67
Figura 22: Comparativo Entre o filme 75:25 branco (75:25B) e com ativo (75:25A)..	68
Figura 23 : Termograma Quitosana	69
Figura 24: Termograma Filme de Quitosana Branco	69
Figura 25: Termograma do Filme de Quitosana com Ativo	70
Figura 26: Termograma Condroitina	71
Figura 27: Termograma Filme 75:25 com ativo	71
Figura 28: Termograma Filme 75:25 Sem ativo	72
Figura 29: Termograma SAF14.....	72
Figura 30: Termograma Corante Lissamina Verde	73
Figura 31: Curvas de DSC do sulfato de condroitina (a), da quitosona (d), do inserte polimérico com ativo (b) e do filme branco (c).....	74
Figura 32: Perfil de liberação <i>in vitro</i> da substância SAF14 no inserte 75:25 em célula de Franz.	75

Figura 33: Resultados da PIO obtidos nos grupos glaucoma, controle, controle placebo, glaucoma placebo, controle tratamento e glaucoma tratamento	76
Figura 34: Número médio de células Ganglionares	77
Figura 35: Corte Histológico da Retina.....	78
Figura 36: Fotomicrografia do nervo óptico.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à saúde (CID- 10) - Código e classificação dos tipos de Glaucoma - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Glaucoma	26
Tabela 2: Tabela com os principais fármacos, sua ação e efeitos adversos.....	37
Tabela 3: Valores do pH de superfície do Filme 75:25 e do Filme de Quitosana.....	62
Tabela 4: Resultados da mucoadesão	63

LISTA DE TABELAS GRÁFICOS

Gráfico 1: Gráfico 1: Índice de hidratação dos insertes de quitosana e condroitina (75:25) com e sem ativo e do inserte de quitosana com ativo.....2661

RESUMO

O termo glaucoma se refere a um grupo de doenças que se caracterizam pela morte das células ganglionares da retina e degeneração do nervo óptico. O tratamento farmacológico, através da instilação de colírios, costuma ser a escolha terapêutica inicial, no entanto apresenta diversos inconvenientes, tais como: desconforto e dificuldade na instilação; esquecimento de aplicação; baixa biodisponibilidade do fármaco. Estes inconvenientes conduzem a uma baixa adesão do tratamento e exposição sistêmica desnecessária ocasionando efeitos colaterais adversos. Uma alternativa ao colírio são os sistemas de liberação prolongada de fármacos, que garantem manutenção de uma concentração terapêuticamente eficaz por um período prolongado de tempo. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema polimérico para a veiculação de substâncias antiglaucomatosas, garantindo um nível terapêutico adequado, e eliminando a necessidade de uma farmacoterapia de múltiplas doses, aumentando assim a adesão e eficácia do tratamento. A quitosana é um polímero natural, biodegradável, seguro e bioativo. A condroitina é capaz de formar complexos polieletrólitos com aminas (no caso, a quitosana). O complexo formado entre esses dois polímeros apresenta características ideais para serem utilizados como insertes oculares, de forma segura e eficaz pois ambos os polímeros são biodegradáveis e biocompatíveis. Os insertes produzidos com estes polímeros foram caracterizados, fisicoquimicamente, por meio de espectrometria de infravermelho, análise térmica, potencial de hidratação, pH de superfície, capacidade de mucoadesão, capacidade de liberação das substâncias ativas *in vitro* e *in vivo*. Nos espectros no infravermelho não foram observadas interações significativas. Este resultado foi confirmado pelos termogramas de DSC. A capacidade de hidratação foi de 400% demonstrando resistência mecânica e capacidade de intumescimento dos filmes. As substâncias ativas foram liberadas no teste *in vitro* em aproximadamente 30 minutos e no teste *in vivo* a liberação da substância ativa ocorreu por 3 semanas consecutivas de tratamento. Após análise histológica do nervo óptico dos animais, foi possível observar que não houve degradação (escavação) do nervo óptico. Estes resultados demonstram que o inserte é capaz de liberar o ativo *in vivo* e proteger as células ganglionares, podendo, portanto, ser uma alternativa viável ao tratamento convencional com colírios.

Palavras chave: Glaucoma. Condroitina. Quitosana. Insertes Oftálmicos.
Caracterização de Polímeros.

ABSTRACT

The term glaucoma refers to a group of diseases characterized by retinal ganglion cells death and optic nerve degeneration. The treatment focuses on pharmacological treatment through the instillation of eye drops with several drawbacks, such as: discomfort and difficulty in instillation; forgetfulness of application; low bioavailability of the drug. These drawbacks lead to poor adherence to treatment and unnecessary systemic exposure leading to adverse side effects. An alternative to eye drops are sustained drug delivery systems, which ensure maintenance of a therapeutically effective concentration for an extended period. The aim of this work was to develop a polymer system for the delivery of antiglaucomatous substances, guaranteeing an adequate therapeutic level, and eliminating the need for multiple dose pharmacotherapy, thus increasing adherence and treatment efficacy. Chitosan is a biodegradable, safe and bioactive natural polymer. Chondroitin is capable of forming polyelectrostatic complexes with amines (in this case, chitosan). The complex formed between these two polymers presents ideal characteristics to be used as ocular inserts, in a safe and effective way since both polymers are biodegradable and biocompatible. The inserts produced with these polymers were physicochemically characterized by infrared spectrometry, thermal analysis, hydration potential, surface pH, mucoadhesion capacity, release capacity of the active substances *in vitro* and *in vivo*. No significant interactions were observed in infrared spectra. This result was confirmed by the DSC thermograms. The hydration capacity was of 400% demonstrating mechanical resistance and swelling ability of the films. The active substances were released in the *in vitro* test in approximately 30 minutes and in the *in vivo* test the release of the active substance occurred for 3 consecutive weeks of treatment. After histological analysis of the optic nerve of the guinea pigs, it was possible to observe that there was no degradation (excavation) of the optic nerve. These results demonstrate that the inserts are layers of releasing the active substance *in vivo* and protecting the ganglion cells and may therefore be a viable alternative to conventional eye drops treatment.

Key words: Glaucoma. Chondroitin. Chitosan. Ophthalmic inserts.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Anatomia Ocular	21
2.2	Glaucoma.....	23
2.2.1	Epidemiologia	23
2.2.2	Prevalência.....	25
2.2.3	Fatores de Risco.....	25
2.2.4	Classificação.....	26
2.2.5	Glaucoma Primário de Ângulo Aberto (GPAA)	27
2.2.6	Glaucoma de Ângulo Fechado (GAF).....	29
2.2.7	Diagnóstico.....	30
2.2.8	Aferição da PIO	31
2.3	Tratamento.....	33
2.3.1	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas	34
2.3.2	O tratamento cirúrgico e a laser.....	34
2.3.3	Tratamento Farmacológico.....	36
2.4	Sistemas de liberação prolongada de fármacos	39
2.4.1	Quitosana	40
2.4.2	Condroitina	42
2.4.3	Complexos de quitosana e condroitina.....	45

3	JUSTIFICATIVA	47
4	OBJETIVOS	49
4.1	Objetivo geral	49
4.2	Objetivos específicos	49
5	MATERIAIS E MÉTODOS	50
5.1	Preparação dos sistemas poliméricos	50
5.2	Caracterização dos dispositivos poliméricos	51
5.2.1	Porcentagem de hidratação	51
5.2.2	Avaliação do pH de superfície	52
5.2.3	Avaliação da Mucoadesão	52
5.2.4	Espectrometria de absorção na região do infravermelho	54
5.2.5	Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC)	54
5.3	Determinação do teor de liberação de fármaco <i>in vitro</i>	55
5.4	Modelo de roedores para o estudo do glaucoma	56
5.5	Determinação da capacidade de redução da PIO <i>in vivo</i>	56
5.6	Avaliação histológica	58
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6.1	Preparação dos filmes poliméricos	59
6.2	Caracterização dos dispositivos poliméricos	60
6.2.1	Porcentagem de Hidratação	60
6.2.2	Avaliação do pH de superfície	62

6.2.3	Avaliação da mucoadesão.....	63
6.2.4	Espectrometria de absorção na região do infravermelho	65
6.2.5	Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	68
6.3	Determinação da capacidade de liberação <i>in vitro</i>	74
6.4	Determinação da capacidade de redução da PIO <i>in vivo</i>	75
6.5	Avaliação histológica das células ganglionares da retina.....	76
6.6	Conclusão	80
REFERÊNCIAS.....		81
ANEXO		91

1 INTRODUÇÃO

O termo glaucoma não se refere a uma entidade patológica única, mas a um grupo heterogêneo de doenças neurodegenerativas que afetam a visão periférica do indivíduo, caracterizando-se pela morte, por apoptose, das células ganglionares da retina e degeneração do nervo óptico, podendo levar à cegueira. É um importante problema de saúde pública em todo o mundo, uma vez que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2017), é a principal causa de cegueira irreversível e a segunda causa de cegueira no mundo.

Atualmente existem mais de 70 milhões de pessoas com glaucoma em todo mundo, sendo que a cada ano surgem mais de 2,4 milhões de novos casos. Estima-se que em 2020 haverá 80 milhões de pessoas com glaucoma no mundo, e que dessas, 11,2 milhões terão cegueira bilateral secundária ao glaucoma (OMS, 2017; Quigley e Broman, 2006). Segundo a Sociedade Brasileira de Glaucoma, a doença atinge cerca de 2% da população no Brasil, existindo cerca de um milhão de portadores de Glaucoma. Nos Estados Unidos cerca de 2,25 milhões de pessoas são portadoras de glaucoma, sendo a principal causa de cegueira na população negra (Friedman et al, 2004).

O glaucoma muitas vezes é chamado de “silent blinder” ou, traduzindo “cegueira silenciosa”, porque muitas vezes os portadores não têm conhecimento da doença. Estima-se que apenas 50% dos doentes sejam efetivamente diagnosticados com glaucoma (COLEMAN, A. 1999).

São descritas diferentes formas de glaucoma, sendo as principais o glaucoma de ângulo aberto (OAG), onde o ângulo da câmara anterior do olho permanece aberto, e o glaucoma de ângulo fechado ou agudo (AGC), onde ocorre o fechamento do ângulo da câmara anterior. As alterações do campo visual que levam ao glaucoma podem ser resultado de vários fatores de risco, como o aumento da pressão intraocular (PIO), idade avançada, distúrbios cardiovasculares e etnia. Apesar da PIO não ser o único fator de risco associado ao glaucoma, é o principal fator modificável, estando diretamente relacionado à morte de células da retina, e se não for tratado, resulta na progressão da doença em 70% de todos os casos (Saccà, et. al., 2014). A redução da PIO pode prevenir o desenvolvimento do glaucoma em

indivíduos com PIO elevada e reduzir a progressão nos pacientes com doença em estágio inicial.

O tratamento do glaucoma é realizado preservando-se a visão, retardando o dano ao nervo óptico através da redução da PIO. Pode ser constituído de um tratamento farmacológico, a laser ou por intermédio de um procedimento cirúrgico. Dentre estes, o tratamento farmacológico é o mais utilizado e é realizado instilando-se colírios no olho afetado (Mckinnon et al., 2008).

O uso de colírios, porém, pode apresentar diversos inconvenientes, pois possuem baixa adesão, devido ao desconforto e dificuldade na instilação, além de apresentarem baixa biodisponibilidade ocular devido a drenagem pelo ducto nasolacrimal e apresentarem uma exposição sistêmica desnecessária, podendo conduzir a efeitos colaterais (HUGHES, 2003; EM. del Amo e URTTI, 2008; Kulkarni et al., 2008).

Uma opção para substituir o tratamento convencional é a utilização de sistemas de liberação controlada de fármacos (SLCF) sob a forma de insertes oculares, pode ser uma alternativa eficiente, uma vez que os SLCF podem fornecer níveis terapêuticamente eficazes e constantes por um longo período de tempo (E.M. del Amo et al., 2008; RIOS, 2005). Além disso, ocasionam a diminuição dos efeitos sistêmicos secundários, aumentando a adesão do paciente ao eliminar a necessidade de tomar múltiplas doses, melhorando assim os resultados da terapia (BOURGES et al., 2006).

Uma substância de interesse para o desenvolvimento de SLCF é a quitosana, um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação da quitina, com diversas aplicações médicas conhecidas, por ser biocompatível, biodegradável, bioativo e com características antissépticas (RINAUDO, 2006). Devido a essas características apresenta larga aplicação no desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada para fármacos.

Porém, apesar de suas qualidades, sua aplicação se torna limitada devido às suas propriedades hidrofóbicas, que conferem uma baixa solubilidade e podem resultar em uma pobre fixação celular em sua estrutura desprotonada. Para o aperfeiçoamento da utilização da quitosana é necessário a protonação do nitrogênio

do grupo amino no carbono 2 do anel piranosídico. Para esta protonação, pode-se utilizar ácidos (orgânicos ou minerais) que doam seus prótons e facilitam tanto a solubilidade do quitosana como suas propriedades de adesão/fixação celular. Uma possibilidade para esta protonação pode ser a utilização do sulfato de condroitina. Esta substancia pode reagir com a quitosana, na forma de um par iônico e formar membranas com uma maior hidrofiliçidade, por exemplo, melhorando a mucoadesão e otimizando o potencial dos insertes.

O sulfato de condroitina (SC) é um copolímero alternado de (1,4) D glicurônico e (1,3)-N-acetil-D-galactosamina, pertencente à família dos glicosaminoglicanos (GAG). É um dos principais componentes da matriz extracelular, sendo abundante e amplamente distribuídos em seres vivos e possuindo um papel importante em processos biológicos. Assim como a quitosana, é um polissacarídeo atóxico, biocompatível, biodegradável e com características mucoadesivas(VOLPI, 2006).

Portanto, considerando a dificuldade na terapia dos antiglaucomatosos, a baixa solubilidade do quitosana, a possibilidade de se produzir um dispositivo polimérico com quitosana e condroitina para veiculação ocular levou ao desenvolvimento deste trabalho. Assim, esse trabalho teve como motivação a otimização do tratamento do glaucoma, através do desenvolvimento de um sistema polimérico com capacidade de liberação prolongada de forma segura e biocompatível, na forma de um inserte para a veiculação de uma substância antiglaucomatosa.

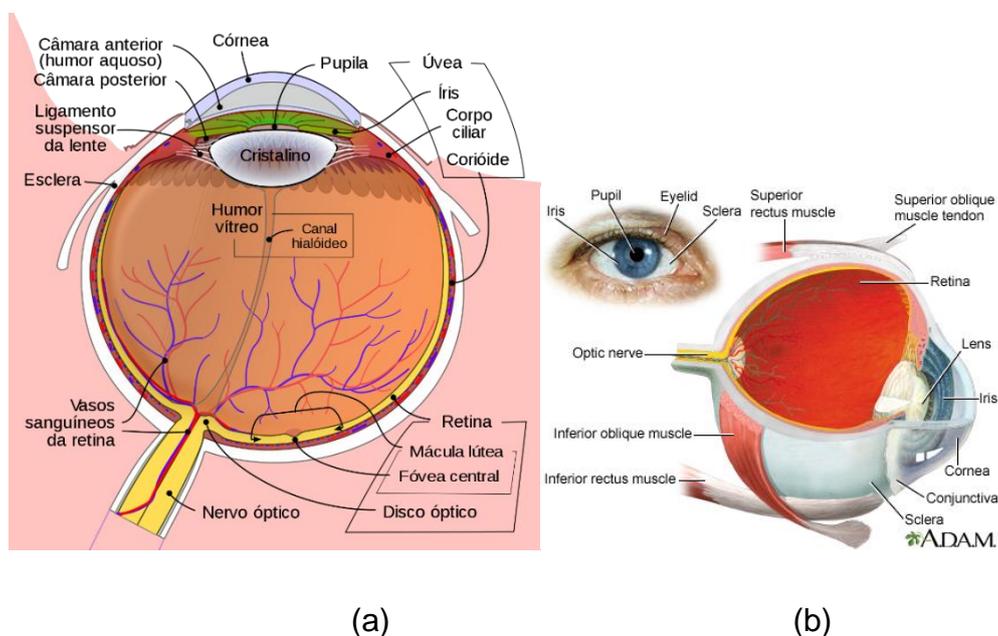
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomia Ocular

O olho humano é um órgão sensorial especializado que se encontra relativamente isolado do acesso sistêmico pelas barreiras hematorretiniana, hematoaquosa e hematovítrea (Goodman 12 ed.). Todo o conjunto que compõe a visão humana é chamada de globo ocular.

Pode ser dividido em dois segmentos, o anterior e o posterior, como ilustrado na **Figura 1**. No segmento anterior estão a córnea, o limbo, as câmaras anterior e posterior, a rede trabecular, o canal de Schlemm, a íris, o cristalino, a zônula e o corpo ciliar. Já o segmento posterior é constituído pelo humor vítreo, retina, coriódio e nervo óptico (HENDERER e RAPUANO, 2006). As câmaras anterior e posterior do olho são preenchidas por um fluido claro chamado humor aquoso (Cassin B, 2011).

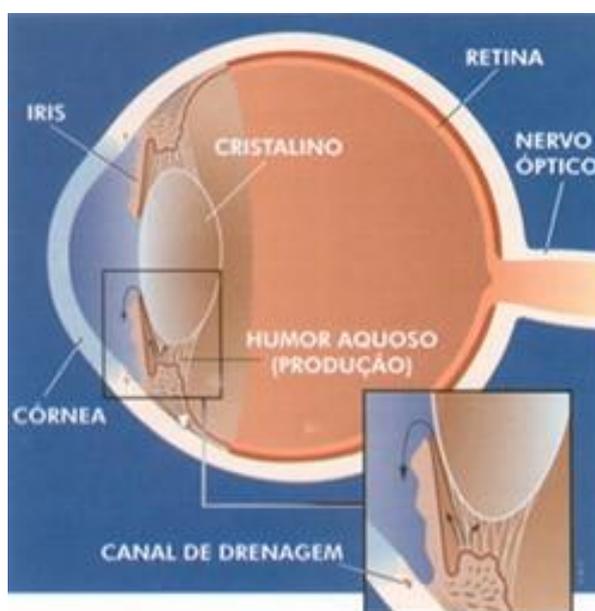
Figura 1: Anatomia do olho humano



O humor aquoso, **Figura 2**, tem a função de nutrir a córnea e a lente e mantém uma pressão hidrostática conveniente para o olho (BICAS, 2007). Ele é produzido incessantemente, em uma quantidade média de 3mL por dia, no processo

ciliar, uma região recoberta por uma camada de células epiteliais, que transportam ativamente o humor aquoso desses processos ciliares para a parte posterior da córnea e para parte anterior da íris (KAUFMAN, 2004). Para manter a pressão do globo ocular constante, o humor vítreo é drenado da região trabecular para um vaso chamado "canal de schlemm", que circunda todo o olho, o qual está ligado à veia episcleral pelo aqueduto venoso (MACKNIGHT, 2000). Essa área é chamada de ângulo da câmara anterior ou ângulo. (CASSIN, B. 2011)

Figura 2: Humor aquoso, produção e escoamento.



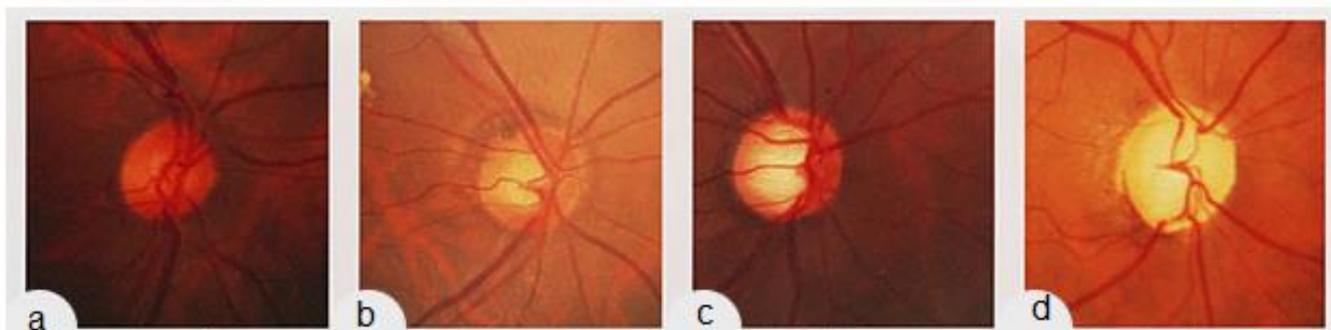
Fonte: Instituto dos Olhos de Belo Horizonte, disponível em <http://www.iobh.com.br/glaucoma>

A pressão intraocular (PIO) é a pressão que os líquidos exercem sobre o revestimento do olho. Normalmente, a PIO é estabelecida por um equilíbrio na produção do humor aquoso pelo corpo ciliar, na câmara posterior do olho, e a drenagem através do sistema de escoamento interno. O componente responsável pelo sistema de drenagem é a malha trabecular, localizada no ângulo (CASSIN, B. 2011). Quando ocorre um desequilíbrio entre a produção e o escoamento do humor aquoso, é gerada uma alteração na PIO, sendo o aumento da PIO o principal fator de risco de surgimento do glaucoma.

2.2 Glaucoma

Glaucoma é o termo de designação genérica para um grupo de neuropatias ópticas crônicas que têm em comum uma degeneração progressiva e lenta de células ganglionares da retina e seus axônios, resultando em uma aparência distinta do nervo óptico (**Figura 3**) e em uma perda visual gradativa (WEINREB *et al.*, 2004; CASSON *et al.*, 2012; MANTRAVADI *et al.*, 2015). Pode-se descrever o aspecto característico da neuropatia óptica como escavação focal ou adquirida ou perda generalizada de tecido neural da retina. O mecanismo para incitação da cascata de dano celular ainda não é claro e está provavelmente relacionado a uma complexa interação de diversos fatores, incluindo susceptibilidades estruturais e vasculares.

Figura 3: Comparação da progressão do dano ao nervo óptico. (A) disco óptico saudável, (b) primeiros estágios da degradação do disco óptico, (c) estágio intermediário e (d) estágio avançado de degradação do disco óptico de um indivíduo glaucomatoso.



Fonte: Chika Ohara Eye Clinic, Fukuoka, Japão. Retirado do site: <http://oharachika-ganka.com/en/guide/glaucoma.html> em 16/12/2018.

2.2.1 Epidemiologia

Estimou-se que em 2017, o número de pessoas portadoras de glaucoma em todo o mundo equivaleu a 66,8 milhões (Conlon, 2017). Quigley e Broman (2006) estimam que em 2020 esse número deverá atingir cerca de 80 milhões de pessoas, devido ao aumento da proporção de pessoas com maior idade. Dentro esses indivíduos, 74% serão portadores do glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA), sendo provável que aproximadamente 11,2 milhões deles apresentem cegueira bilateral secundária ao glaucoma.

No Brasil, há escassez de informações quanto à prevalência do glaucoma. Segundo a Sociedade Brasileira de Glaucoma a doença atinge 2% dos brasileiros acima dos 40 anos de idade, representando cerca de 1 milhão de pessoas e observa-se um aumento da prevalência conforme o aumento da idade. A maioria dos afetados é do sexo feminino, com média de idade de 63 anos e são portadoras de outras doenças crônicas, como diabetes e hipertensão.

De acordo com a Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES-MG), no ano de 2018, foram diagnosticados 16 mil pacientes com a doença no estado. Porém, por se tratar de uma patologia sem notificação obrigatória é provável que esse número seja ainda maior.

Essa é uma doença de interesse, pois é a segunda maior causa de cegueira em todo o mundo, perdendo apenas da catarata (**Figura 4**).

Figura 4: Causas da Cegueira.



Fonte: Adaptado de RESNIKOFF, 2004.

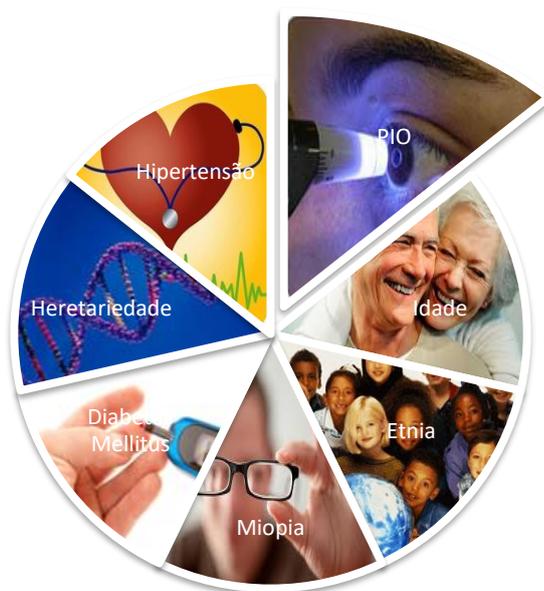
2.2.2 Prevalência

Entre as regiões do mundo, existem diferenças marcantes no número de pessoas afetadas pelo glaucoma. A prevalência de glaucoma de ângulo aberto (GPAA) é maior na África, 20%, e a prevalência de glaucoma agudo (GPAF) é mais elevada na Ásia, 1,09%. Pessoas de ascendência africana são mais propensas a ter GPAA que pessoas de ascendência europeia. Além disso, pessoas que vivem em áreas urbanas são mais propensas a ter GPAA que pessoas que vivem em áreas rurais. (Tham, Yih-Chung et al., 2014)

2.2.3 Fatores de Risco

Os principais fatores de risco identificados para o glaucoma, descritos na **Figura 5**, são o aumento da PIO, a idade avançada (sendo considerado avançado acima de 40 anos), a etnia (sendo a etnia negra para o de ângulo aberto e amarela para o de ângulo fechado), a presença de miopia, o histórico familiar, diabetes mellitus, distúrbios cardiovasculares, hipertensão arterial e paquimetria – menor espessura da córnea (SILVA et al., 2004; CASSON et al., 2012; MANTRAVADI et al., 2015).

Figura 5: Principais fatores de risco para Glaucoma, em sentido horário: PIO, idade, etnia, miopia, diabetes mellitus, hereditariedade, hipertensão.



2.2.4 Classificação

O glaucoma não é uma entidade única, e é por vezes referida no plural, como os glaucomas. Todas as formas são potencialmente progressivas, podendo conduzir à cegueira (Casson et al; 2012).

Segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Glaucoma, o mesmo pode ser classificado das seguintes formas: glaucoma de ângulo aberto (GPAA), glaucoma de pressão normal (GPN), glaucoma primário de ângulo fechado (GPAF), glaucoma congênito e glaucoma secundário, conforme pode ser observado na **Tabela 1**.

Tabela 1: Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à saúde (CID- 10) - Código e classificação dos tipos de Glaucoma - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Glaucoma

CLASSIFICAÇÃO ESTATÍSTICA INTERNACIONAL DE DOENÇAS E PROBLEMAS RELACIONADOS À SAÚDE (CID-10)	
H 40.1	Glaucoma primário de ângulo aberto
H 40.2	Glaucoma primário de ângulo fechado
H 40.3	Glaucoma secundário a traumatismo ocular
H 40.4	Glaucoma secundário a inflamação ocular
H 40.5	Glaucoma secundário a outros transtornos do olho
H 40.6	Glaucoma secundário a drogas
H 40.8	Outro glaucoma
Q15.0	Glaucoma congênito

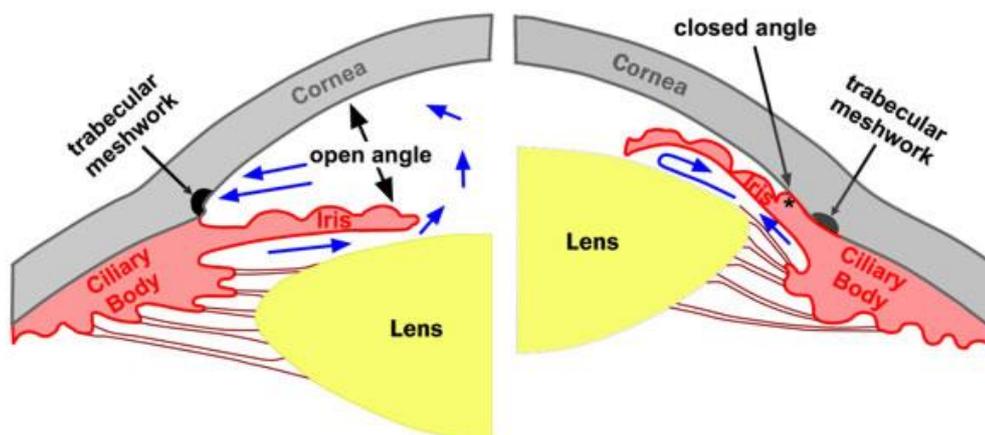
Fonte: Portaria Conjunta nº 11, de 02 de abril de 2018

Os principais tipos de glaucoma descritos são o glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) e o glaucoma primário de ângulo fechado (GPAF), sendo o GPAA a forma mais comum de glaucoma.

A diferença entre esses tipos está no ângulo da câmara anterior. No GPAA, o ângulo da câmara anterior do olho permanece aberto, já no GPAF ocorre o

fechamento do ângulo da câmara anterior (LEE *et al.*, 2005), conforme ilustrado na **Figura 6**.

Figura 6: Diferença entre glaucoma de ângulo aberto (GPAA) e glaucoma de ângulo fechado (GPAF)



Fonte: American Glaucoma Society

Para diferenciar os tipos de glaucoma, pode ser utilizado um procedimento conhecido como gonioscopia, esse procedimento se baseia no exame da câmara anterior com o auxílio de uma lente, que permite que o observador visualize o ângulo entre a córnea e a íris (Almeida, HC 2015; Mantravadi *et al.*, 2015)

Se o glaucoma se desenvolve em um olho sem nenhuma doença pré-existente, é considerado glaucoma primário. Se o mesmo se desenvolve em um olho com uma doença preexistente, o paciente é diagnosticado com glaucoma secundário (LEE *et al.*, 2005).

2.2.5 Glaucoma Primário de Ângulo Aberto (GPAA)

O GPAA é uma doença crônica normalmente assintomática, caracterizada pela perda lenta, progressiva, irreversível e usualmente indolor da visão periférica. Os pacientes podem notar uma perda gradual da visão periférica, ou "visão de túnel", ilustrada na **Figura 7**. Essa visão característica ocorre após a perda de mais de 40% das fibras nervosas (WESTON *et al.*, 2010; VAUGHAN *et al.*, 1999).

Figura 7: Exemplo da progressão da perda de campo visual de pacientes portadores de glaucoma.

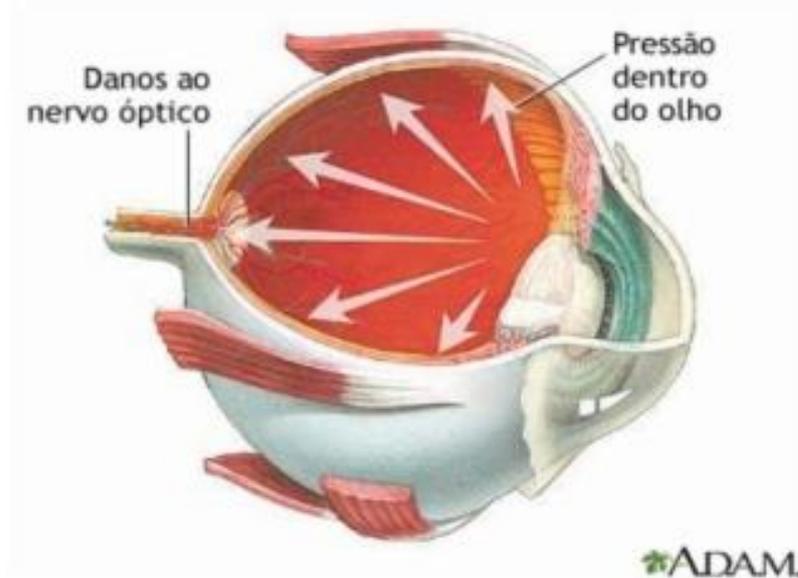


Fonte: www.keepingussafe.org/glaucoma-older-driver-safety/

O glaucoma de ângulo aberto é usualmente bilateral e assimétrico (BROMAN et al., 2008), possuindo como principal fator de risco a elevação da PIO. O GPAA, pode ser diagnosticado por presença de PIO superior a 21mmHg associada a dano no nervo óptico ou a defeito no campo visual compatível com glaucoma e ausência de anormalidades na câmara anterior e de anormalidades sistêmicas ou oculares que possam aumentar a PIO (Protocolo Brasileiro Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Glaucoma 2018).

A PIO, demonstrada na **Figura 8**, é a pressão que os líquidos exercem sobre o revestimento do olho. Normalmente, é estabelecida por um equilíbrio na produção do humor aquoso pelo corpo ciliar, na câmara posterior do olho, e na drenagem através do sistema de escoamento interno.

Figura 8: Aumento da pressão intraocular e danos ao nervo óptico



Fonte: Adaptado de A.D.A.M. Education, disponível em <https://medlineplus.gov/ency/article/001620.htm>

O componente responsável pelo sistema de escoamento/drenagem é a malha trabecular localizada em uma área denominada ângulo. No GPAA, o maior local de resistência de escoamento do humor aquoso está na malha trabecular. Como consequência desse escoamento falho, ocorre a elevação da pressão ocular interna.

A relação entre o nível de pressão e o fluxo sanguíneo pode levar a um estresse na cabeça do nervo óptico e na esclera, levando assim à formação de uma lesão glaucomatosa (Quigley, 2011). A taxa à qual os pacientes com elevada PIO desenvolvem lesão do nervo óptico no glaucoma é de cerca de 1 por cento por ano (American Academy of Ophthalmology, 2000)

2.2.6 Glaucoma de Ângulo Fechado (GAF)

O glaucoma de ângulo fechado (GAF) é causado pela obstrução da malha trabecular, resultando na redução da drenagem do humor aquoso através do ângulo da câmara anterior. Usualmente, essa obstrução ocorre fisicamente pela íris, que pode ser puxada ou empurrada para a câmara anterior (Patel et al., 2014). A obstrução ocorre de forma aguda, levando a um rápido aumento da PIO e a uma aguda perda visual, requerendo uma urgente intervenção.

Ao contrário do GPAA, pacientes com GAF agudo normalmente apresentam sintomas, que podem ser descritos como um súbito embaçamento da visão, vermelhidão ocular, hiperemia e dor. Alguns pacientes relatam a formação de halos ao redor da luz, característica secundária a um edema na córnea devido ao aumento agudo da PIO. O súbito aumento da PIO também pode causar dores de cabeça, náuseas e vômitos (Mantravadi et al.,2015).

Pode-se classificar o glaucoma de ângulo fechado de acordo com a etiologia do fechamento do ângulo. Diz-se glaucoma de ângulo fechado primário (GPAF) aqueles que não possuem nenhum mecanismo causal que leva ao fechamento do ângulo. Já o glaucoma de ângulo fechado secundário (GSAF) refere-se aos GAF que possuem mecanismos identificáveis para a superposição da íris sobre o ângulo, ou o fechamento direto do ângulo pelo bloqueio da malha trabecular.

O glaucoma de ângulo fechado primário é causado por bloqueio da pupila em 90% dos casos. Esse bloqueio se dá devido à aposição da íris contra a lente, restringindo o fluxo de humor aquoso da câmara posterior para a anterior e sua subsequente drenagem pela malha trabecular. Isso pode acontecer de forma aguda, intermitente ou cronicamente. Os tipos mais comuns de GAF primário são o GAF agudo, subagudo (ou intermitente), estreitamento da câmara anterior e o íris platô sendo esse último o único tipo de GAF primário que ocorre sem bloqueio da pupila (Patel et al. 2014).

O glaucoma de ângulo fechado secundário pode ser dividido em dois grupos GSAF com bloqueio de pupila, e o GSAF sem bloqueio da pupila. (Patel et al., 2004; Schwartz e Budenz, 2004; Saccà, et. al., 2014).

2.2.7 Diagnóstico

O diagnóstico do glaucoma representa um desafio devido à ausência de sintomas iniciais, o que frequentemente resulta em um atraso na detecção da doença e no início do tratamento. Tal atraso no diagnóstico leva a uma maior chance de progressão da doença e evolução para a cegueira (Chenn PP; 2004).

Segundo o Protocolo Brasileiro Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Glaucoma, a avaliação oftalmológica do paciente deve ser binocular e deve abordar os seguintes itens para o diagnóstico do glaucoma e para a determinação da sua gravidade:

- Anamnese;
- Medida da acuidade visual com melhor correção;
- Exame pupilar para avaliação de reatividade à luz e procura de defeito pupilar aferente relativo;
- Biomicroscopia de segmento anterior para avaliação da profundidade da câmara anterior, de doenças corneanas ou de causas secundárias para o aumento da PIO;
- Aferição da PIO, idealmente medida com tonometria de aplanção de Goldmann, em diferentes dias e horários, para reconhecimento da flutuação diária;
- Avaliação do nervo óptico e da camada de fibras nervosas para o fornecimento de informações estruturais sobre o dano glaucomatoso.
- O nervo óptico deve ser avaliado com biomicroscopia de fundo e fundoscopia sob midríase e ser documentado, idealmente, com retinografia colorida binocular, sendo a aferição da PIO o exame padrão.

2.2.8 Aferição da PIO

A aferição da PIO é um exame básico e essencial para o tratamento e acompanhamento de pacientes com glaucoma. Os métodos de aplanção mais utilizados são o de Goldmann, Perkins, Tono-Pen e o de sopro, também conhecido por pneumotonômetro. O tonômetro de Perkins e o Tono-Pen são portáteis, o que permite medir a PIO em várias posições.

O tonômetro de aplanção de Goldmann (TAG), demonstrado na **Figura 9**, é considerado como o padrão-ouro para a aferição da PIO. O princípio de eficácia do tonômetro de aplanção baseia-se no Princípio de Goldmann: medição da força necessária para manter uma aplanção sempre uniforme da superfície da córnea. A medição exata da superfície de aplanção é realizada com a lâmpada de fenda com

uma ampliação de 10x. A medição da pressão é realizada com a lâmpada de fenda com os pacientes sentados e serve como exame de rotina num microscópio de lâmpada de fenda comum.

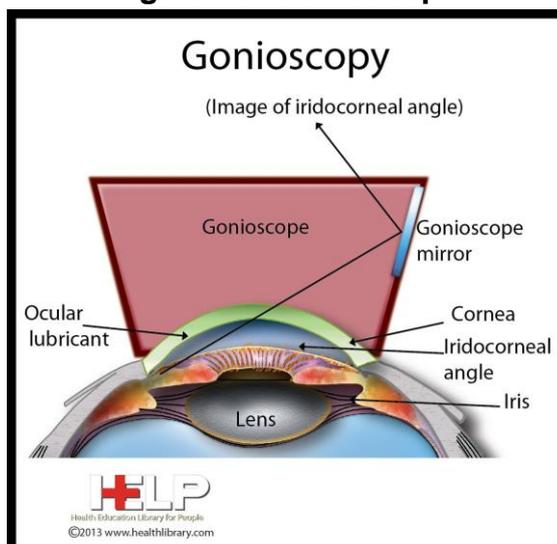
Figura 9: Tonômetro de Goldman



Fonte: retirado de <[http://www.aptomed.com.br/canal/Oftalmologia/Exames-e-Procedimentos-Oftalmologicos/Tonometria---Medida-da-Pressao-Intra-Ocular-\(PIO\)](http://www.aptomed.com.br/canal/Oftalmologia/Exames-e-Procedimentos-Oftalmologicos/Tonometria---Medida-da-Pressao-Intra-Ocular-(PIO))> em 20/12/2018

Caso ocorra a suspeita de glaucoma, devem ser realizados outros exames como forma de complementar a investigação diagnóstica, determinando a gravidade e o tipo de glaucoma encontrado. Dentre esses exames podemos citar a gonioscopia, a paquimetria ultrassônica e a capimetria visual.

A gonioscopia, **Figura 10**, avalia o ângulo iridocorneano, identificando a amplitude do ângulo da câmara anterior, o grau de pigmentação, a altura da inserção iriana e a configuração da íris. O diagnóstico do GPAA requer uma gonioscopia para excluir o fechamento angular e outras causas de aumento da PIO, como recesso angular, dispersão pigmentar, sinéquias anteriores periféricas, neovascularização de ângulo e precipitados inflamatórios.

Figura 10: Gonioscopia

Fonte: Health Education Library for People, disponível em <<http://www.healthlibrary.com>> acessado em 20/12/2018

A Paquimetria Ultrassônica é indicada para medir a espessura da córnea por meio de uma sonda de ultrassom.

A campimetria visual é o exame padrão-ouro para detectar o dano funcional do glaucoma e para monitorizar sua progressão. Consiste em avaliar a percepção visual central e periférica, possibilitando assim a análise da capacidade de visão.

2.3 Tratamento

O principal fator de risco modificável relacionado ao glaucoma é o aumento da PIO, que está ligado à apoptose das células ganglionares da retina. Sem tratamento, leva ao avanço da doença em 70% das ocorrências. A diminuição da PIO pode diminuir o avanço da doença em estágio inicial e evitar que se desenvolva naquelas pessoas com PIO acima do normal (WEINREB *et al.*, 2004; Saccà *et al.*, 2014). A diminuição da PIO constitui a única intervenção, já demonstrada, que evita a perda de visão resultante do glaucoma (Conselho Internacional de Oftalmologia | Diretrizes para Tratamento Ocular do Glaucoma).

O controle permanente do glaucoma depende da capacidade de avaliar a resposta ao tratamento e de detectar o avanço e a instabilidade da doença (ICO Glaucoma Guidelines 2005).

A estratégia utilizada para redução da PIO consiste em tratamento farmacológico ou procedimentos cirúrgicos e a laser. Segundo a Sociedade Europeia de Glaucoma deve-se iniciar o tratamento de forma medicamentosa e, caso o tratamento farmacológico não seja eficaz deve-se fazer uso da trabeculoplastia (laser). Se ainda não for suficiente, é indicada a realização de uma trabeculectomia (cirurgia) (COLEMAN, 1999).

2.3.1 Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas

O ministério da Saúde liberou em 2018 a PORTARIA CONJUNTA Nº 11, DE 02 DE ABRIL DE 2018, que aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Glaucoma. Tal protocolo visa estabelecer os critérios diagnósticos e terapêuticos do glaucoma.

Tal protocolo preconiza que antes do início do tratamento, deve ser realizado exame oftalmológico completo com a documentação do nervo óptico com retinografia binocular colorida, campimetria visual, paquimetria, avaliação do fundo de olho e medição da PIO basal. Apesar de o tratamento não se restringir ao tratamento farmacológico tópico, muitas vezes necessitando de intervenção cirúrgica e a laser, esse protocolo restringe-se a estabelecer as condutas medicamentosas.

2.3.2 O tratamento cirúrgico e a laser

Apesar de não descritos no protocolo clínico e diretrizes terapêuticas do glaucoma e de ser menos usual, o tratamento do glaucoma pode ser realizado através de tratamento cirúrgico e a laser.

A trabeculoplastia a laser e trabeculectomia são procedimentos cirúrgicos ambulatoriais. Esses procedimentos são indicados quando a PIO ideal não pode ser alcançada clinicamente, quando o dano do nervo óptico progride apesar de atingir a

pressão intraocular determinada com a terapia médica, ou quando o paciente é incapaz de cumprir ou tolerar a terapia médica. (The Glaucoma Laser Trial, 1995)

A trabeculoplastia é uma modalidade de laser usualmente utilizada para o tratamento do glaucoma de ângulo aberto. Ela consiste no direcionamento da energia do laser para a malha trabecular, com o intuito de aumentar a drenagem do humor aquoso e, assim, reduzir a PIO (Mantravadi et al.,2015). A trabeculoplastia a laser é uma terapia eficiente e segura, porém se torna impraticável para alguns pacientes devido ao alto custo e ao elevado risco de efeitos adversos (Vaughan al., 1999). A trabeculoplastia por laser de argônio é contraindicada para GAC quando o olho possui mais de 90 graus de fechamento do ângulo. (Coleman, A. 1999)

A iridotomia periférica é outro tipo de tratamento a laser, sendo indicado para o glaucoma de ângulo fechado. Consiste na criação de uma microscópica abertura na câmara anterior, com o objetivo de aliviar a obstrução da passagem aquosa da câmara posterior para a anterior e permitir o acesso à rede trabecular, permitindo assim o escoamento. A iridotomia também pode ser utilizada profilaticamente em olhos com ângulos de câmara anterior estreitos ou aglomeradas, que consideram-se ter mais risco de desenvolver glaucoma de ângulo fechado em algum momento na vida (Mantravadi et al.,2015)

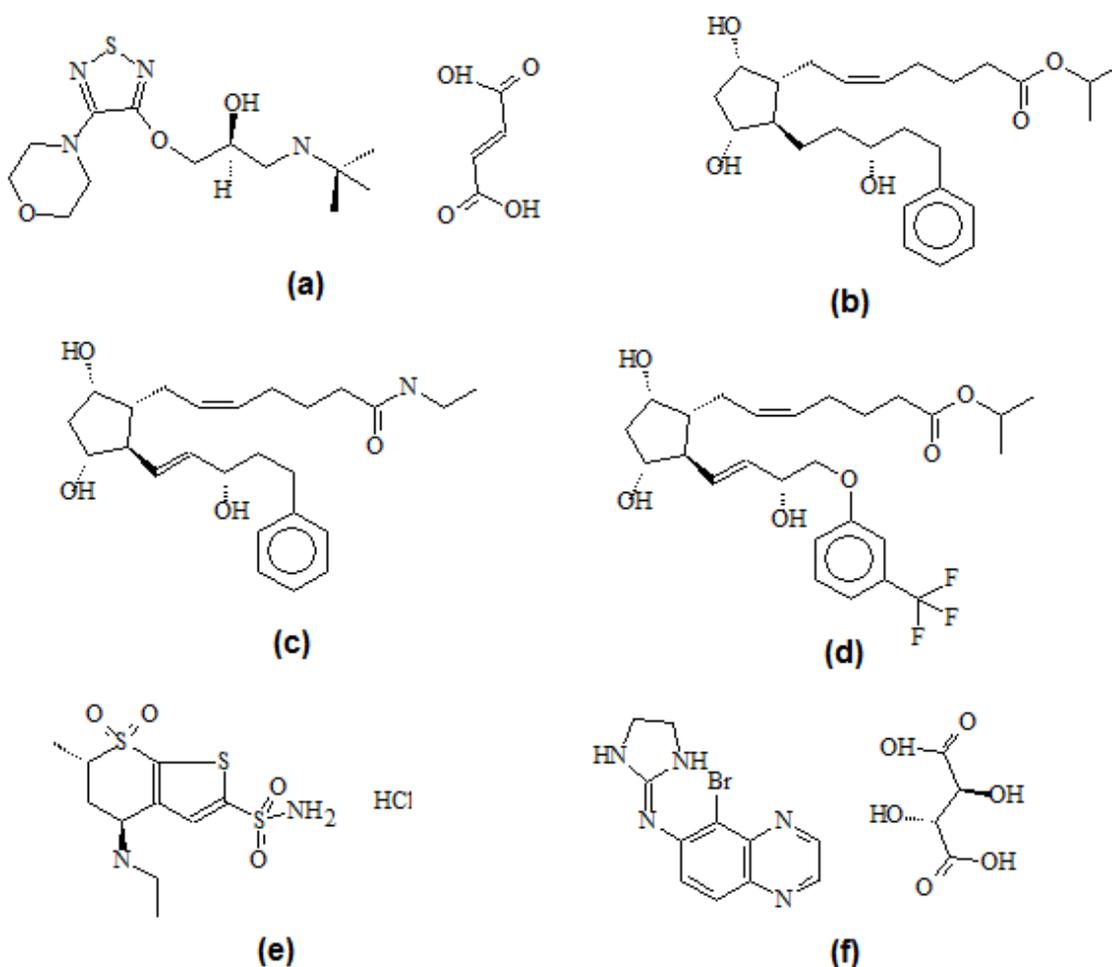
A trabeculectomia é um procedimento invasivo, que possui riscos visuais importantes e é normalmente reservado para pacientes nos quais a terapia médica e a laser falharam. Esse tratamento se baseia na remoção de uma porção da malha trabecular e tecidos adjacentes com o intuito de aumentar a drenagem do humor aquoso.

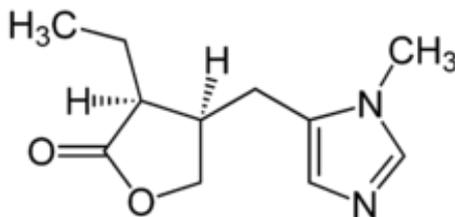
Tanto a trabeculoplastia quanto a trabeculectomia são tratamentos utilizados apenas em último caso, devido ao alto custo, aos riscos associados e aos efeitos adversos desses procedimentos. Dessa forma, a primeira escolha para o tratamento do glaucoma é o farmacológico.

2.3.3 Tratamento Farmacológico

Usualmente, os fármacos de uso tópico ocular e de uso oral são as primeiras escolhas para o tratamento de glaucoma, principalmente no caso de GPAA. Atualmente, são utilizadas cinco principais categorias de fármacos para a redução da PIO: os betabloqueadores, os análogos de prostaglandinas, (**Figura 11, b, c e d**), os inibidores de anidrase carbônica (**Figura 11 e**), os agonistas α -2 seletivos (**Figura 11f**) e os agentes colinérgicos (parassimpaticomiméticos) (**Figura 11g**) (PARANHOS *et al.*, 2009; MCKINNON *et al.*, 2008).

Figura 11 – Estrutura química do betabloqueador maleato de timolol (a), dos análogos de prostaglandinas latanoprost (b), bimatoprost (c) e travoprost (d), do inibidor de anidrase carbônica cloridrato de dorzolamida (e), do agonista α -2 seletivo tartarato de brimonidina (f) e do agente colinérgico pilocarpina(g)





(g)

Os principais fármacos utilizados, seu mecanismo de ação, capacidade de redução da PIO e efeitos adversos podem ser observados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Tabela com os principais fármacos, sua ação e efeitos adversos.

Classe	Nomes Genéricos	Mecanismo de Ação	Redução da PIO	Efeitos Adversos
Betabloqueadores	Timolol, carteolol, betaxolol, metipranolol	Diminuição da produção de humor aquoso	20% - 25%	Insuficiência cardíaca congestiva, broncoespasmo, bradicardia, depressão, impotência.
Agentes colinérgicos	Pilocarpina Carbachol	Aumento da drenagem do humor aquoso	20-25%	Náusea, vômito, diarreia, aumento miopia, diminuição da visão
Análogos de prostaglandinas e prostamidas	Latanoprost, Bimatoprost	Aumento da drenagem do humor aquoso	25%-33%	Pigmentação da íris, hipertricose dos cílios.
Agonistas α -2 seletivos	Epinefrina, brimonidina	Diminuição da produção de humor aquoso e aumento da drenagem do humor aquoso	20% - 25%	Aumento da pressão, dor de cabeça, reações alérgicas, fadiga.

Inibidores de anidrase carbônica	Dorzolamida, metazolamida	Diminuição da produção de humor aquoso	15%-20%	Mal-estar, depressão, cálculo renal, anorexia.
----------------------------------	---------------------------	--	---------	--

Fonte: adaptado de Mantravadi et al., 2015

Segundo a Portaria GM/MS 1.554/2013, a solução oftálmica de maleato de timolol 5,0mg/mL e de pilocarpina 20mg/mL constituem a primeira linha de tratamento do glaucoma. Na lista de medicamentos essenciais da World Health Organization (WHO), constam a acetazolamida, comprimido de 250mg, solução de latanoprostá (colírio): 50 microgramas/mL, solução de pilocarpina (colírio): 2%; 4% e solução de timolol (colírio): 0,25%; 0,5%.

Os betabloqueadores constituem a principal classe dos medicamentos utilizados no tratamento do glaucoma, e podem ser divididos em não seletivos e beta-1 seletivos. Os betabloqueadores não seletivos (timolol, metipranolol, carteolol) têm capacidade de redução média da PIO de 25%. Os beta-1 seletivos (betaxolol) têm menor capacidade de redução da PIO (Leske et al., 1994). O mecanismo de ação desses fármacos se baseia na redução da produção do humor aquoso por meio da atuação nos processos ciliares, na perfusão capilar e na inibição da produção de adenosina monofosfato cíclico estimulada pelas catecolaminas.

Por outro lado, a utilização de novas substâncias para tratamento de doenças já conhecidas pode ser de também, um dos métodos inovadores para enriquecer o arsenal terapêutico e também ampliar as formas de tratamento de doenças conhecidas, como o glaucoma. Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado há 7 anos com uma substância derivada das benzamidinas, denominada substância SAF14, que tem apresentado resultados promissores quando submetida aos testes para antiglaucomatosos. Esta benzamidina não apresenta nenhum tipo de mecanismo semelhante aos anteriormente descritos para os antiglaucomatosos. Este fato tem tornado as pesquisas com esta substância promissoras, tanto que proporcionou um depósito de criação protegida na forma de patente (protocolo: BR1020180705644). Apesar da inovação na área farmacêutica ser imprescindível, do ponto de vista de manutenção de polos industriais, a maioria dos tratamentos oftálmicos é realizada

através da administração de formas farmacêuticas ditas convencionais. São utilizadas administração tópica de soluções aquosas, suspensões aquosas ou pomadas para fármaco insolúveis (HUGHES, 2003). As principais deficiências destas formas de dosagem convencionais incluem a baixa biodisponibilidade ocular, a exposição sistêmica desnecessária, devido à drenagem do canal lacrimonasal, e a baixa absorção do ativo pelo segmento posterior do olho (EM. del Amo e URTTI, 2008).

Além disso, a necessidade de instilações frequentes para obtenção do efeito terapêutico adequado pode levar a sérios problemas de adesão por parte dos pacientes, devido à dificuldade de aplicação, ao desconforto gerado e ao esquecimento, visto que a maioria dos pacientes são de idade mais avançada (Kahook, 2007; Kulkarni *et al.*, 2008).

A otimização do tratamento pode ser alcançada por meio da redução da frequência de aplicação, levando a uma maior adesão do paciente (RAFUSE *et al.*, 2009). Uma estratégia utilizada para atingir tal fim são os sistemas de liberação prolongada de fármacos (SLPFs).

2.4 Sistemas de liberação prolongada de fármacos

Os sistemas de liberação prolongada podem ser desenvolvidos com intuito de liberarem um composto de interesse de forma gradual, mantendo a concentração constante terapeuticamente ativa dos compostos no tecido alvo com flutuações mínimas, por um período de tempo prolongado. Os sistemas de liberação prolongada de fármacos (SLPFs) possuem grandes vantagens em relação às formas de dosagem convencionais, como taxas de liberação previsíveis e reprodutíveis durante um longo período de tempo; proteção de compostos bioativos que possuem uma meia-vida muito curta, além de não necessitarem de administrações frequentes se comparadas às convencionais, aumentando a adesão do paciente ao tratamento, e conseqüentemente, levando a uma terapia otimizada; estes sistemas também podem ser a solução de problemas de estabilidade do fármaco (RIOS, 2005; KUMAR *et al.*, 2001).

Por diminuírem o número de aplicações necessárias, os SLPFs são recomendados no tratamento de doenças crônicas, como o glaucoma. SLPFs na

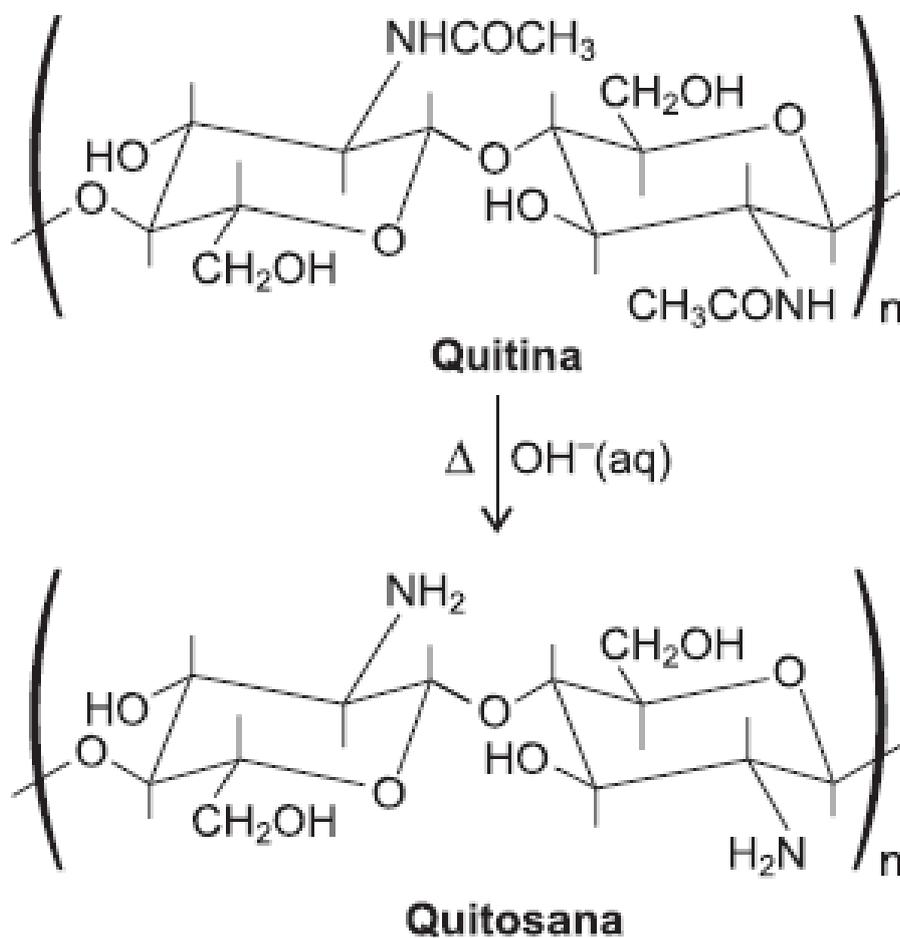
forma de implantes oculares são capazes de fornecer quantidades terapêuticamente eficazes de fármacos para o tecido alvo por um período de tempo prolongado, com uma menor exposição sistêmica, aumentando a adesão ao tratamento e diminuindo os efeitos adversos (NATU *et al.* 2011; BOURGES *et al.*, 2006; E.M. del Amo *et al.*, 2008). Estes SLPFs podem ser obtidos a partir de diversos excipientes farmacotécnicos que formam diferentes formas farmacêuticas, como lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, comprimidos, emulsões, suspensões e polímeros.

Os polímeros são materiais compostos por diversas unidades formando moléculas grandes (macromoléculas). Estas, por sua vez, são capazes de alterar perfis de liberação de fármacos normalmente utilizados em formas farmacêuticas convencionais, como os colírios. Dentre os diversos polímeros descritos na literatura, encontram-se polímeros naturais que apresentam biocompatibilidade, biodegradação, custo relativamente baixo e que podem ter outras atividades benéficas a um sistema de liberação controlada, como a mucoadesão. Um dos polímeros com esta característica mais utilizados na literatura para desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada de fármacos é o quitosana.

2.4.1 Quitosana

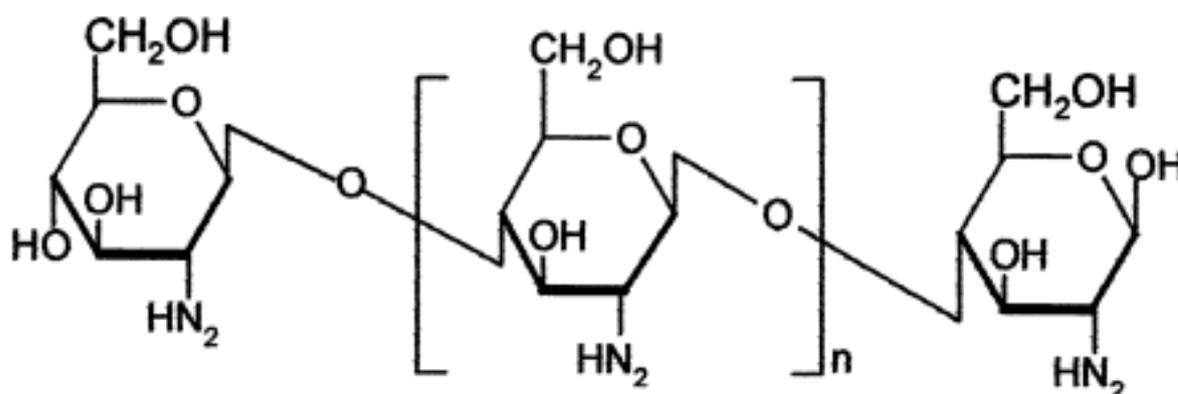
A quitosana é obtida a partir da quitina (poli (b- (1-4) -N-acetil-D-glicosamina), um polímero presente no exoesqueleto de insetos e crustáceos. A quitina é sintetizada por um grande número de organismos vivos sendo o polímero mais abundante depois da celulose (RINAUDO, 2006; MURA, *et al.*, 2011). O isolamento da quitina inclui duas etapas: a desmineralização com HCl e a desprotonação com uma solução aquosa de NaOH. Após extração, a quitina é desacetilada para obtenção da quitosana (FIGURA 12) (Agrawal *et al.* 2004).

Figura 12: Obtenção da Quitosana através da Quitina



A quitosana (**Figura 13**) é um copolímero catiônico de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina, variando em composição, sequência e comprimento da cadeia molecular (AGRAWAL, et al 2010). Ele é um polímero biocompatível, biodegradável e não tóxico (RINAUDO, 2006; MURA, *et al.*, 2011).

Figura 13: Estrutura Química da Quitosana



Fonte: Kumar et al 2004

Apesar de apresentar perspectivas promissoras no uso como biomaterial, a aplicação da quitosana pode ser limitada devido suas propriedades físicas, como friabilidade e rigidez, à sua fraca solubilidade, alta reatividade, à sua capacidade de formação de fortes ligações de hidrogênio em meio aquoso e às propriedades hidrofóbicas, que frequentemente levam a problemas como uma pobre fixação celular (Kumar *et al.*, 2004). Com o intuito de contornar tais problemas, a utilização de uma blenda polimérica com um outro polímero capaz de reagir com a quitosana pode ser uma solução. Neste ponto de vista, seria necessário a escolha de um polímero que tenha em sua estrutura um grupo capaz de facilitar as interações com a quitosana. O sulfato de condroitina atende a esta demanda por apresentar grupo ácido carboxílico e sulfato com potencial de interação com o grupo amino presente na quitosana. (AGRAWAL *et al.*, 2010).

2.4.2 Condroitina

Os glicosaminoglicanos (GAGs), são heteropolissacarídeos naturais, lineares, sulfatados e carregados negativamente, classificados em diversos grupos com base em sua estrutura. Eles correspondem à classe mais abundante de heteropolissacarídeos no corpo (Volpi; 2010). Através das características estruturais distintas são capazes de interagir de diferentes formas com as proteínas de ligações e apresentarem seus efeitos biológicos. A diversidade estrutural dos GAG cria um enorme número de sítios de ligação de proteínas e representa um desafio assustador

para definir as propriedades estruturais e funcionais dos GAGs. Estas moléculas controlam uma vasta gama de eventos fisiológicos e patológicos incluindo a comunicação célula-célula, enzimas inibidoras e o receptor do fator de crescimento, processos inflamatórios, de proliferação celular e de angiogênese, reparação de feridas e invasão viral (Smritilekha et al. 2011)

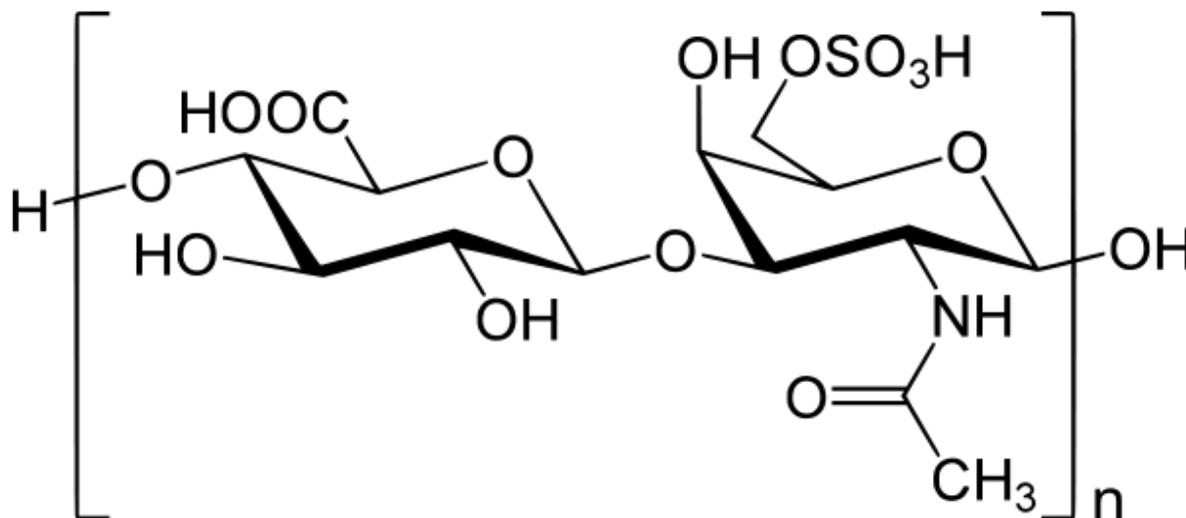
Com base nas variações de estereoquímica e nos padrões de sulfatação, podemos dividir os GAGs em quatro famílias principais: Sulfato de heparina / heparina, sulfato de condroitina (SC) / sulfato de dermatano, ácido hialurônico, e sulfato de queratano (Smritilekha et al. 2011)

Sulfato de Condroitina (SC) e Sulfato de dermatano são inicialmente compostos por repetições de dissacarídeos Ácido D-glicurônico (GlcA) ligadas a N-acetilgalactosamina (GalNAc). O ácido Hialurônico (HA) é formado a partir de repetições de unidades de dissacarídeos de B-p-N-acetilglicosamina (GlcNAc) e GlcA (Volpi 2010; Sasisekharan et al.,2006)

Os GAG sulfatados são encontrados naturalmente em todos animais e os GAGs sem a substituição do grupo sulfonila, incluindo heparosano, condroitina e hialuronano são encontradas em muitas bactérias. (Linhardt,2001). GAG estão envolvidos em muitas doenças tem sido observado seu potencial terapêutico. (Volpi, Nicola 2010)

O sulfato de condroitina (SC) é um copolímero alternado de ácido (1,4)-D-glicurônico e (1,3)-N-acetil-D-galactosamina e pertencente à família glicosaminoglicanos (BERA e LINHARDT 2011; SMRITILEKHA *et al.*,2011; YUAN *et al.*,2007). Na **Figura 17** é possível observar a estrutura química desse polímero.

Figura 14: Fórmula molecular do sulfato de condroitina (SC)



Fonte: Bera e Linhardt (2011)

O SC é um dos principais componentes da matriz extracelular (CME) de diversos tecidos conjuntivos, como osso, pele, ligamentos, tendões e cartilagem, sendo responsável por muitas das propriedades biomecânicas desta, como a resistência e elasticidade (VOLPI, 2006). O SC também pode funcionar como regulador de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e lipoproteínas através de interações com os ligantes destas proteínas via domínios específicos de sacarídeos (MALAVIKA *et al.*, 2008).

O sulfato de condroitina tem sido amplamente estudado, sendo o tratamento de osteoartrite seu principal campo de aplicação (BALI *et al.*, 2001) devido à sua ação anti-inflamatória e a capacidade de promover o alívio dos sintomas (IOVU *et al.*, 2008). Esse polímero tem sido utilizado, também, como vetor específico para o direcionamento de fármacos (MI *et al.*, 2013).

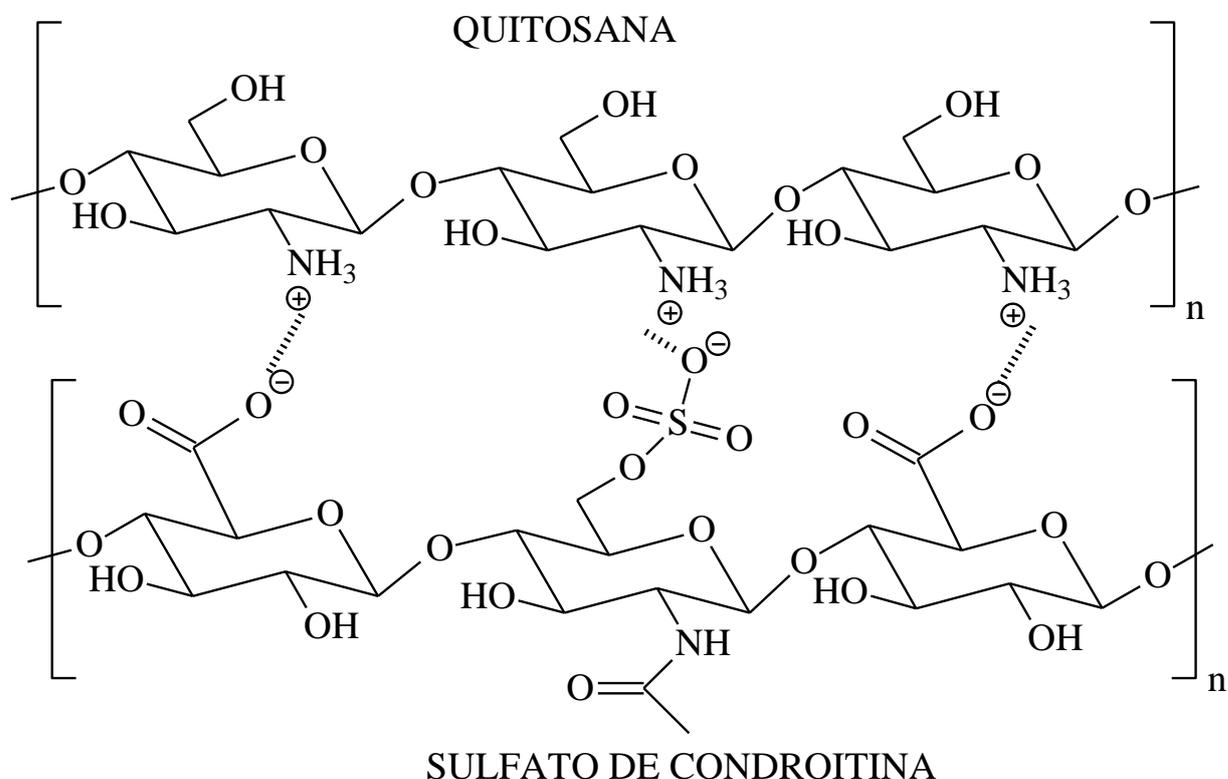
A natureza policatiónica do sulfato de condroitina lhe permite interagir com as superfícies carregadas negativamente, tais como as membranas mucosas do olho, possibilitando sua aplicação na oftalmologia. Sua propriedade antimicrobiana também é levada em consideração para sua aplicação oftálmica (XIA *et al.*, 2011)

2.4.3 Complexos de quitosana e condroitina

Complexos que envolvem a associação entre quitosana e condroitina possuem as vantagens de formarem uma matriz ideal para várias aplicações biomédicas e possuírem maior estabilidade química e mecânica (Yeh et al. 2011). Esses complexos contêm redes poliméricas hidrofílicas capazes de absorver muito mais água do que o seu próprio peso e funcionam como uma matriz ideal para aplicações biocompatíveis e para materiais bioativos instáveis nas condições normais de ambiente (YEH et al.,2011; PARK et al., 2000; MI et al., 2006).

Os grupos carboxílicos e sulfato da condroitina podem formar grupos funcionais negativamente carregados em base fraca e reagir com as moléculas de quitosana, carregadas positivamente, formando complexos polieletrólitos (PEC) (DENUZIERE et al., 1998; YUAN et al., 2008). O mecanismo de interação proposto entre a Ch e SC é mostrado na **Figura 15**.

Figura 15: Mecanismo proposto de interação entre a quitosana e a condroitina.



LUDWING (2005) relatou que os PEC são materiais com boa mucoadesão, devido à capacidade de desenvolver forças de atração molecular por interações

eletrostáticas com a carga negativa do muco. Dessa forma, os complexos possuem, além de biocompatibilidade e bioatividade, características mucoadesivas que possibilitam e otimizam sua aplicação como sistemas de liberação controlada no ambiente ocular.

3 JUSTIFICATIVA

O glaucoma é um importante problema de saúde pública em todo o mundo, sendo a principal causa de perda da visão irreversível. O único tratamento comprovado para retardar ou interromper a progressão da doença é a redução da PIO elevada. Esse tratamento, porém, apresenta inúmeras desvantagens, como a baixa adesão do paciente devido à administração ocular do fármaco, esquema posológico inconveniente, custo elevado e presença de efeitos adversos sistêmicos em decorrência da drenagem lacrimonasal do fármaco.

Uma opção para contornar esses problemas são os sistemas de liberação prolongada de fármacos, pois são capazes de promover a liberação controlada do fármaco, melhorando o esquema posológico, tornando dispensável a administração diária do medicamento e contornando, dessa forma, os problemas relacionados à sua administração.

Sistemas de liberação prolongada de fármacos constituídos por filmes poliméricos, na forma de insertes oculares, desenvolvidos à base de polímeros mucoadesivos são capazes de aderir à mucosa ocular de modo a prolongar o tempo de residência da formulação em seu local de ação, formando assim dispositivos de liberação ocular de interesse.

Tais benefícios já foram estudados por nosso grupo, que desenvolveu com sucesso insertes poliméricos de quitosana para liberação controlada de bimatoprost e dorzolamida. Foi demonstrado que essa formulação aumentou o tempo de residência pré-corneal da substância ativa e possibilitou a redução da PIO em testes *in vivo* em humanos.

Considerando que nosso grupo de pesquisa tem trabalhado no desenvolvimento tanto de novas substâncias quanto de novas formas de veicular e entregar o medicamento para tratar o glaucoma. Em relação à 2ª abordagem, nos deparamos com a necessidade de melhorar a adesão dos sistemas de liberação prolongada produzidos pelo próprio grupo.

Neste novo trabalho, o intuito foi otimizar o desenvolvimento desses insertes, por intermédio da utilização de uma blenda polimérica e a veiculação de uma

nova substancia antiglaucomatosa, a fim de alcançarmos um melhor comportamento do dispositivo, possibilitando assim, uma opção potencialmente mais adequada para o tratamento do glaucoma.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar filmes poliméricos de quitosana e condroitina e avaliar *in vivo* a capacidade de liberação de substância antiglaucomatosa bem como seu efeito na redução da PIO.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os filmes poliméricos de forma físico-química através de potencial de hidratação, análise térmica, espectrometria no infravermelho, pH de superfície;
- Avaliar o potencial de mucoadesão do inserte;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro*;
- Avaliar a atividade *in vivo* do dispositivo na redução da PIO de ratos com glaucoma induzido;
- Avaliar histologicamente as alterações no número de células ganglionares da retina;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

- Ácido Acético (Merck)
- Água MilliQ (Marca Millipore, modelo Direct-Q, Morshem)
- Cloreto de sódio (Synth)
- Composto Químico SAF14.- Inibidor de protease
- Corante Verde Lissamina (Sigma-Aldrich)
- Fosfato de potássio monobásico anidro (Sigma – Aldrich)
- Fosfato de sódio dibásico anidro (Sigma – Aldrich)
- Mucina gástrica Suína tipo 2 (Sigma – Aldrich)
- Quitosana de médio peso molecular (Sigma-Aldrich)
- Sulfato de Condroitina (Galena)

Os demais materiais utilizados são de uso comum do laboratório de farmacotécnica e não sofreram nenhum tipo de purificação antes de seu uso.

Para os testes *in vivo*:

- Ratos *Wistar* machos
- Tonômetro de aplanção – Tonopen XL (Mentor, Norwell, MA, EUA)
- Ácido Hialurônico – Araújo Farmácia de manipulação
- Colírio Anestésico Local a base de cloridrato de benoxinato 0,4%
- Anestésico Intramuscular – xilazina, quetamina e solução salina
- Fixador Boiun

5.1 Preparação dos sistemas poliméricos

Este trabalho fez parte de um projeto maior de nosso grupo de pesquisa no qual estiveram envolvidos alunos de doutorado e de iniciação científica. A formação de filmes de quitosana com condroitina com diferentes concentrações foi uma das palataformas de desenvolvimento destes trabalhos. Nesta dissertação de mestrado, foi avaliada a adição de condroitina a quitosana, em uma proporção de 75:25 % m/m

(quitosana/condroitina) para a formação de um composto polieletrólítico, com posterior gelificação e subsequente transformação deste gel em filme, que neste trabalho, também é chamado de inserte ocular.

Assim, para a preparação dos filmes, foram adicionados em um béquer 30 mL de solução de ácido acético em água millQ (concentração 1% v/v), 25 uL da solução estoque de corante ocular Lissamina Verde, 80 mg do composto químico SAF14 e 0,75 g de condroitina. Após a completa dissolução da condroitina, foi adicionada 0,25 g de quitosana e o volume da solução foi completado para 40 mL. A solução foi vedada com parafilme e deixada sob agitação magnética por 24 horas, ao abrigo da luz, até obtenção de um gel viscoso e homogêneo. O gel foi, então, espalhado sobre uma placa siliconada perfurada com poços de 5 mm de diâmetro e em seguida a placa foi coberta por papel alumínio ao abrigo da luz. A formulação foi mantida em capela de fluxo laminar por 48 horas, até a completa evaporação dos solventes. Os filmes obtidos foram mantidos em recipientes fechados com parafilme e ao abrigo da luz até o momento de serem usados.

5.2 Caracterização dos dispositivos poliméricos

5.2.1 Porcentagem de hidratação

Para se avaliar a porcentagem de hidratação dos insertes, foi avaliada a capacidade de intumescimento dos mesmos. Tal avaliação foi feita utilizando-se a diferença de peso entre a matriz seca e a matriz hidratada em meio de solução tampão fosfato salino (PBS), com pH 7,4. As diferenças foram avaliadas em períodos de tempo pré-determinados, conforme descrito por Efentakis *et al.*, 1997 e Öner *et al.* 2007. O pH da solução de hidratação foi semelhante ao pH fisiológico (pH=7,4), de forma a mimetizar o local de inserção do filme e assim obter dados mais aproximados da capacidade de hidratação do inserte quando alocado no saco conjuntival do olho humano.

Em temperatura ambiente ($25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$), as amostras foram cuidadosamente pesadas em balança analítica com precisão de $\pm 0,0001$ e em seguida imersas em 2

mL da solução PBS . Os períodos de imersão foram de 5, 10, 20, 40, 60, 90 min para a primeira, segunda, terceira, quarta, quinta e sexta amostras, respectivamente.

Depois de imersos durante o período de tempo pré-estabelecido, as amostras foram retiradas e o excesso de líquido existente na superfície das matrizes foi cuidadosamente removido com auxílio de papel filtro, e em seguida as amostras foram novamente pesadas.

A porcentagem do índice de hidratação foi calculada de acordo com a equação (KHALID et al., 2002):

$$\% \text{ Hidratação} = \left(\frac{\text{Peso do polímero hidratado} - \text{Peso do polímero seco}}{\text{Peso do polímero seco}} \right) \times 100$$

5.2.2 Avaliação do pH de superfície

Com o intuito de avaliar a segurança e conforto dos insertes para o uso conjuntival, quando aplicados em meio biológico, foi realizada a avaliação do pH de superfície. Para esse estudo, umedeceu-se os filmes com 200 μ L de água MilliQ e, em seguida, mediu-se o pH da superfície com o uso de fita indicadora de pH. Esse experimento foi realizado em 5 amostras do filme de interesse (75:25) e em 5 amostras do filme de quitosana.

5.2.3 Avaliação da Mucoadesão

Do ponto de vista da formulação, há necessidade de adesão para que a superfície úmida da mucosa resista à ação das lágrimas e do atrito no saco conjuntival. Dessa forma, a mucoadesão do inserte foi avaliada com o intuito de verificar a capacidade do inserte em aderir à mucosa do saco conjuntival.

Para a avaliação da mucoadesão, foi utilizado o método viscométrico descrito por Hassan em 1990, que consiste na avaliação da viscosidade de uma dispersão de mucina gástrica suína em 0,1 N HCL na presença e ausência dos polímeros de interesse.

Para a análise, foram preparados géis de quitosana e condroitina na proporção de interesse (75:25) e um gel de quitosana para comparação da amplificação do potencial mucoadesivo da mesma após a adição da condroitina. A mucina foi hidratada com tampão acetato 0,1 N (pH 5.5) até obtenção de uma dispersão 20% p/v.

Para o teste de mucoadesão, foram misturadas três partes da dispersão de mucina com uma parte da formulação e uma parte de quitosana, em uma concentração de mucina de 15% p/v. A viscosidade foi avaliada a 25°C sob taxa de cisalhamento de 93/seg, após três minutos da aplicação da força.

O teste foi realizado no laboratório de Tecnologia de Cosméticos da Faculdade de Farmácia da UFMG e o equipamento utilizado foi o viscosímetro de Brookfield, modelo LVDVI+ Brookfield Eng Labs. Inc Stoughton, USA) com Spindle 31.

O coeficiente de viscosidade foi calculado de acordo com a equação (Hassan, E.E. & Gallo,1990)

$$\eta_t = \eta_m + \eta_p + \eta_b$$

(1)

Onde, η_t é o coeficiente de viscosidade do sistema, η_m e η_p são as viscosidades individuais da mucina e do polímero, respectivamente, e η_b é o componente de viscosidade devido a bioadesão.

A força de bioadesão F , é calculada através da equação

$$F = \eta_b \sigma$$

(2)

Onde σ é taxa de cisalhamento por segundo obtida pelo viscosímetro e η_b é o componente de viscosidade devido a bioadesão obtido na primeira equação.

5.2.4 Espectrometria de absorção na região do infravermelho

Para a caracterização dos insertes foi utilizada a técnica de espectrometria de absorção na região do infravermelho, uma técnica não destrutiva, rápida, com alta precisão e que não requer uma complexa preparação da amostra (WOOD *et al.*, 1998; MOVASAGHI *et al.*, 2008; DAWAR *et al.*, 2010).

Essa técnica foi utilizada com o intuito de observar as possíveis interações entre os componentes da formulação ou alterações decorrentes durante o processo de produção do filme. Para tal, foram avaliadas amostras individuais de condroitina, quitosana, do corante lissamina e do composto químico SAF14, além de amostras do inserte de quitosana branco, do inserte de quitosana contendo o composto químico SAF14, do inserte 75:25 branco e do inserte 75:25 contendo o composto químico SAF14.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos na região de 4000 - 400 cm^{-1} , para a confecção das pastilhas foi utilizado como diluente o brometo de potássio (KBr) e a análise se fez em um espectrofotômetro Perkin Elmer®, modelo 283B, pertencente ao DQ-UFMG.

5.2.5 Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Para avaliação das propriedades térmicas, foi utilizada a técnica de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC). Foram avaliadas as propriedades da condroitina, da quitosana, do corante Lissamina Verde, do ativo SAF 14, do inserte de quitosana contendo o ativo e branco e do inserte 75:25 contendo o ativo e branco. Através dos termogramas obtidos, é possível avaliar a ocorrência de interações entre as substâncias e avaliar a estabilidade térmica dos insertes formados.

Os experimentos de DSC foram realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Minas Gerais. As curvas DSC foram obtidas no equipamento Shimadzu DSC-50 em processo dinâmico com temperatura 25 °C até 350 °C, com a taxa de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera inerte de N₂ a

10mL/min. Foram pesados cerca de 1,0 mg a 2,0 mg de cada amostra, que foram acondicionadas em cadinho de alumínio individuais e selados em seguida.

5.3 Determinação do teor de liberação de fármaco *in vitro*

Para a análise do doseamento da liberação de fármaco *in vitro* foi utilizado o sistema de células de Franz.

A célula de Franz é caracterizada por ser uma célula de difusão, de dose finita, onde a membrana é montada em um equipamento e fica em contato com uma solução receptora (Franz, 1978), como pode ser observado na **Figura 16**. Uma membrana de acetato de celulose com poros de 0,45 μm foi usada para dividir o compartimento de inserção do compartimento líquido do receptor. O líquido receptor utilizado foi o PBS e as células de vidro foram incubadas a $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$. Todo o líquido receptor foi retirado das células de vidro em tempos predefinidos e foi adicionado um volume igual do mesmo líquido receptor para manter um volume constante. A quantidade de droga liberada foi avaliada por HPLC.

Figura 16: Célula de Franz



Fonte: Adaptado de Silva 2010

5.4 Modelo de roedores para o estudo do glaucoma

Os modelos animais são úteis para a elucidação da etiologia e patologia do glaucoma e para auxiliar a desenvolver novas terapias, mais eficazes para a doença. Os roedores têm sido cada vez mais utilizados como modelos de glaucoma (Pang et al., 2015), devido a semelhanças substanciais entre os olhos de roedores e primatas, e os relevantes avanços nas técnicas de estudo. Assim, os modelos de glaucoma em ratos e camundongos se tornaram populares ferramentas de pesquisa (Pang e Clark 2007).

Um número de abordagens tem sido utilizado para elevar a PIO em modelos de roedores, incluindo: fotocoagulação induzida por laser (Levkovitch-Verbin et al, 2002), injeção na veia episcleral de solução salina hipertônica (Walsh, et al., 2009), injeção de microesferas no segmento anterior (Sappington et al., 2010), cauterização da veia ocular (Shareef et al., 1995), hipertensão ocular induzida por glicocorticoides (Whitlock et ai., 2010) e injeção de ácido hialurônico na câmara anterior (Benozzi et al., 2002).

Moreno et al. (2005) descreveram um modelo crônico de glaucoma experimental através da injeção semanal de ácido hialurônico na câmara anterior de roedores pelo período de 6 a 10 semanas.

Baseando neste último estudo, o nosso modelo de glaucoma experimental consistiu de injeções semanais e unilaterais de ácido hialurônico (30 μ L - 10mg/mL) também na câmara anterior dos animais, próximo ao limbo córneoescleral, durante 4 semanas.

5.5 Determinação da capacidade de redução da PIO *in vivo*

Para a avaliação da capacidade de redução da PIO *in vivo*, foram utilizados ratos *Wistar* machos com peso corporal entre 180 e 220g, fornecidos pelo Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG).

Os animais foram alojados em biotério com ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura controlada (22-23°C) e água e comida *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes institucionais aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA UFMG), segundo o protocolo 13/2018 (**Anexo 1**)

Para este estudo foram utilizados 21 animais, em que o olho esquerdo constituiu o controle, ou seja, nenhum procedimento foi realizado nesse olho, e o olho direito sofreu a indução do glaucoma, sendo tratado com o inserte, com placebo ou não tratado, divididos da seguinte forma:

- 7 animais no grupo Tratado: sendo o olho esquerdo, sem glaucoma, considerado o olho controle (Olho tratado Controle) e o olho direito, com glaucoma induzido e tratado com o inserte 75:25 com ativo o olho glaucomatoso tratado (Olho tratado Glaucoma).
- 7 animais no grupo Controle: sendo considerado o olho esquerdo, não glaucomatoso, o olho controle (Olho Placebo Controle) e o olho direito com glaucoma induzido e tratado com o inserte placebo (Olho Placebo Glaucoma)
- 7 animais no grupo Glaucoma: em que o olho esquerdo, não glaucomatoso, foi considerado o olho controle (Olho Controle) e o olho direito sofreu a indução do glaucoma e não foi tratado (Olho Glaucoma).

Formando assim seis grupos a serem analisados: olho tratado controle e glaucoma, olho placebo controle e glaucoma, olho controle e olho glaucoma.

O glaucoma unilateral foi induzido através de uma injeção transcorneal de 30 µL de ácido hialurônico (AH) na câmara anterior do olho direito, uma vez por semana, durante 4 semanas, no mesmo dia e horário, seguindo o protocolo descrito por Moreno et al. em 2005. Para a indução, os animais foram anestesiados sistemicamente através de injeção intramuscular de quetamina, xilazina e solução salina (60:30:10 - 1 mg por Kg do animal) e anestesiados localmente por meio da instilação de cloridrato de benoxinato 0,4% na córnea.

Avaliação da PIO foi realizada no dia anterior à próxima indução de glaucoma. Após o estabelecimento a hipertensão ocular (na segunda injeção) os insertes foram inseridos no saco conjuntival do olho direito do grupo tratamento. A PIO

foi aferida com o tonômetro de aplanção Tonopen XL (Mentor, Norwell, MA, EUA). Para essas medidas, os animais foram anestesiados topicamente com solução de 0,4% de cloridrato de benoxinato e cuidadosamente contidos com uma pequena toalha. Foram realizadas três leituras em cada olho, considerando um erro padrão inferior a 10%. O valor correspondente da PIO foi a média desses três valores adquiridos. As mensurações da PIO, durante a indução do glaucoma e após o tratamento com o SAF14, foram realizadas semanalmente, sempre no mesmo dia e horário por 6 semanas. A seguir, os animais foram eutanasiados e ambos os olhos foram enucleados para análise histológica.

5.6 Avaliação histológica

A histologia foi feita para avaliar os possíveis danos causados nas células ganglionares da retina. O controle da PIO é importante para a manutenção da integridade ocular e para o controle do glaucoma, já que o dano às células ganglionares da retina é o responsável pela perda da visão.

Para análise desses danos às células ganglionares da retina, foram realizados cortes histológicos da retina, na área do nervo óptico.

Após a eutanásia dos animais, os olhos foram enucleados e imersos em Bouin por 15 minutos e depois duas pequenas secções sagitais foram feitas em cada lado dos olhos. Os olhos seccionados foram, então, novamente imersos em líquido fixador Bouin por 24 horas. Após esse período de imersão, os olhos foram então desidratados em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90, 95 e 100%), diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast. Foram realizadas secções semi-seriais de 6µm com o auxílio de um micrótomo (modelo HM335E, Microm, Minnesota, EUA). Para análise histológica e contagem de CGR, os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina (HE).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

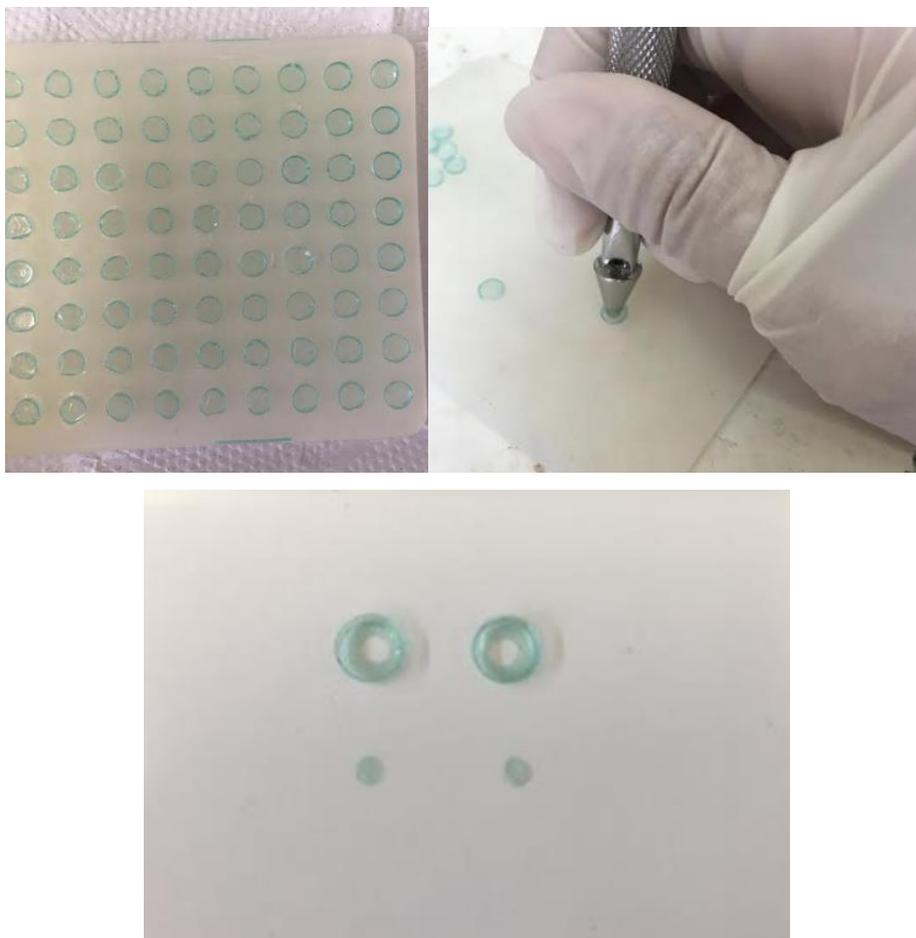
6.1 Preparação dos filmes poliméricos

A quitosana é um polímero insolúvel em meio aquoso básico. Dessa forma, para que fossem formados os filmes poliméricos, se fez necessária a solubilização em uma solução aquosa de ácido acético. Ao adicionarmos a condroitina, tem-se que os grupos amino da quitosana são protonados pela condroitina e então é possível a obtenção de uma solução homogênea e formação dos filmes poliméricos em meio ácido (YUAN *et al.*, 2008).

Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo, foi observada uma dificuldade da avaliação do posicionamento correto dos insertes no olho humano (parecer COEP 428.231 de 23/10/2013) devido ao fato de se tornarem praticamente transparentes em contato com o tecido alvo. Dessa forma, para a melhor visualização dos insertes no olho durante os experimentos foi adicionada à formulação um corante ocular. O corante de escolha foi a Lissamina verde, por já ser utilizado na oftalmologia para avaliar lesões da superfície ocular. É um corante bem tolerado pelos pacientes e não apresenta citotoxicidade para o epitélio da córnea. Com a melhor visualização dos insertes durante a manipulação, é possível avaliar a correta posição do inserte no local de aplicação dos testes *in vivo*, garantindo adequabilidade ao tratamento (JANS e HASSARD, 1967; BARRY *et al.*, 2007).

Após a secagem, os dispositivos foram retirados da placa de silicone e tiveram seu tamanho calibrado com o auxílio de uma faca punch de 2mm de diâmetro, padronizando assim o tamanho e o peso (peso médio de 1,7mg) do inserte, conforme pode ser observado na **Figura 17**.

Figura 17: Filmes poliméricos na placa de silicone após secagem (a), padronização do tamanho com auxílio da faca punch 2mm (b) e inserte com tamanho definido (c).

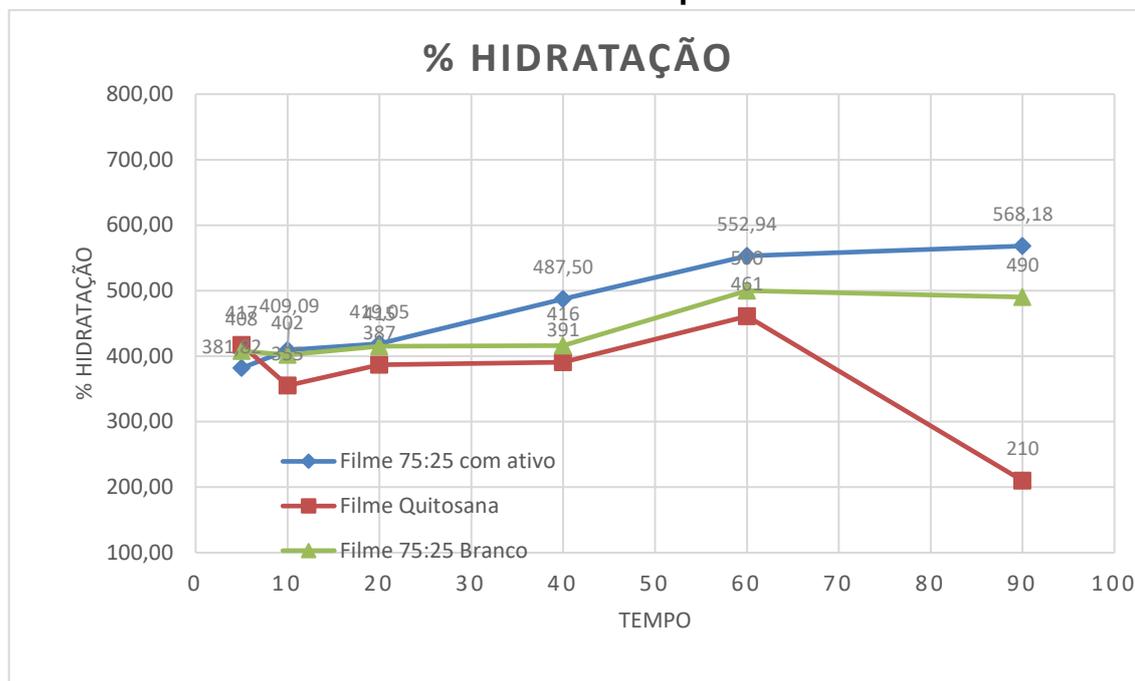


6.2 Caracterização dos dispositivos poliméricos

6.2.1 Porcentagem de Hidratação

Os resultados obtidos para a porcentagem de hidratação estão apresentados no **Gráfico 1**.

Gráfico 1: Índice de hidratação dos insertes de quitosana e condroitina (75:25) com e sem ativo e do inserte de quitosana com ativo.



Foi possível observar uma alta capacidade de hidratação dos insertes de quitosana e condroitina (75:25). A taxa de hidratação foi superior a 400% já nos primeiros 20 minutos. Durante a hidratação, os insertes não se dissolveram ou quebraram, mas apresentaram um aspecto entumecido, mantendo sua integridade. A manutenção da integridade dos insertes se faz necessária para garantir o fornecimento adequado de fármaco, além da sua adequada fixação no local de aplicação.

Foi possível observar uma maior capacidade de hidratação dos filmes contendo a mistura de quitosana e condroitina (75:25) quando comparados aos filmes compostos apenas por quitosana. Além disso, pode-se observar uma queda na porcentagem de hidratação devido à desintegração do filme de quitosana após 90 min, evento que não ocorreu no filme composto pela mistura, evidenciando assim uma superioridade da formulação contendo a condroitina em relação à capacidade de hidratação.

O aumento da capacidade de hidratação pode ser justificado pela presença das interações eletrostáticas entre a quitosana e a condroitina. O aumento de carga elétrica na blenda aumenta a possibilidade de solvatação pela água aumentando, por conseguinte, o influxo deste solvente na rede polimérica formada com a quitosana e

a condroitina. A princípio, este evento também é observado no filme de quitosana puro, haja visto as interações eletrostáticas entre a quitosana e o ácido acético presente no meio, porém, com um influxo de água menor.

Não foi possível observar nenhuma alteração significativa entre o filme 75:25 contendo o fármaco e o filme branco, evidenciando assim que o fármaco não interfere na capacidade de hidratação do inserte.

6.2.2 Avaliação do pH de superfície

Os valores encontrados para o pH de superfície podem ser observados na **Tabela 3**. O pH médio de superfície foi equivalente a 5,0 para o filme com a blenda polimérica e 4,9 para o filme com quitosana pura.

Tabela 3: Valores do pH de superfície do Filme 75:25 e do Filme de Quitosana

Amostra	pH Filme 75:25	pH Filme Quitosana
1	5	5
2	5,5	4,5
3	5	4,5
4	4,5	5
5	5	5,5
Média	5	4,9

O caráter ácido das amostras se deve à utilização do ácido acético durante o preparo dos filmes. O pH para preparações oculares pode variar entre 4 e 10 sem que ocorra irritação ocular, já para valores fora dessa faixa podem ocorrer danos ao olho (WHO Handbook of Resolutions and Decisions). Dessa forma, os insertes apresentaram um pH adequado para sua utilização ocular. Não foi observada nenhuma diferença significativa numérica entre o filme 75:25, contendo quitosana e condroitina e o filme composto apenas de quitosana, estando, ambos, dentro da faixa de segurança para o uso ocular.

6.2.3 Avaliação da mucoadesão

Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 4**.

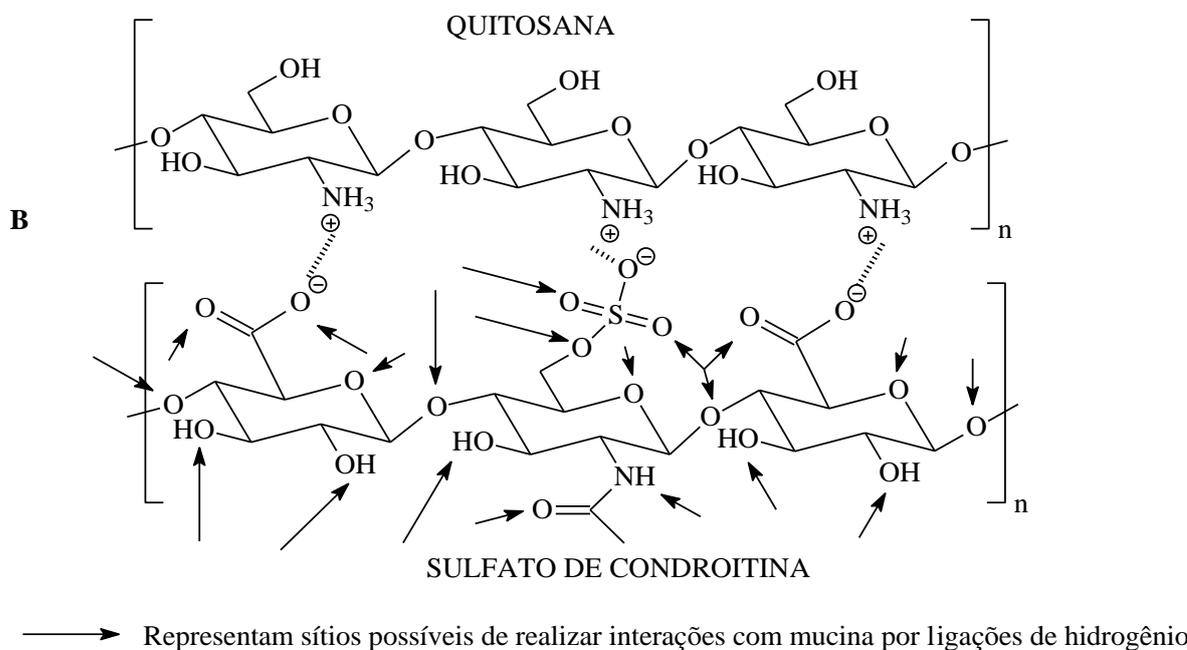
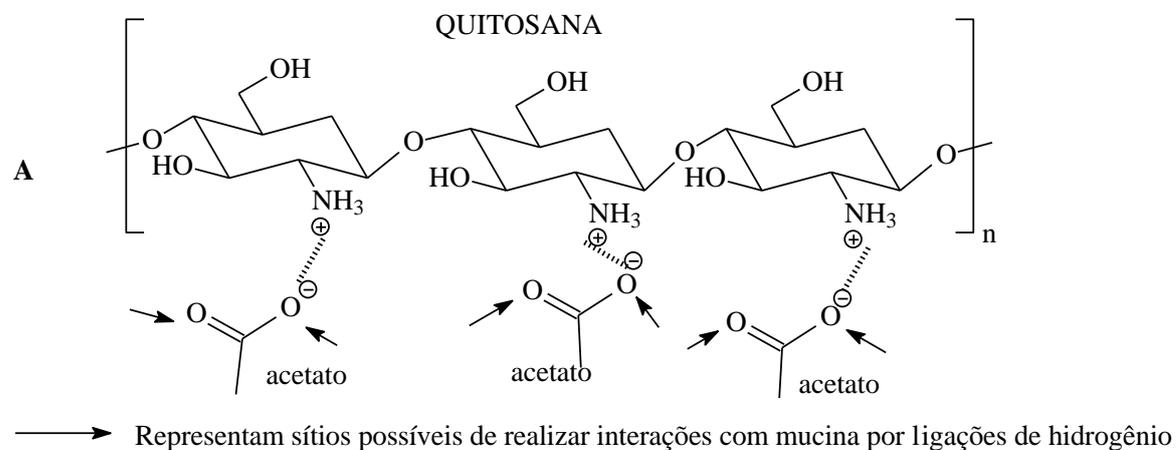
Tabela 4: Resultados da mucoadesão

Meio	Visc (cP)	η_m	H _p	η_{ad}	F
Mucina (M)	480	-	-	-	
75:25 Ch:SC (B)	726	-	726	-	
B+M (1:3)	1462,5	480	-	256,5	5,712635
Quitosana (Ch)	483,3333	-	483,3333	-	
Ch+M (1:3)	1043,333	480	-	80	3,96162

É possível observar um aumento na força de bioadesão no filme constituído de quitosana e condroitina ($F = 5,71$) em relação ao filme constituído apenas de quitosana ($F = 3,96$), evidenciando assim o aumento da capacidade de mucoadesão no complexo formado por esses polímeros se comparado ao filme constituído somente de quitosana.

Essa maior capacidade de mucoadesão se justifica pela formação do filme com maior quantidade de sítios de interação com a mucina devido às interações eletrostáticas geradas pela presença dos polímeros quitosana e condroitina. Por outro lado, a existência de um outro esqueleto polimérico (no caso da presença da condroitina) faz com que haja um aumento, também, no número de interações por ligação de hidrogênio. Isto é explicado pois há um maior número de grupos hidrofílicos presentes no sistema condroitina/quitosana do que somente com o quitosana (**Figura 18**).

Figura 18: Propostas de sítios de interações entre filme de quitosana e filme de quitosana/condroitina com a mucina.



Na **Figura 18 A**, observam-se propostas de sítio de interação por ligação de hidrogênio (marcadas com setas) entre o filme de quitosana e ácido acético com a mucina. É possível identificar, para cada resíduo de ácido acético, duas possibilidades de sítios para interação.

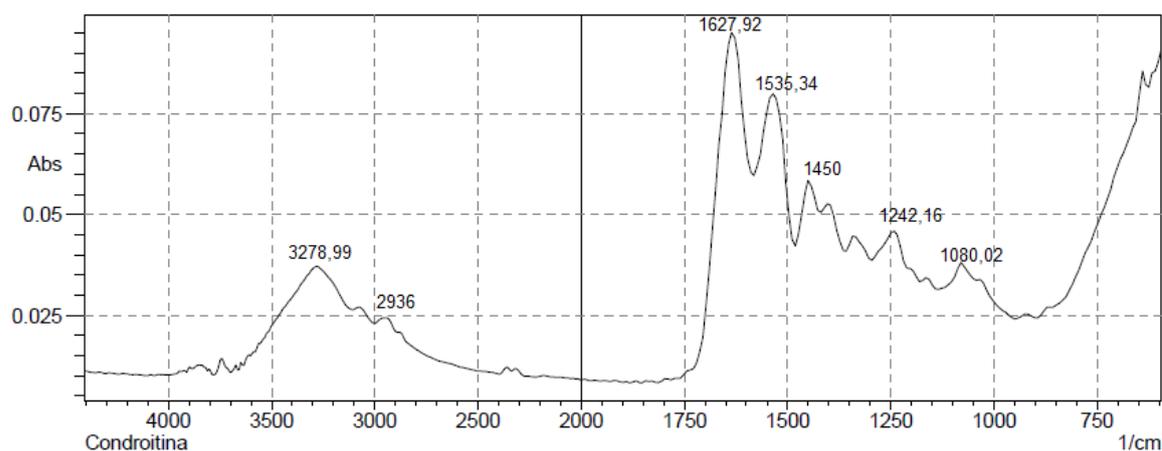
Por outro lado, na **Figura 18 B**, pode se observar que a presença do esqueleto da condroitina na formação do filme quitosana/condroitina, aumenta significativamente as possibilidades de interação com a mucina por ligação de hidrogênio (sítios assinalados com setas).

Este aumento de possibilidades de interação justifica os valores encontrados para as forças de mucoadesão, demonstrando que o filme com condroitina tem uma força de adesão maior do que o filme com quitosana.

6.2.4 Espectrometria de absorção na região do infravermelho

No espectro para o sulfato de condroitina (SC) (**Figura 19**) é possível observar em 3280 cm^{-1} uma banda intensa e larga referente ao estiramento O-H em polímeros, sobreposta à banda referente ao estiramento N-H de amida secundária. Em 2936 cm^{-1} observa-se uma banda referente às vibrações dos grupos CH/CH₂/CH₃ presentes no esqueleto polimérico. Em torno de 1630 cm^{-1} é possível observar uma banda alargada referente ao estiramento C=O de amida secundária (“banda de amida I”) e de ácido carboxílico. Em 1535 cm^{-1} observa-se a “banda de amida II” referente à deformação angular de N-H e ao estiramento C-N do grupo C-N-H. As bandas em 1242 e 1080 cm^{-1} referem-se ao estiramento assimétrico S=O de ácido sulfônico (RODRIGUES et al., 2009; KUMIRSKA et al., 2010; LECETA et al., 2013).

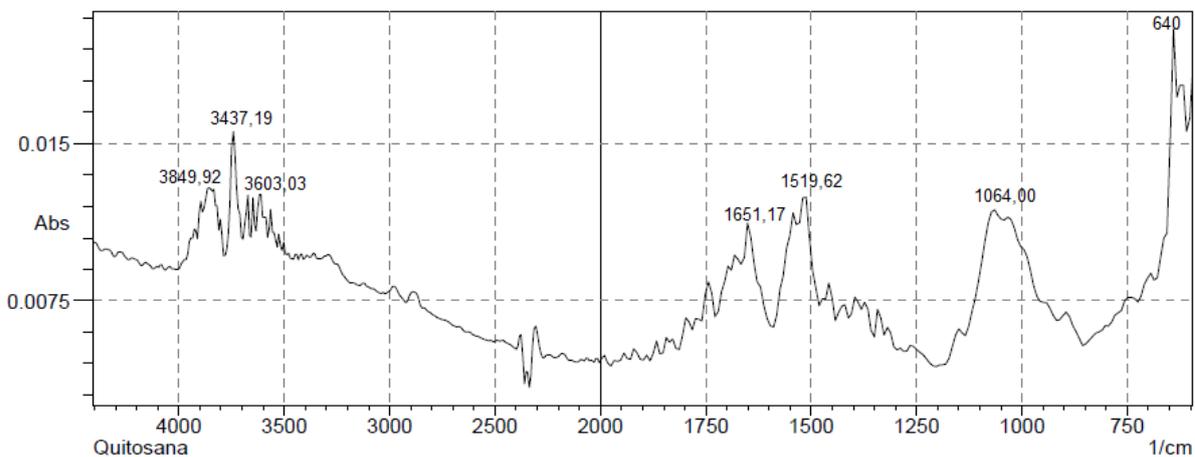
Figura 19: Espectro de absorção na região do infravermelho para o Sulfato de Condroitina



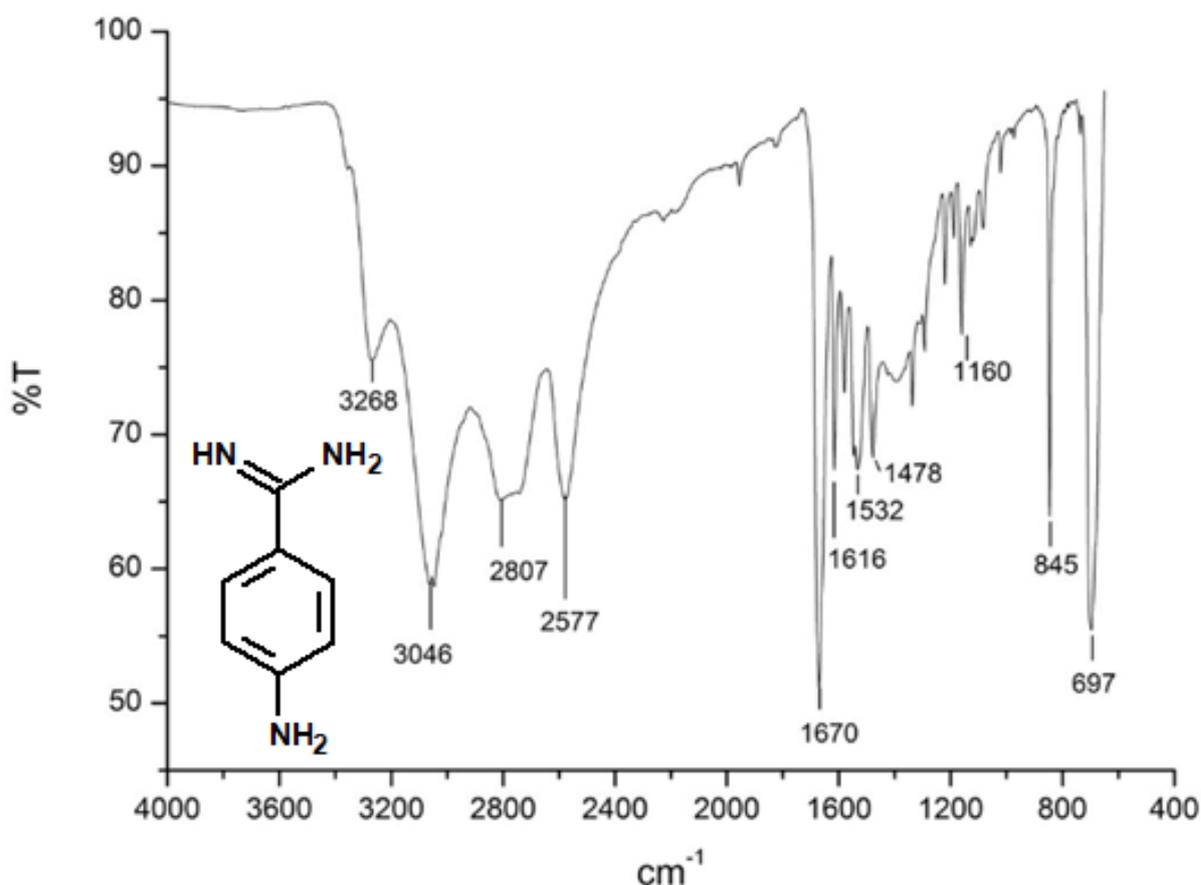
Na **Figura 20**, é possível observar as bandas características do quitosana. Em 3400 cm^{-1} pode-se observar as bandas características da ligação O-H, entre 3255 e 3265 cm^{-1} observam-se as bandas de estiramento de O-H e C-H do monômero. A banda I de amida, referente ao estiramento C=O, ocorre em 1651 cm^{-1} e a banda de

amida II em 1519 cm^{-1} (Rodrigues, Leite et al., 2009; Kumirska, Czerwicka et al., 2010; Leceta, Guerrero et al., 2013).

Figura 20: Espectro de absorção na região do infravermelho para a Quitosana

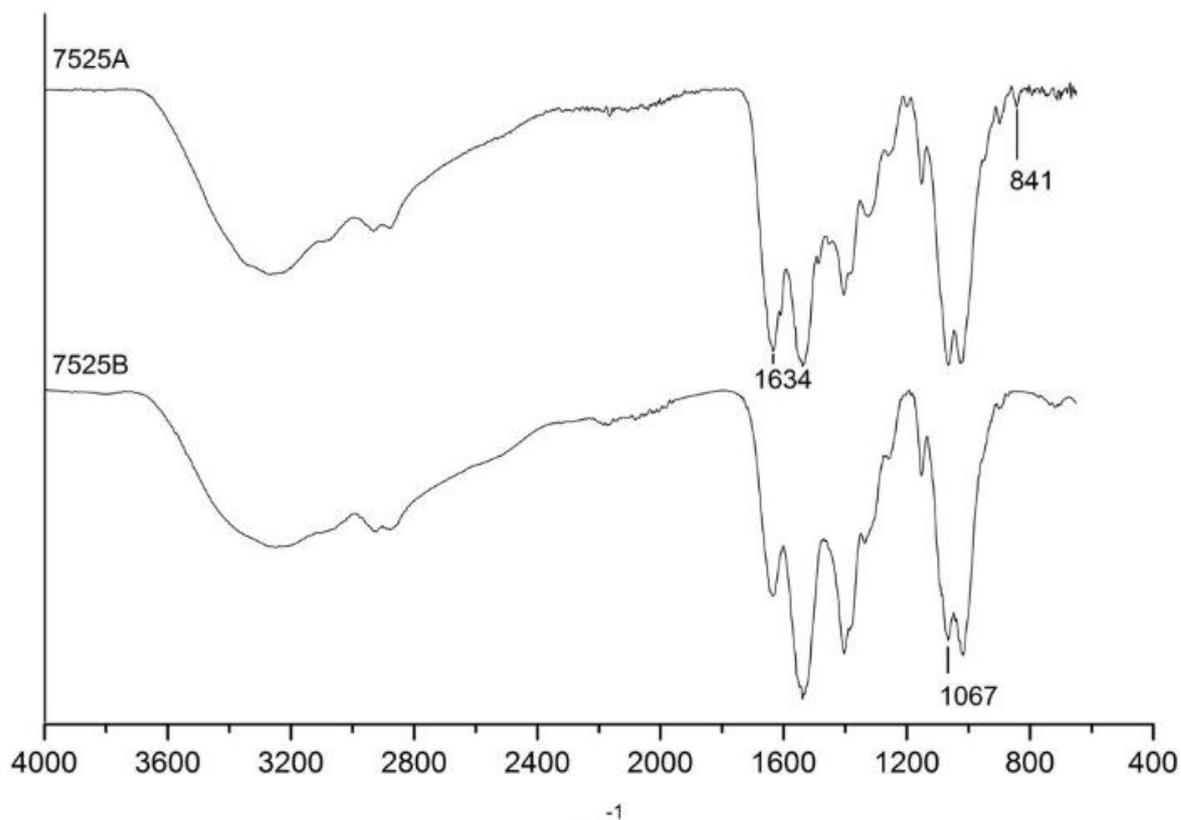


Na **Figura 21** observa-se o espectro do composto químico SAF14 com suas bandas características. Em 3268 banda de estiramento NH de amina aromática; em 3046 banda de estiramento da ligação C-H de anel aromático; em 1670, 1616 e 1532, bandas de estiramento do grupo benzamidino ($\text{HN}=\text{C}-\text{NH}_2$); e por fim, destacam-se as bandas em 845 e 697 características de um sistema AA'BB' para-dissubstituído para o anel aromático, sendo condizentes com dados da literatura (Silverstein,2000)

Figura 21: Espectro no IV da substancia SAF14

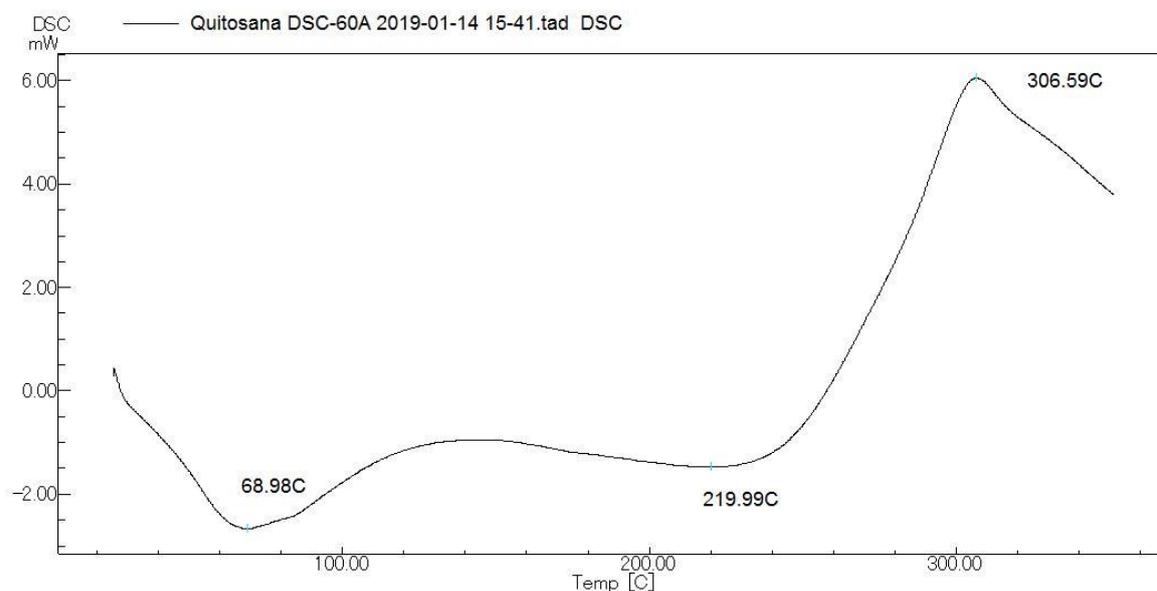
As caracterizações por espectrometria no infravermelho foram feitas com os filmes poliméricos com e sem a substancia SAF14. A análise da **Figura 22** permite avaliar que algumas alterações significativas no filme polimérico composto por quitosana e condroitina após a adição do composto Químico SAF14 ocorreram na região característica de estiramentos carbonila. Observa-se um deslocamento e alargamento da banda de carbonila de 1651 *do quitosana) e 1627 da condroitina e também de 1670 da substancia SAF14 para uma banda larga em 1634 cm⁻¹. Este fato sugere uma possível interação entre o fármaco e os polímeros.

Figura 22: Comparativo Entre o filme 75:25 branco (75:25B) e com ativo (75:25A).

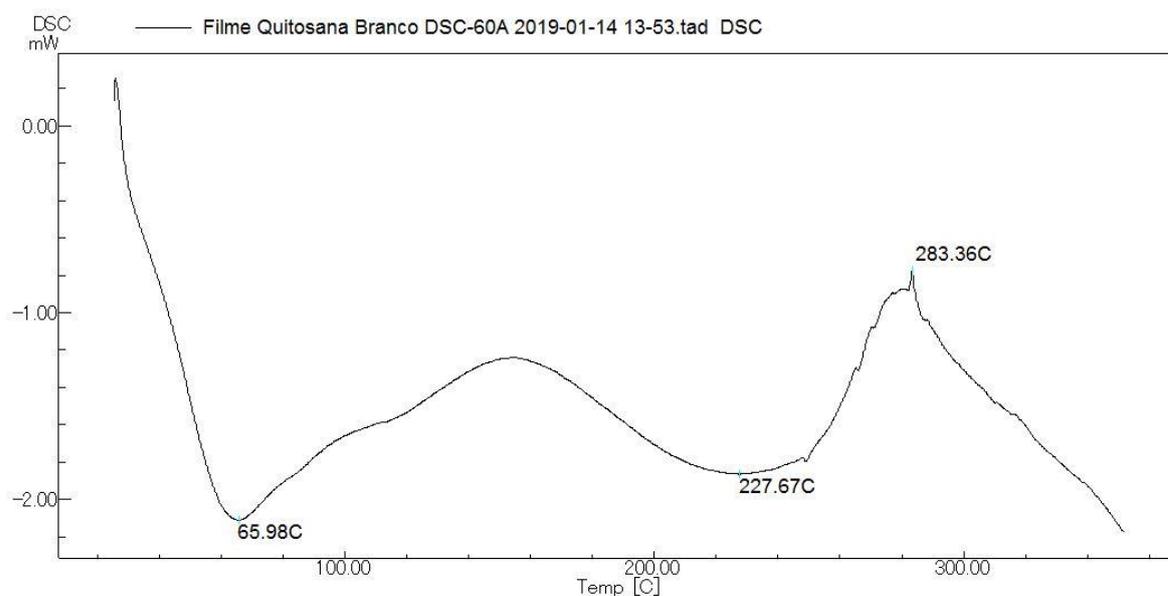


6.2.5 Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Na análise do termograma da quitosana (**Figura 23**), observamos um pico endotérmico por volta de 69°C e um pico exotérmico por volta de 306 °C. O primeiro pico pode ser atribuído à evaporação da água residual e o pico exotérmico na faixa de 300°C corresponde à decomposição da quitosana. Esses dados estão de acordo com os dados da literatura, como descritos por KHALID et al. (2002) e por Franca et al. (2014).

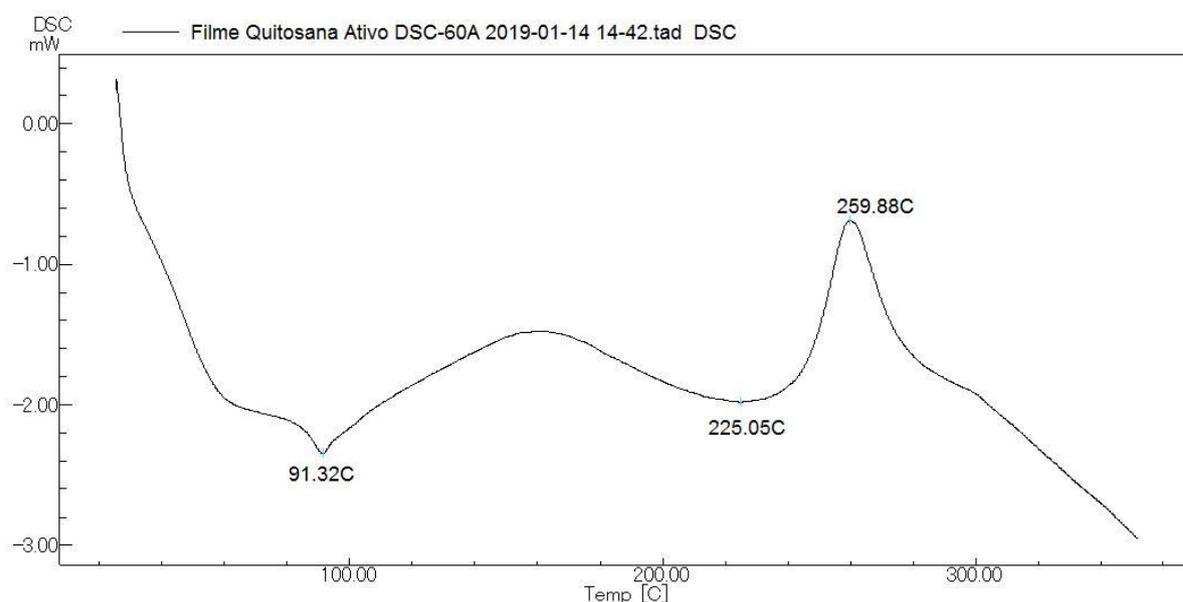
Figura 23 : Termograma Quitosana

Na **Figura 24** observamos o termograma do filme de quitosana. Pode-se observar um pico endotérmico por volta de 69 °C e um pico exotérmico por volta de 280 °C. O primeiro pico, assim como no termograma da quitosana pura, é proveniente da perda de água, já o pico exotérmico corresponde, também, à decomposição da quitosana, assim como na quitosana sólida.

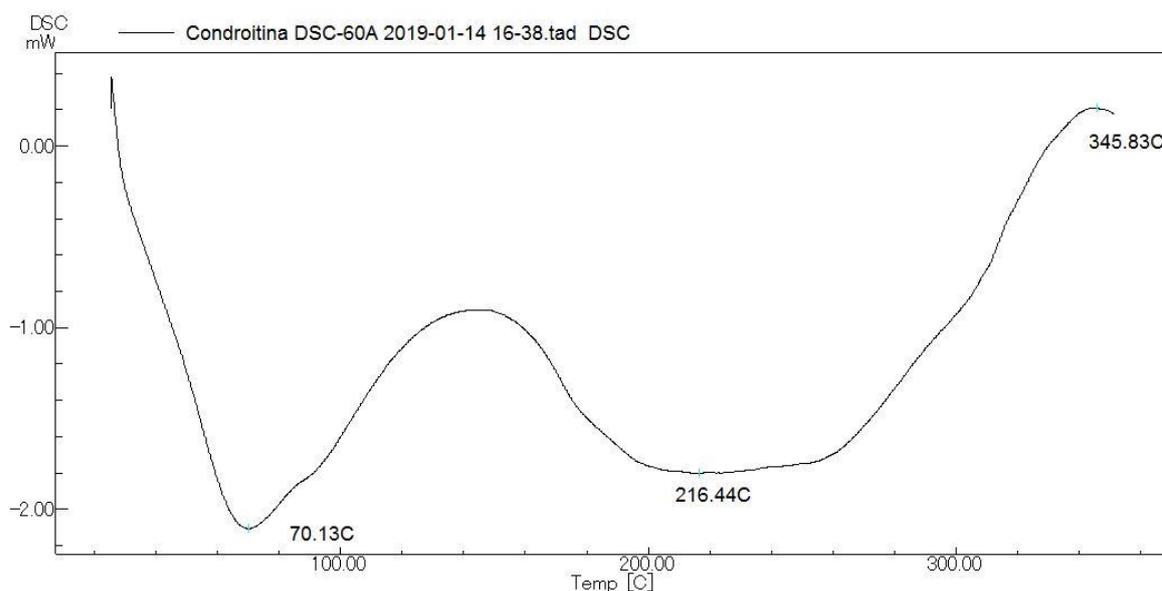
Figura 24: Termograma Filme de Quitosana Branco

O termograma (**Figura 25**) do filme de quitosana contendo o ativo indica um pico endotérmico por volta de 91 °C, proveniente da perda de água do filme e um pico exotérmico por volta de 260 °C, indicando a decomposição do mesmo. A diminuição da temperatura de decomposição pode estar relacionada à interação entre o fármaco e o polímero quitosana. Neste caso, ocorre a fragilidade das interações polímero-polímero em detrimento das interações polímero substancia SFP14. A diminuição destas temperaturas está em acordo com outros tipos de interação polímero fármaco descritos na literatura como descrito por Franca et al. (2014).

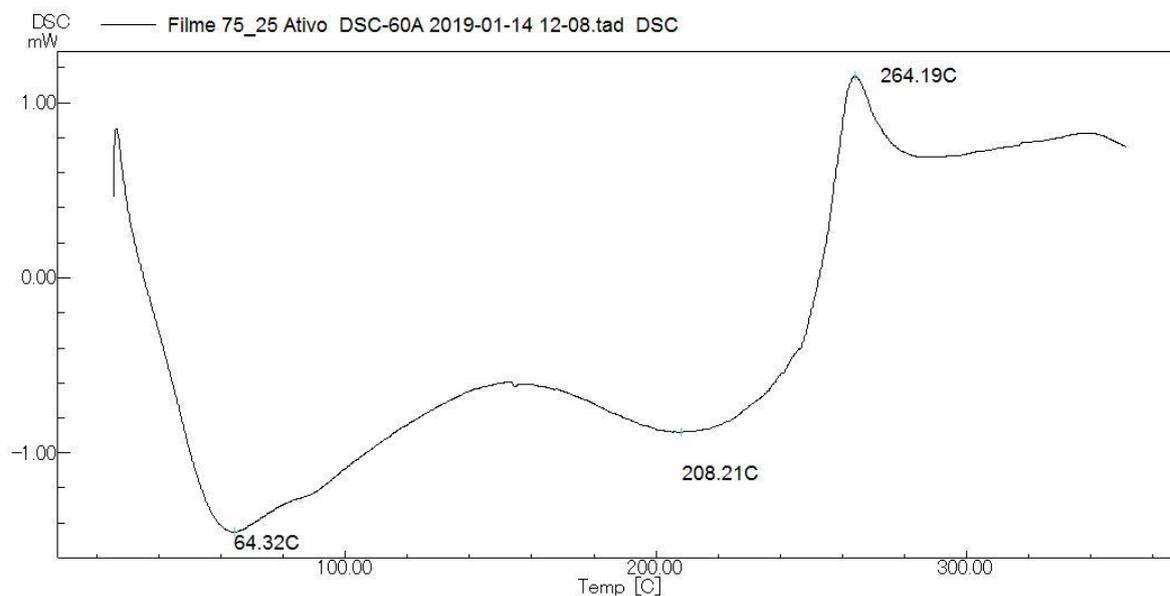
Figura 25: Termograma do Filme de Quitosana com Ativo



Na análise do termograma da condroitina (**Figura 26**), pode-se observar um sinal referente a um evento endotérmico por volta de 70°C, um evento endotérmico por volta de 216°C e um pico exotérmico por volta de 340°C. O primeiro pico endotérmico pode ser atribuído ao processo de evaporação da água da matéria prima, o que está em acordo com o descrito na literatura (MI et al., 2006). O segundo evento endotérmico pode estar relacionado à fusão da condroitina, uma vez que a temperatura de fusão da condroitina é em torno de 190°C, temperatura aproximada de onde se inicia esse evento endotérmico. O pico exotérmico está relacionado à decomposição da amostra (FOOT et al; 2005).

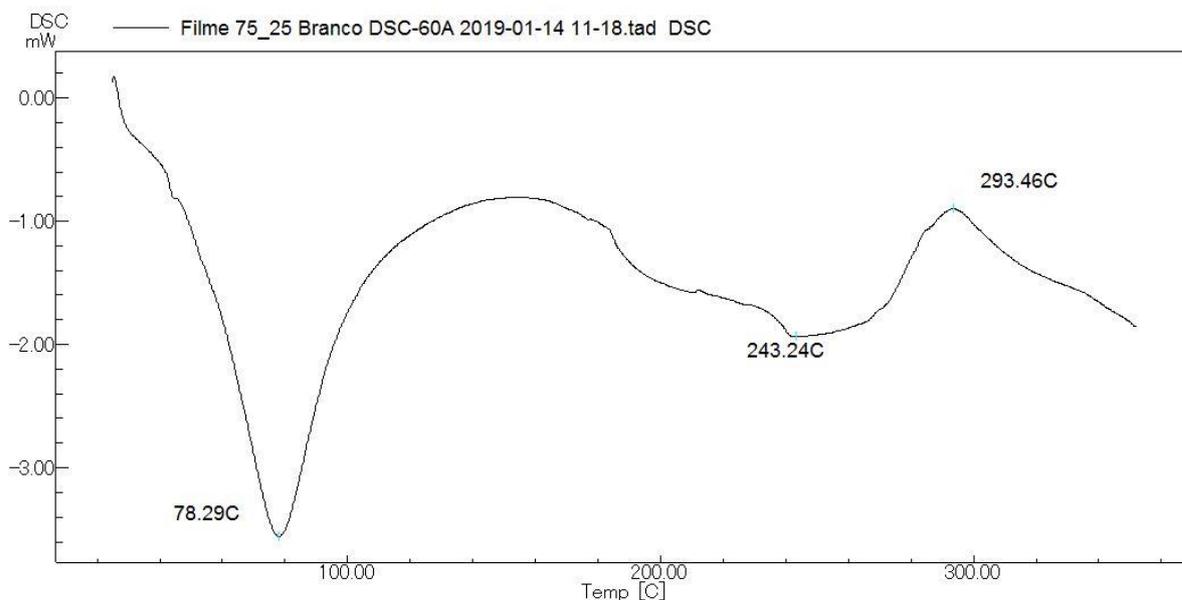
Figura 26: Termograma Condroitina

Na **Figura 27**, é possível observar o termograma obtido através da análise de DSC para o inserte 75:25 contendo o ativo. Pode-se observar um primeiro pico endotérmico aproximadamente em 65°C, indicando a evaporação da água residual (Yuan et. al., 2008), e um segundo pico endotérmico por volta de 208°C, relativo à fusão do inserte, seguido de um pico exotérmico por volta de 264°C, representando a decomposição do inserte.

Figura 27: Termograma Filme 75:25 com ativo

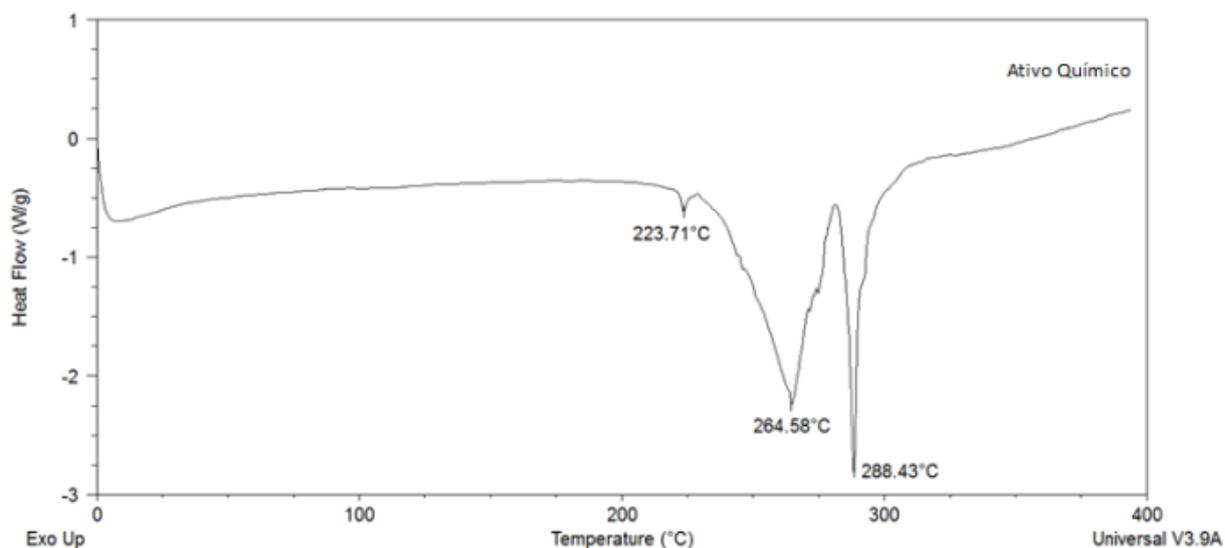
O termograma do filme 75:25 sem ativo (**Figura 28**) indica um pico endotérmico por volta de 78 °C, proveniente da perda de água do polímero e um pico exotérmico por volta de 290 °C, indicando a decomposição do filme.

Figura 28: Termograma Filme 75:25 Sem ativo



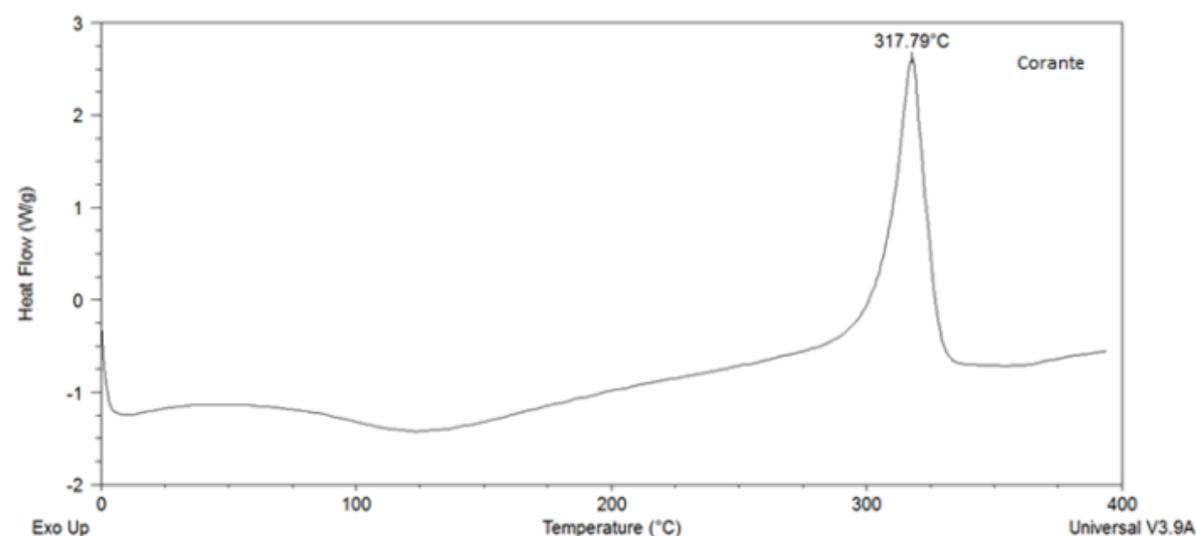
O termograma do composto químico SAF14 (**Figura 29**) apresenta dois picos endotérmicos, por volta de 264 e 288°C, esses picos indicam que o composto deve possuir dois picos de decomposição – se decompõe em duas fases.

Figura 29: Termograma SAF14



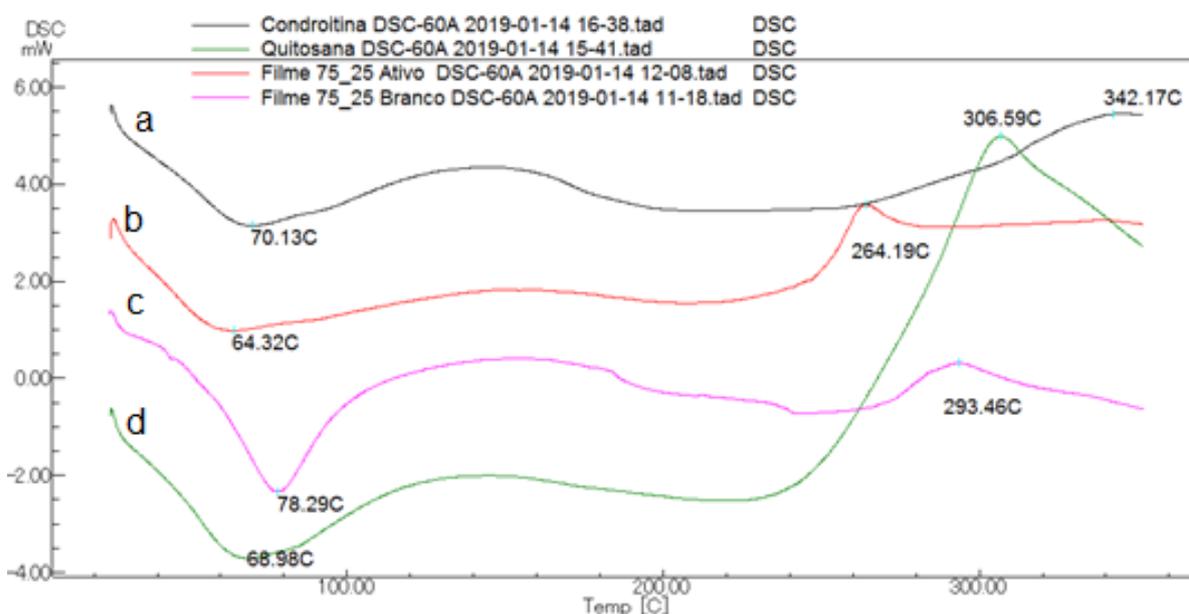
Por outro lado, como o filme também apresenta o corante Lissamina, foi feito o DSC desta substancia também. Pela análise da curva de DSC da lissamina (**Figura 30**), observamos um pico endotérmico por volta de 100°C, correspondente à perda de água, e um pico exotérmico aproximadamente em 318°C, correspondente à degradação desse corante.

Figura 30: Termograma Corante Lissamina Verde



A **Figura 31** demonstra um comparativo entre o filme com ativo, o filme branco, a quitosana e a condroitina. Nela, é possível observar uma diferença entre os picos de decomposição do filme (b e c), em relação às matérias primas individuais, condroitina (a) e quitosana (d). Essa diferença evidencia a interação ocorrida entre os polímeros e a substância ativa. A interação da quitosana com a condroitina possivelmente levou a uma perturbação na organização polimérica da quitosana, levando a uma reestruturação e fazendo com que quantidades menores de calor fossem suficientes para promover a degradação do polímero.

Figura 31: Curvas de DSC do sulfato de condroitina (a), da quitosana (d), do inserte polimérico com ativo (b) e do filme branco (c)

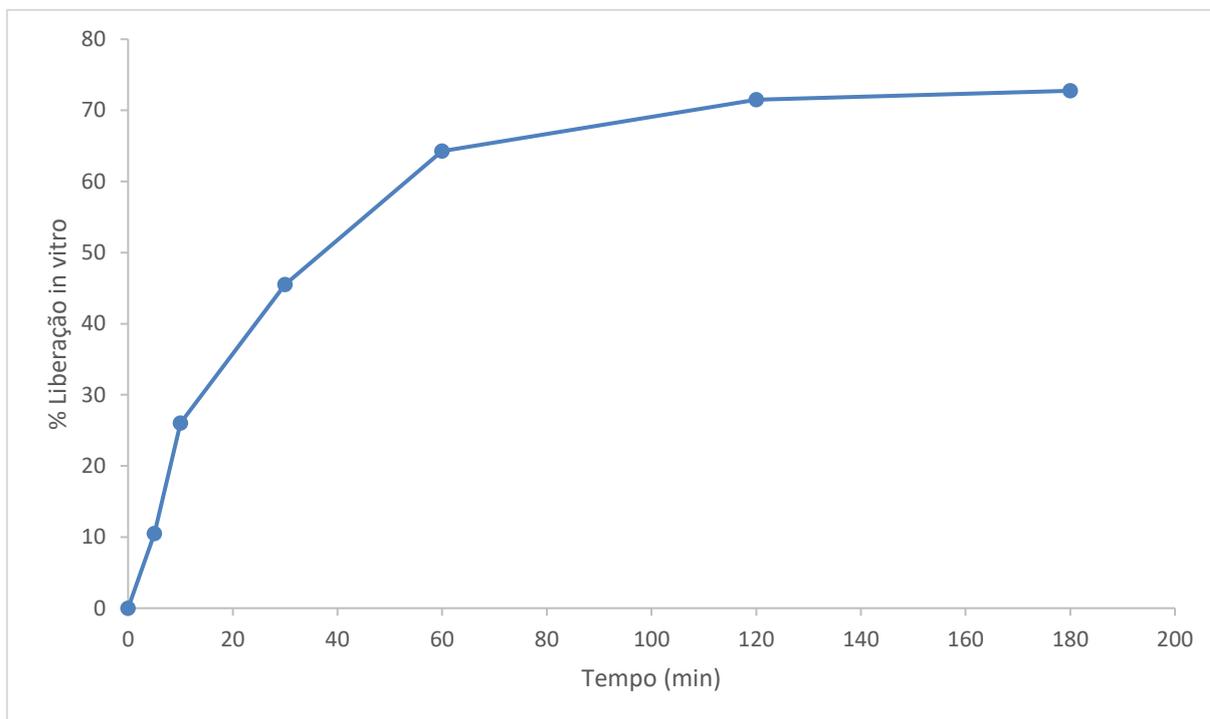


Além disso, um fator importante relacionado aos filmes é a sua estabilidade térmica, pois pode ser indicativo de métodos de esterilização, caso este sistema de liberação seja utilizado pelo setor produtivo. Assim, a análise térmica das amostras evidencia que o filme formado entre os compostos é termicamente estável, possuindo uma temperatura de degradação acima de 250°C, podendo, portanto, ser passível de esterilização a altas temperaturas.

6.3 Determinação da capacidade de liberação *in vitro*

Testes de liberação *in vitro* são ferramentas muito importantes no desenvolvimento de medicamentos, tanto no desenvolvimento quanto no controle de qualidade (MARTIN et al., 2003). Para avaliar o perfil de liberação do inserte 75:25 contendo o ativo foi utilizado o modelo de célula de Franz. Na **Figura 32** é possível observar que o inserte liberou 70% de seu conteúdo em até 50 minutos e apresentou em seguida um perfil aproximadamente estável, e ao término das 3 horas de experimento 75% do ativo foi liberado.

Figura 32: Perfil de liberação *in vitro* da substância SAF14 no inserte 75:25 em célula de Franz.



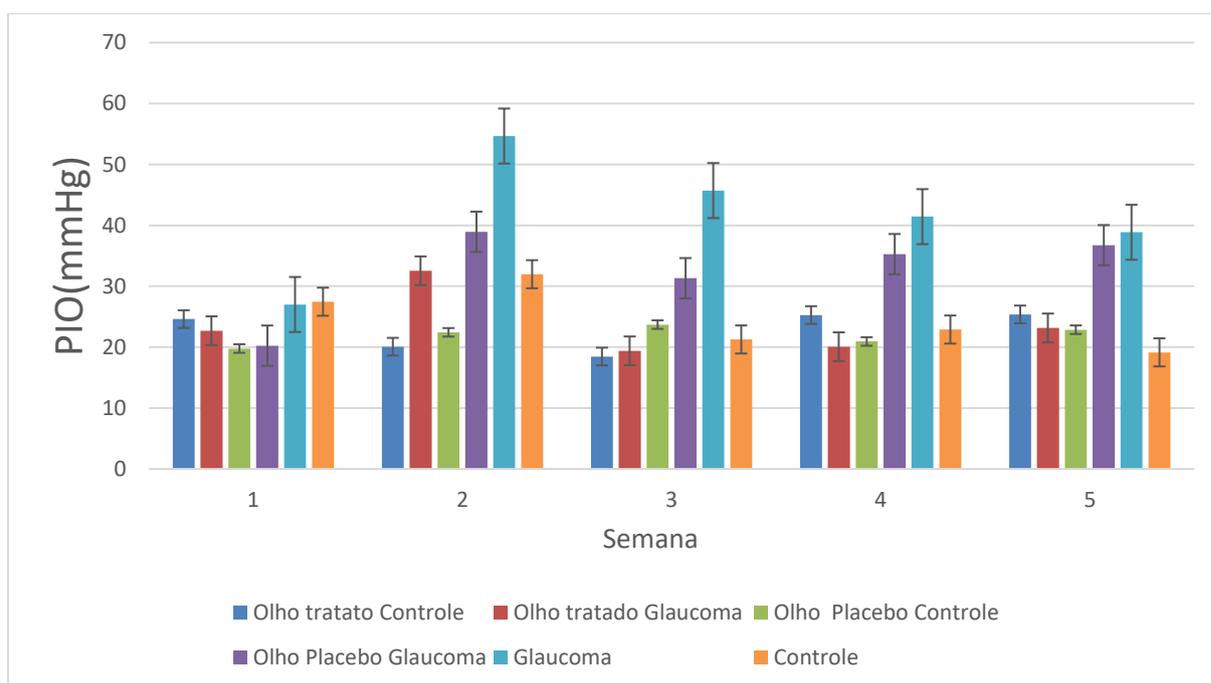
A concentração de ativo encontrada nas formulações se mostrou uniforme, sendo de 27,79 μg / inserte.

6.4 Determinação da capacidade de redução da PIO *in vivo*

Na **Figura 33**, podemos observar os valores da PIO dos grupos: olho direito glaucomatoso tratado com inserte, olho direito glaucomatoso tratado com placebo, olho direito glaucomatoso sem tratamento, olho esquerdo glaucomatoso não tratado e olho esquerdo controle durante o decorrer do experimento. Na primeira semana, obtivemos os valores basais para cada grupo, já na segunda semana, observa-se uma significativa elevação da PIO no olho direito dos animais, após a injeção de ácido hialurônico, ao passo que no olho esquerdo (controle) os níveis permaneceram equivalentes aos basais. Observa-se na terceira semana a manutenção da PIO elevada nos grupos induzidos (olho direito) e a manutenção dos valores basais no grupo controle (olho esquerdo). O inserte foi inserido no olho direito dos animais do grupo tratado e, a partir da primeira semana, pôde ser observada a redução da PIO para o grupo que recebeu o inserte contendo o ativo, que chegou próximo aos níveis

basais. Já o olho controle, que não recebeu o inserte, permaneceu com a pressão elevada. O inserte preparado foi, portanto, capaz de controlar a PIO por até 4 semanas, período em que se estendeu o estudo, o que indica que o sistema polimérico mucoadesivo foi eficaz na liberação de forma prolongada do composto químico SAF14.

Figura 33: Resultados da PIO obtidos nos grupos glaucoma, controle, controle placebo, glaucoma placebo, controle tratamento e glaucoma tratamento

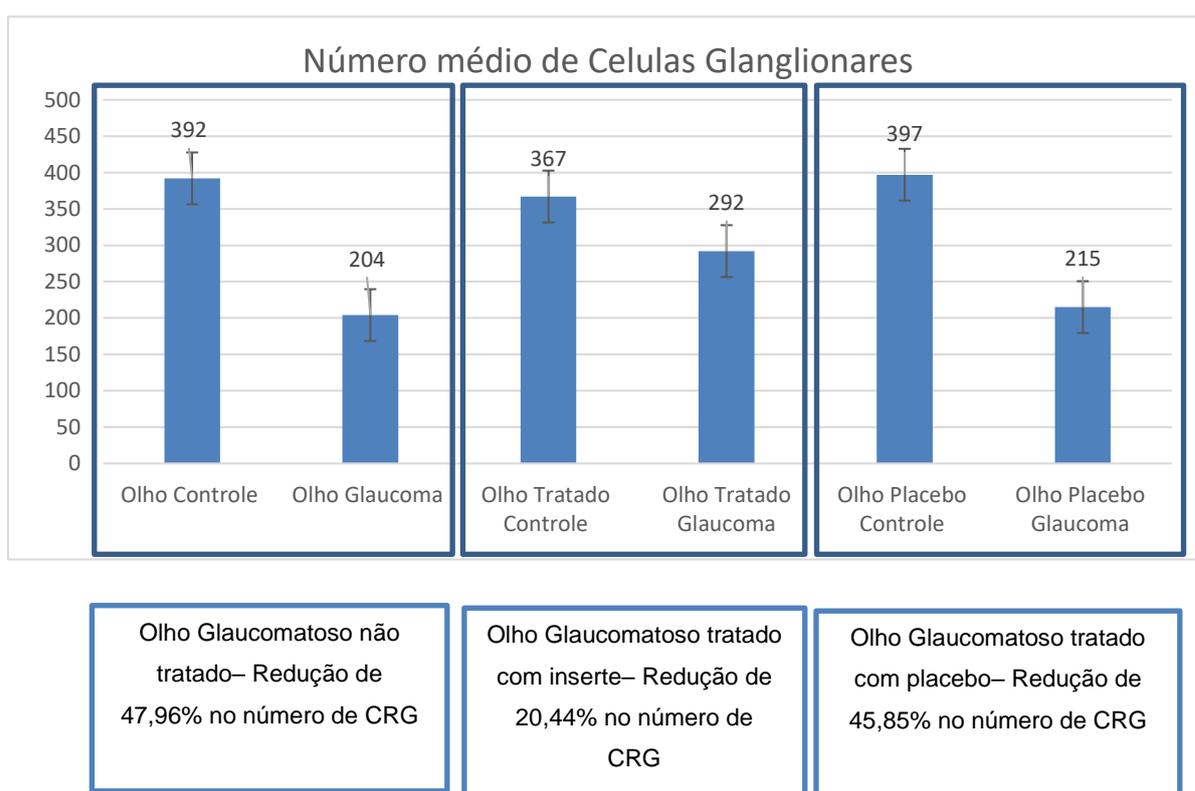


6.5 Avaliação histológica das células ganglionares da retina.

Além dos efeitos do inserte na diminuição da PIO podemos observar uma melhor preservação do número de células ganglionares da retina (CGR). As médias dos números de CGR nos diferentes subgrupo pode ser observada na **Figura 34**, os animais glaucomatosos não tratados (olho glaucoma) e animais glaucomatosos tratados com o placebo (olho placebo glaucoma) mostraram uma grande redução no número de CGR quando comparados com o olho controle (grupo não tratado: Olho controle $392 \pm 4,16$, olho com glaucoma induzido: $204 \pm 3,12$ – redução de 47,96% no número de CGR ; grupo tratado com placebo: Olho controle $397 \pm 3,24$, olho glaucoma $215 \pm 6,50$ – redução de 45,85% no

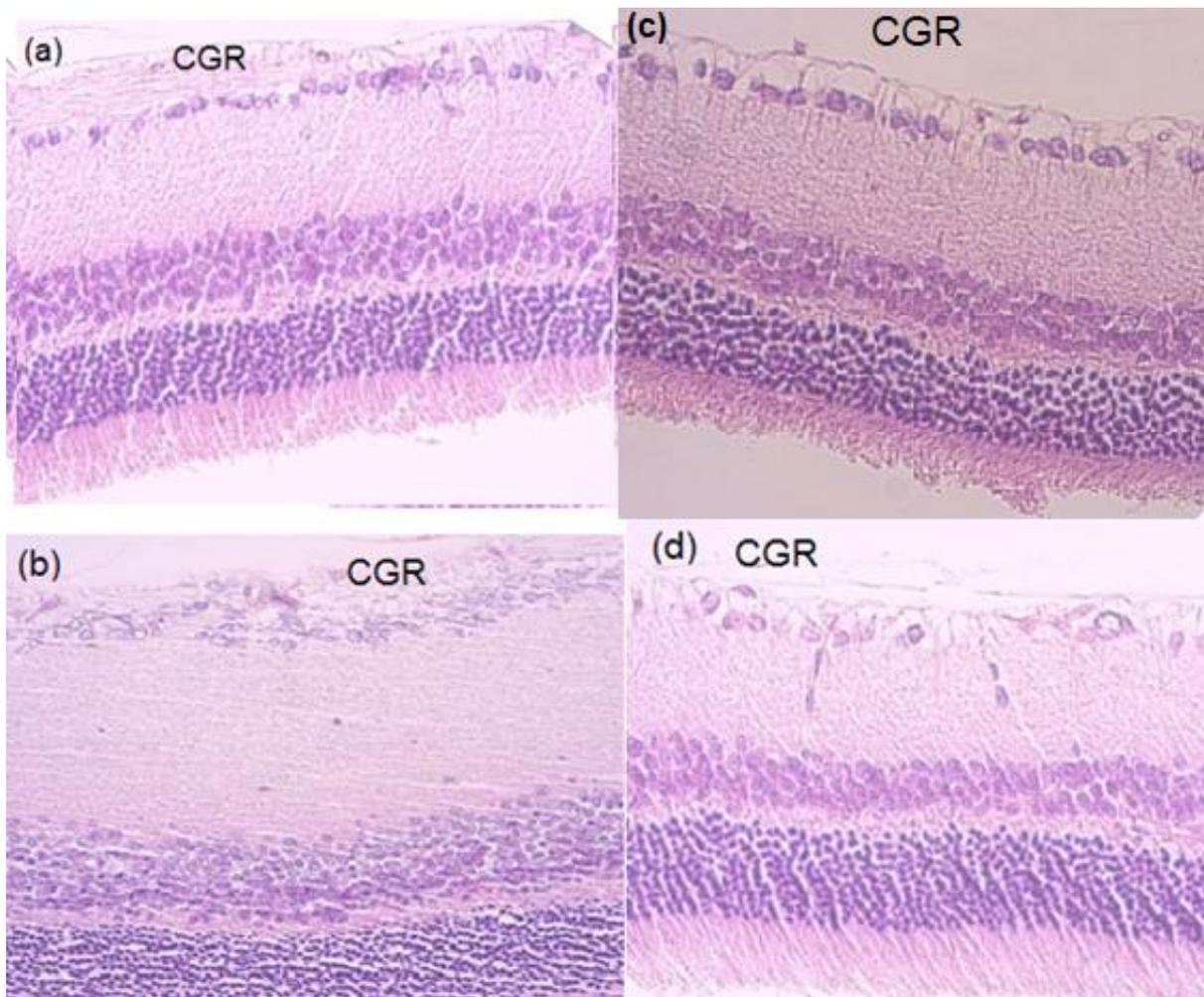
número de células CGR). Já nos animais tratados com o inserte com SAF14 observamos uma perda muito menor das CGR (Olho controle: $367 \pm 4,38$, olho com glaucoma tratado: $292 \pm 7,94$ - redução de 20,44% no número de CGR). Tais resultados corroboram a ideia de que o inserte, além de auxiliar na redução da PIO, possui um efeito protetor do tecido.

Figura 34: Número médio de células Ganglionares – No primeiro quadro dados do animal controle: olho esquerdo (olho controle não glaucomatoso) e olho direito (olho glaucomatoso não tratado); no segundo quadro o animal tratado com inserte com ativo: olho esquerdo não glaucomatoso (olho tratado controle) e olho direito glaucomatoso tratado com inserte com ativo (olho tratado glaucoma); no terceiro quadro observa-se dados do animal tratado com inserte placebo: olho esquerdo não glaucomatoso (olho placebo controle) e olho direito glaucomatoso tratado com placebo (olho placebo glaucoma).



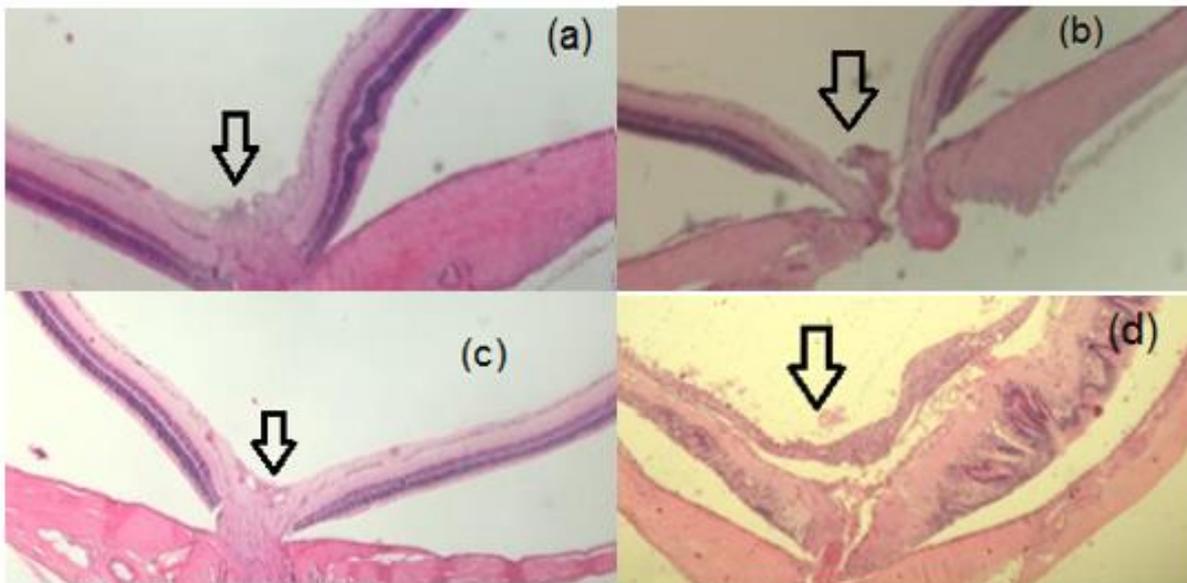
Na **Figura 35** está apresentado imagens histológicas representativas da retina mostrando a variação do número de CGR, podemos observar uma maior perda no número de CGR no grupo glaucomatoso que não foi tratado com o inserte contendo o ativo.

Figura 35: Corte Histológico da Retina. (a) Animais não glaucomatosos (olho placebo controle); (b) Animais não glaucomatosos (olho tratado controle); (c) animais glaucomatosos tratados com inserte 75:25 com ativo (olho glaucomatoso tratado); (d) animais glaucomatosos tratados com placebo 75:25 (olho glaucomatoso controle apresentando uma evidente perda de CGR, com aumento do espaço entre os núcleos das CGR.



Além disso, a redução no número de CGR causada pela PIO elevada levou a uma perda severa de fibras neurais com consequente aumento da escavação da cabeça do nervo óptico **FUGURA 36**. Estes efeitos foram reduzidos no tratamento com o inserte carregando o ativo. Tais dados em conjunto indicaram que a utilização do inserte com a substancia SAF14, além de promover a redução da PIO induziu uma neuroproteção, sugerindo a perda de CGR (Franca et al. 2014)

Figura 36: Fotomicrografia do nervo óptico. Observe a escavação do nervo óptico (setas) do (a) nervo saudável - animais não glaucomatosos; (b) nervo com escavação devido ao glaucoma – animais glaucomatosos não tratados; (c) animais glaucomatosos tratados com inserte 75:25 com ativo; (d) animais glaucomatosos tratados com placebo 75:25



6.6 Conclusão

Este estudo avaliou a viabilidade de desenvolvimento e produção de um inserte composto de condroitina e quitosana, para a veiculação de uma substância inédita com atividade antiglaucomatosa, e sua superioridade sobre um inserte composto apenas de quitosana. Os insertes foram produzidos a partir de filmes, e constatou-se por meio de análise térmica e de espectrometria no infravermelho, que o composto químico e o corante estavam dispersos no sistema polimérico, não havendo, portanto, alterações em sua constituição química. O inserte apresentou, também, um pH compatível com a aplicação no tecido ocular e boa propriedade de intumescimento e manutenção da integridade. Os insertes demonstraram a capacidade de reduzir a PIO nos animais do grupo tratado, além de apresentarem a capacidade de diminuir o dano das células ganglionares da retina. Os insertes preparados apresentaram características físicas e químicas adequadas para serem utilizados como veículos de liberação prolongada de forma eficaz e segura, e demonstraram um alto potencial para o tratamento do glaucoma.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, P., G. J. Strijkers, et al. (2010). "**Chitosan-based systems for molecular imaging.**" *Advanced Drug Delivery Reviews* 62(1): 42-58

Almeida HG. **Gonioscopia e biomicroscopia do segmento anterior.** In: Almeida HG. (ed.). *Imagens em Glaucoma: Semiologia Estrutural.* pp. 1-181, Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2015

AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY Glaucoma Panel. **Primary open-angle glaucoma suspect.** Preferred practice pattern. San Francisco: American Academy of Ophthalmology, 2000:1-26

BALI JP, Cousse H, Neuzil E (2001) **Biochemical basis of the pharmacologic action of chondroitin sulphates on the osteoarticular system.** *Semin Arthritis Rheum* 31:58–68

BARRY V. Pepich, Teri A. Dattilio, Patricia S. Fair, David J. Munch, Gilbert Gordon, Zsolt Körtvélyesi, **An improved colorimetric method for chlorine dioxide and chlorite ion in drinking water using lissamine green B and horseradish peroxidase,** *Analytica Chimica Acta*, Volume 596, Issue 1, 16 July 2007, Pages 37-45, ISSN 0003-2670

Benozzi J, Nahum LP, Campanelli JL, Rosenstein RE. **Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats.** *Invest OphthalmolVis Sci.* 2002;43:2196–2200

BERA, S., & LINHARDT, R. J. (2011). **Design and synthesis of unnatural heparosan and chondroitin building blocks.** *The Journal of Organic Chemistry*, 76(9), 3181–3193. <http://doi.org/10.1021/jo200076z>

BICAS, H.E.A. **Morfologia do sistema visual.** *Medicina, Ribeirão Preto, Simpósio: Oftalmologia para o clínico* 30:7-15, jan./mar. 1997.

BOURGES J.L., Bloquel C, Thomas A., Froussart F., Bochot A., Azan F., Gurny R., BenEzra D., Behar-Cohen F. **Intraocular implants for extended drug delivery: therapeutic applications** *Adv. Drug. Deliv. Rev.* (2006).

BROMAN AT, Quigley HA, West SK, et al. **Estimating the rate of progressive visual field damage among those with open-angle glaucoma from cross-sectional data.** Invest Ophthalmol Vis Sci 2008; 49: 66–76

Brunton, L.L. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012

Cassin, B. (2011). **Dictionary of Eye Terminology.** Triad Communications: Gainesville, FL

CASSON, R. J., G. Chidlow, et al. (2012). "**Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts.**" Clinical & Experimental Ophthalmology 40(4): 341-349.

Chenn PP. **Risk and risk factors for blindness from glaucoma.** Curr Opin Ophthalmol. 2004; 15:107-11.

COLEMAN, A. (1999). **Glaucoma.** *The Lancet*, 354(9192), 1803-1810.

CONTE A, Volpi N, Palmieri L, Bahous I, Ronca G (1995) **Biochemical and pharmacokinetic aspects of oral treatment with chondroitin sulfate.** Arzneimittelforschung 45:918–925

DAWAR, R., N. Gupta, et al. (2010). "**Analysis of ovarian tumor pathology by Fourier Transform Infrared Spectroscopy.**" Journal of Ovarian Research 3: 27

DENUZIERE, A. Ferrier, D. Damour, O. and A. Domard, **Chitosan-chondroitin sulfate and chitosanhyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties,** Biomaterials, 19 (1998) 1275–1285.

E.M. DEL AMO, A. Urtti **Current and future ophthalmic drug delivery systems A shift to the posterior segment** Drug Discov. Today (2008)

EFENTAKIS, M., M. Vlachou & N.H. Choulis (1997) **Drug Dev. Ind. Pharm.** 23: 107-12. 21.

FOOT, M.; MULHOLLAND, M. Classification of chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C, glucosamine hydrochloride and glucosamine 6 sulfate using chemometric techniques. **J Pharm Biomed Anal.** V. 38, n. 3, p. 397-407. 2005

FRANCA, J. R., Foureaux, G., Fuscaldi, L. L., Ribeiro, T. G., Rodrigues, L. B., Bravo, R., Castilho, R. O., Yoshida, M. I., Cardoso, V. N., Fernandes, S. O., Cronemberger, S., Ferreira, A. J., ... Faraco, A. A. (2014). **Bimatoprost-loaded ocular inserts as sustained release drug delivery systems for glaucoma treatment: in vitro and in vivo evaluation.** PloS one, 9(4), e95461. doi:10.1371/journal.pone.0095461

Friedman DS, Wolfs RC, O'Colmain BJ, et al. **Prevalence of open-angle glaucoma among adults in the United States.** Arch Ophthalmol. 2004;122(4):532-8.

Glaucoma treatment trends: a review Ronan Conlon, MD,* Hady Saheb, MD, MPH, FRCSC,† Iqbal Ike K. Ahmed, MD, FRCSC

HASSAN, E. E.; Gallo, J. M. **A simple rheological method for the in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength.** Pharm Res.7(5):491-5. 1990

Henderer, J. D., and Rapuano, J. D. (2006). **Ocular pharmacology.** In **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics** (L. E. Limbird, Ed.), pp. 1707–1737. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York

HU, C.-S., S.-L. Tang, et al. (2014). "**Characterization and anti-tumor effects of chondroitin sulfate–chitosan nanoparticles delivery system.**" Journal of Nanoparticle Research 16(11): 1-15.

HUGHES, GM. **Open-angle glaucoma.** American Family Physician. United States, 67, 9, 1937-1944, May 1, 2003. ISSN: 0002-838X.

IOVU, M., Dumais, G., & Du Souich, P. (2008). **Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. Osteoarthritis and Cartilage / OARS**, Osteoarthritis Research Society, 16 Suppl 3, S14-8. M

JANS RG, Hassard DT. **Lissamine green—a supravital stain for determination of corneal endothelial viability.** *Can J Ophthalmol.* 1967;2:297–302

KAHOOK, Malik Y, and Robert J Noecker. **“Evaluation of Adherence to Morning versus Evening Glaucoma Medication Dosing Regimens.”** *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)* 1.1 (2007): 79–83. Print.

KAUFMAN P.L.; ALM A. **Fisiología del ojo: Hidrodinámica del humor acuoso.** 10ed. Elsevier. 2004.

KAUR, G., Rana, V., Jain, S., & Tiwary, A. K. (2010). **Colon Delivery of Budesonide: Evaluation of Chitosan–Chondroitin Sulfate Interpolymer Complex.** *AAPS PharmSciTech*, 11(1), 36–45. <http://doi.org/10.1208/s12249-009-9353-8>

KHALID, M. N., F. Agnely, et al. (2002). **"Water state characterization, swelling behavior, thermal and mechanical properties of chitosan based networks."** *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15(5): 425-432

Krishna Patel, Shuchi Patel, **Angle-closure glaucoma, Disease-a-Month,** Volume 60, Issue 6, June 2014, Pages 254-262, ISSN 0011-5029

KULKARNI, S. V., Damji, K. F., & Buys, Y. M. (2008). **Medical management of primary open-angle glaucoma: Best practices associated with enhanced patient compliance and persistency.** *Patient Preference and Adherence*, 2, 303–314.

KUMAR, M. N. V. R., R. A. A. Muzzarelli, et al. (2004). **"Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives."** *Chemical Reviews* 104(12): 6017-6084

KUMAR, M.N.V.; KUMAR, N. **Polymeric controlled drug delivery systems: perspective issues and opportunities.** Drug dev. Ind. Pharm., New York, v. 27, p. 1-30, 2001.

KUMIRSKA, J. et al. **Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan.** Marine Drugs, v. 8, n. 5, p. 1567-1636

LECETA, I. et al. **Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films.** Journal of Food Engineering, v. 116, n. 4, p. 889-899, 6. 2013

LEE, D.; HIGGINBOTHAM, E. **Glaucoma and its treatment: A review.** American Journal Of Health-System Pharmacy, v. 62, n. 7, p. 691-699, 2005a. ISSN 1079-2082

Levkovitch-Verbin, H.; Martin, K.R.; Quigley, H.A.; Baumrind, L.A.; Pease, M.E.; Valenta, D. **Measurement of amino acid levels in the vitreous humor of rats after chronic intraocular pressure elevation or optic nerve transection.** J. Glaucoma 2002, 11, 396–405.

LINHARDT R.J., **Analysis of glycosaminoglycans with polysaccharide lyases,** Curr. Protoc. Mol. Biol. (2001) chap. 17, unit 17, 13B.

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

MACKNIGHT, A.D.C.; MCLAUGHLIN, C.W.; PEART, D. PURVES, R.D.; CARRÉ, D.A.; CIVAN, M.M. **Formation of the aqueous humor. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** (2000) 27, 100–106

MALAVAKI C, Mizumoto S, Karamanos N, Sugahara K (2008) **Recent advances in the structural study of functional chondroitin sulfate and dermatan sulfate in health and disease.** Connect Tissue Res 49:133–139.

MANTRAVADI, A. V. and N. Vadhar (2015). "**Glaucoma.**" Primary Care: Clinics in Office Practice 42(3): 437-449.

MCKINNON, S. J. et al. **Current management of glaucoma and the need for complete therapy.** Am J Manag Care, v. 14, n. 1 Suppl, p. S20-7, 2008.

MI FL, Shyu SS, Peng CK, Wu YB, Sung HW, Wang PS, et al. **Fabrication of chondroitin sulphate–chitosan composite artificial extracellular matrix for stabilization of fibroblast growth factor.** J Biomed Mater Res 2006;76A:1–15

MORENO, M. C. et al. **A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid.** Experimental Eye Research, v. 81, n. 1, p. 71-80, Jul 2005

MOVASAGHI Z., Rehman S. and Rehman I., **Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy of biological tissues,** Appl. Spectrosc. Rev., 2008, 43, 134–179

MURA, S., F. Corrias, et al. (2011). **"Innovative Composite Films of Chitosan, Methylcellulose, and Nanoparticles."** Journal of Food Science 76(7): N54-N60

NATU, M. V., M. N. Gaspar, et al. (2011). **"In vitro and in vivo evaluation of an intraocular implant for glaucoma treatment."** International Journal of Pharmaceutics 415(1–2): 73-82.

ÖNER, L., EROGLU, H., SARGON, M. F. **Chitosan formulations for steroid delivery: effect of formulation variables on in vitro characteristics.** Drug Dev. Ind. Pharm., v. 33, p. 265–271, 200

PANG, I.H., Clark, A.F. (2007). **Rodent Models of Glaucoma Retinopathy and Optic Neuropathy.** J Glaucoma., 16(5), 483-505.

PARANHOS, A. J. et al. **3° Consenso Brasileiro de Glaucoma Primário de Ângulo Aberto.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Glaucoma, 2009

PARK YJ, Lee YM, Lee JY, Seol YJ, Chung CP, Lee SJ. **Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulphate–chitosan sponge for guided bone regeneration.** J Control Release 2000;67:385–94.

PRAÇA, Fabíola Silva Garcia. **Liberção e permeação in vitro de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais**. 2010. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010. doi:10.11606/T.60.2010.tde-10102010-215730. Acesso em: 2018-12-06.

PRASHANTHA KVH, Tharanathan RN. 2007. **Chitin / chitosan: modifications and their unlimited application potential – an overview**. Trends Food Sci Technol 18:117–31

QUIGLEY HA, Broman A. **The number of persons with glaucoma worldwide in 2010 and 2020**. Br J Ophthalmology 2006; 90: 151–56.

QUIGLEY HA, Friedman DS, Hahn SR. **Evaluation of practice patterns for the care of open-angle glaucoma compared with claims data: the Glaucoma Adherence and Persistency Study**. Ophthalmology. 2007;114:1599–606.

QUIGLEY, Harry A. **Glaucoma**, The Lancet, Volume 377, Issue 9774, 16–22 April 2011, Pages 1367-1377, ISSN 0140-6736, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61423-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61423-7)

RAFUSE P. E. , “**Clinical trials in glaucoma**,” in The Evidence-Based Eye Care, P. J. Kertes and T. M. Johnson, Eds., pp. 73–108, Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

RESNIKOFF, S. et al. **Global data on visual impairment in the year 2002**. Bull. World Health Org., Genebra, v. 82, n. 11, p. 844-51, 2004

RESNIKOFF, S., Pascolini, D., Mariotti, S. P., & Pokharel, G. P. (2008). **Global magnitude of visual impairment caused by uncorrected refractive errors in 2004**. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(1), 63-70.

RIMAYANTI U, Kiuchi Y, Uemura S, Takenaka J, Mochizuki H, Kaneko M. **Ocular Surface Displacement with and without Contact Lenses during Non-Contact Tonometry**. PLoS One. 2014;9(4):e96066.

RINAUDO, M. (2006). "**Chitin and chitosan: Properties and applications.**" Progress in Polymer Science 31(7): 603-632

RIORDAN-Eva P, Vaughan DG. Eye. In: Tierney LM Jr, McPhee S J, Papadakis MA, eds. **Current medical diagnosis & treatment, 2001**. 40th ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2001:185-216.

RIOS, M. **Polymers for Controlled Release: Formulation Follows Function.** Pharm. Technol., New York, v. 29, n. 6, p. 42-50, 2005

RODRIGUES, L. B., H. F. Leite, et al. (2009). "**In vitro release and characterization of chitosan films as dexamethasone carrier.**" International Journal of Pharmaceutics 368(1–2): 1-6

SACCÀ, S. C., C. Cartiglia, et al. (2014). Chapter 4 - **Glaucoma: An Overview. Handbook of Nutrition, Diet and the Eye.** V. R. Preedy. San Diego, Academic Press: 29-40.

SCHIALDI, C., Cimini, D., & Rosa, M. (2010). **Production of chondroitin sulfate and chondroitin.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(4), 1209-1220.

SILVA MJ, Temporini ER, Neustein I, Araújo ME. **Conhecimentos sobre prevenção e tratamento de glaucoma entre pacientes de unidade hospitalar.** Arq Bras Oftalmol. 2004;67(5):785-90

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C. e MORRILL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**, 5. ed., New York: John Wiley and Sons, 1991

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

SMRITILEKHA, B., George, G.Z. and Schweizer, F. (2008) **Design, synthesis, and antibacterial activities of Neomycin Lipid conjugates: polycationic lipids with potent Gram-Positive activity.** J Med Chem 51, 6160–6164.

Sociedade Brasileira de Glaucoma [sítio na Internet]. São Paulo: ABRAG
Disponível em <http://www.sbglaucoma.com.br/> , acessado em Julho de 2015

Tham, Yih-Chung et al. **Global Prevalence of Glaucoma and Projections of Glaucoma Burden through 2040.** Ophthalmology 2014, Volume 121 , Issue 11 , 2081 – 2090

The Eye Disease Research Group ; **Prevalence of open-angle glaucoma among adults in the United States;** Arch Ophthalmol, 122 (2004), pp. 532–538

The Glaucoma Laser Trial (GLT) and glaucoma laser trial follow-up study:
Glaucoma Laser Trial Research Group. Am J Ophthalmol 1995;120:718–31

UEBELHART, D., E. J. M. A. Thonar, et al. (1998). "**Effects of oral chondroitin sulfate on the progression of knee osteoarthritis: a pilot study.**" Osteoarthritis and Cartilage 6, Supplement A: 39-46

VAUGHAN D, Riordan-Eva R Glaucoma. In: Vaughan D, Asbury T, Riordan-Eva P, eds. General ophthalmology. 15th ed. Stamford, Conn.: Appleton & Lange, 1999:200-15.

VOLPI N (2006), **Chondroitin Sulfate: Structure, Role, and Pharmacological Activity,** Academic Press, San Diego.

VOLPI, Nicola. (2010). **High-performance liquid chromatography and on-line mass spectrometry detection for the analysis of chondroitin sulfates/hyaluronan disaccharides derivatized with 2-aminoacridone.** Analytical Biochemistry, 397(1),12

WEINREB, R. N. and P. T. Khaw (2004). "Primary open-angle glaucoma." The Lancet 363(9422): 1711-1720.

WESTON BC, Aliabadi Z, White GL. Glaucoma--review for the vigilant clinician. *Clinician Reviews* 2000;10:59-74.

WHO Handbook of Resolutions and Decisions, Vol. 1, 1977, p. 127

WOOD BR, Quinn MQ, Tait B, Romeo M, Mantsch HH: **A FTIR spectroscopic study to identify potential confounding variables and cell types in screening for cervical malignancies.** *Biospectroscopy* 1998, 4: 75-91

XIA, W., P. Liu, et al. (2011). "**Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides.**" *Food Hydrocolloids* **25**(2): 170-179.

Y.L. Lo, K.H. Sung, C.C. Chiu, L.F. Wang - **Chemically conjugating polyethylenimine with chondroitin sulfate to promote CD44-mediated endocytosis for gene delivery** *Mol. Pharm.*, 10 (2013), pp. 664–67

YEH MK, Cheng KM, Hu CS, Huang YC, Young JJ (2011) **Novel protein-loaded chondroitin sulfate–chitosan nanoparticles: preparation and characterization.** *Acta Biomaterialia* 7:3804–3812.
doi:10.1016/j.actbio.2011.06.026

YUAN, N.-Y., R.-Y. Tsai, et al. (2008). "**Fabrication and characterization of chondroitin sulfate-modified chitosan membranes for biomedical applications.**" *Desalination* 234(1–3): 166-174.

ANEXO



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 13/2018**Título do projeto:** Desenvolvimento, caracterização e avaliação in vitro e in vivo de inserts poliméricos formados por quitosana e condroitina com ação antiglaucomatosa.**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Giselle Foureaux Heida**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas**Departamento:** Departamento de Morfologia**Situação atual:** **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião do dia 23/04/2018. Validade: 23/04/2018 à 22/04/2023
Belo Horizonte, 24/04/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

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
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br