

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FÁRMACIA

LIEGE APARECIDA MAPA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE INSERTES
OCULARES MULTIDROGA COM POTENCIAL AÇÃO
ANTIGLAUCOMATOSA

Belo Horizonte

2023

LIEGE APARECIDA MAPA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE INSERTES
OCULARES MULTIDROGA COM POTENCIAL AÇÃO
ANTIGLAUCOMATOSA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. André Augusto Gomes Faraco

Belo Horizonte

2023

M297d Mapa, Liege Aparecida.
Desenvolvimento e caracterização de insertes oculares multidroga com potencial ação antiglaucomatosa [recurso eletrônico] / Liege Aparecida Mapa. – 2023.
1 recurso eletrônico (110 f. : il.) : pdf.

Orientador: André Augusto Gomes Faraco.

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

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader

1. Glaucoma – Teses. 2. Bimatoprost – Teses. 3. Timolol – Teses. 4. Agentes antiglaucoma – Teses. 5. Polímeros – Teses. 6. Liberação controlada de fármacos – Teses. 7. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. I. Faraco, André Augusto Gomes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 617.741



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

“DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE INSERTES OCULARES MULTIDROGA COM POTENCIAL AÇÃO ANTIGLAUCOMATOSA”

LIEGE APARECIDA MAPA

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.

Profa. Dra. Aina Liz Alves César
Centro Universitário UNA

Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. André Augusto Gomes Faraco - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 13 de fevereiro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Andre Augusto Gomes Faraco, Professor do Magistério Superior**, em 13/02/2023, às 11:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rachel Oliveira Castilho, Professora do Magistério Superior**, em 13/02/2023, às 14:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aina Liz Alves Cesar, Usuária Externa**, em 14/02/2023, às 15:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 2033377 e o código CRC AB3A2A94.

À minha família, meu bem mais precioso.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fortalecer e a Nossa Senhora por interceder por mim.

Aos meus pais por serem os meus orientadores da vida.

Aos meus irmãos por serem meus melhores amigos e meu porto seguro.

Aos meus sobrinhos por serem o amor mais doce que já experimentei.

Ao meu amor Yugo, que ao longo deste projeto se tornou também meu marido. Obrigada por estar ao meu lado em mais um sonho. Obrigada por construir uma família comigo.

À família Kajiya por ser minha segunda família.

Ao meu orientador Prof. André Faraco por tanto conhecimento compartilhado, por me permitir fazer parte deste projeto e pela disponibilidade e compreensão em todos os momentos.

À aluna de iniciação científica, Lídia Gomes, por toda ajuda e dedicação com este trabalho.

A minha querida equipe do laboratório de Desenvolvimento Analítico da Globo Pharma, obrigada pelo incentivo e por tudo que compartilham comigo.

Ao meu querido ex-estagiário, amigo e mestrando Rafael Christian por ter me apoiado tanto ao longo deste trabalho.

As minhas queridas amigas, madrinhas e mestrandas Bárbara Leão e Maisa Fernandes, por terem dividido este desafio e tantos outros comigo.

Aos meus amigos por tornarem minha caminhada mais leve.

Ao Dr. José Coelho Neto e a MsC Renata Fontes Prado pelas aquisições dos espectros no infravermelho das amostras deste trabalho

Às Doutoradas Maria Irene e Betânia pela aquisição das curvas de DSC e de TGA das amostras deste trabalho.

Ao Dr. Hugo Mota da Universidade Federal de Campina Grande e ao Centro de Microscopia da UFMG pela aquisição das micrografias utilizando Microscopia eletrônica de Varredura.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

O melhor disso tudo foi descobrir que pude ir mais longe, depois de pensar que não podia mais e que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida. E jamais devemos deixar que nossas dúvidas traidoras nos façam perder o bem que poderíamos conquistar e fazer, se não fosse o medo de tentar.

William Shakespeare

RESUMO

O glaucoma é uma das principais causas de cegueira no mundo. Colírios contendo fármacos como os análogos de prostaglandinas (bimatoprost) e beta bloqueadores adrenérgicos (maleato de timolol) são utilizados no tratamento desta doença. A baixa adesão ao tratamento e limitações da forma farmacêutica podem ocasionar falta de controle da doença e efeitos colaterais. Neste sentido, novos dispositivos para liberação de fármacos na cavidade ocular têm sido desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa e descritos na literatura. Por outro lado, o tratamento utilizando mais de um fármaco tem sido utilizado na terapêutica da doença visando ampliar de forma sinérgica a ação destas substâncias. Portanto, este trabalho teve por objetivos, o desenvolvimento e caracterização de sistema polimérico na forma de insertes contendo dois fármacos: bimatoprost e maleato de timolol, para o potencial tratamento do glaucoma. Os insertes, obtidos por evaporação de solvente, foram desenvolvidos com uma, duas e três camadas. Foram realizadas caracterizações físico-químicas de determinação de peso, determinação do teor e uniformidade de conteúdo dos fármacos nos insertes e capacidade de liberação dos ativos *in vitro*, análises térmicas, espectrometria no infravermelho e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Foram determinados o potencial de hidratação, pH de superfície, além do desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação dos fármacos. O método foi desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência e se mostrou seletivo, linear, preciso e exato para quantificação dos fármacos bimatoprost e maleato de timolol. Os dispositivos apresentaram uniformidade de peso e de conteúdo de acordo com o preconizado pelas principais farmacopeias. Os insertes se mantiveram íntegros durante o teste de hidratação com influxo de água menor nos que apresentavam fármaco devido à possíveis interações intermoleculares entre os fármacos e o polímero. Não foi possível observar diferenças entre os insertes com e sem fármacos nos espectros no infravermelho. As curvas de DSC não demonstraram nenhum evento térmico relacionado à degradação do fármaco. Estes dados permitem inferir que não houve incompatibilidades entre os fármacos e o polímero. Os insertes apresentaram superfície homogênea e lisa além da identificação das diferentes camadas quando analisados por MEV. O pH de superfície de todos os insertes foi de 5,0 compatível com uso ocular. O teste de liberação *in vitro* mostrou que os insertes tiveram uma liberação dos fármacos de 100 %. Em todos os insertes foi observada, nas condições do teste realizado, liberação por quatro dias sendo o de uma camada de liberação mais rápida que os demais. Todos os dados obtidos permitem inferir que os insertes desenvolvidos tem potencial para uso no tratamento do glaucoma. Testes *in vivo* devem ser feitos para comprovar os resultados obtidos de forma *in vitro* neste trabalho para determinar a correlação *in vitro/in vivo*.

Palavras chaves: glaucoma; bimatoprost; maleato de timolol; insertes oculares; desenvolvimento de método analítico; caracterização de sistemas poliméricos.

ABSTRACT

Glaucoma is one of the leading causes of blindness in the world. Eye drops containing drugs such as prostaglandin analogues (bimatoprost) and beta-adrenergic blockers (timolol maleate) are used in the treatment of this disease. Low adherence to treatment and limitations of the pharmaceutical form can cause lack of disease control and side effects. In this sense, new devices for drug release into the ocular cavity have been developed by our research group and described in the literature. On the other hand, treatment using more than one drug has been used in the treatment of the disease in order to synergistically increase the action of these substances. Therefore, this work aimed to develop and characterize a polymeric system in the form of inserts containing two drugs: bimatoprost and timolol maleate, for the potential treatment of glaucoma. The inserts, obtained by solvent evaporation, were developed with one, two and three layers. Physical-chemical characterizations were carried out to determine weight, determination of the content and uniformity of drug content in the inserts and in vitro release capacity of actives, thermal analyses, infrared spectrometry and Scanning Electron Microscopy (SEM). The hydration potential, surface pH were determined, in addition to the development and validation of an analytical method for the quantification of drugs. The method was developed using high-performance liquid chromatography and proved to be selective, linear, precise and accurate for the quantification of bimatoprost and timolol maleate drugs. The devices presented uniformity of weight and content in accordance with the recommendations of the main pharmacopoeias. The inserts remained intact during the hydration test with a lower water influx in those containing the drug due to possible intermolecular interactions between the drugs and the polymer. It was not possible to observe differences between the inserts with and without drugs in the infrared spectra. DSC curves did not demonstrate any thermal event related to drug degradation. These data allow inferring that there were no incompatibilities between the drugs and the polymer. The inserts presented a homogeneous and smooth surface, in addition to the identification of the different layers when analyzed by SEM. The surface pH of all inserts was 5.0 compatible with ocular use. The in vitro release test showed that the inserts had a drug release of 100%. In all inserts, under the conditions of the test carried out, release was observed for four days, with one layer releasing faster than the others. All data obtained allow inferring that the developed inserts have potential for use in the treatment of glaucoma. In vivo tests must be performed to confirm the results obtained in vitro in this work to determine the in vitro/in vivo correlation.

Key words: glaucoma; bimatoprost; timolol maleate; ocular inserts; analytic development method; polymeric system characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Estrutura química do fármaco bimatoprost	15
Figura 2- Estrutura química do fármaco timolol	16
Figura 3- Anatomia do olho humano	19
Figura 4- Ilustração esquemática comparativa entre olho normal e olho com glaucoma	21
Figura 5- Desacetilação da quitina na formação da quitosana	29
Figura 6- Cromatograma obtido para o maleato de timolol no teste 1	40
Figura 7- Cromatograma referente ao teste 2 para quantificação dos ativos bimatoprost e maleato de timolol.	41
Figura 8- Cromatogramas referentes ao teste 4 para quantificação dos ativos (a) bimatoprost (210 nm) e (b) maleato de timolol (295 nm).	43
Figura 9- Cromatogramas referentes ao teste 5 para quantificação dos ativos bimatoprost e maleato de timolol.	45
Figura 10- Cromatogramas referentes ao diluente (Tampão fosfato: acetonitrila (55:45)) em 210 nm (a) e 295 nm (b)	48
Figura 11- Cromatogramas referentes a solução placebo de 1 camada em	49
Figura 12- Cromatogramas referentes a solução placebo de 2 camadas em 210 nm (a) e 295 nm (b).	49
Figura 13- Cromatogramas referentes a solução placebo de 3 camadas em 210 nm (a) e 295 nm (b).	50
Figura 14- Cromatograma referentes a solução amostra preparada com o inserte contendo bimatoprost com pico em 210nm (a) e timolol com pico em 295 nm (b).	50
Figura 15- Cromatogramas referentes a solução padrão preparada com as substâncias químicas de referência bimatoprost (pico em 210nm) e timolol (pico em 295 nm)	51
Figura 16- Curva obtida no ensaio da linearidade da bimatoprost. Eixo x concentração $\mu\text{g/mL}$ e eixo y valores de área.	54
Figura 17- Curva obtida no ensaio da linearidade da bimatoprost. Eixo x concentração $\mu\text{g/mL}$ e eixo y valores de área.	54
Figura 18-Representação gráfica dos resíduos para bimatoprost.	56
Figura 19-Representação gráfica dos resíduos para maleato de timolol.	57
Figura 20-Quadro da recuperação esperada como função da concentração do analito	58
Figura 21- Quadro da precisão esperada como função da concentração do analito	61
Figura 22- Obtenção dos insertes monocamada em placa siliconada	66
Figura 23- Preparação insertes oculares em membrana de diálise para o ensaio de liberação in vitro.	72
Figura 24- Inserte ocular obtido pelo método de evaporação de solvente	73
Figura 25- Esquema proposto de absorção de água pelo inserte em condições sem fármacos (A) e com fármacos (B)	79
Figura 26- Bimatoprost (a) e timolol (b) com grupos capazes de formar interações por ligações de hidrogênio	84

Figura 27- Espectros de absorção da região do infravermelho de (a) insertes bicamada contendo os fármacos maleato de timolol e bimatoprost e (b) insertes brancos bicamada	85
Figura 28- Espectros de absorção da região do infravermelho de (a) insertes tricamada contendo os fármacos maleato de timolol e bimatoprost e (b) insertes brancos tricamada	85
Figura 29- Micrografias eletrônicas de varredura da superfície dos insertes: monocamada (sem fármaco A e com fármaco B); bicamada (sem fármaco C e com fármaco D) e tricamada (sem fármaco E e com fármaco F)	87
Figura 30- Micrografias eletrônicas de varredura de corte lateral criogênico dos insertes: monocamada (sem fármaco A e com fármaco B); bicamada (sem fármaco C e com fármaco D) e tricamada (sem fármaco E e com fármaco F).	89
Figura 31- Comportamento térmico da quitosana.	91
Figura 32- Comportamento térmico maleato de timolol.	92
Figura 33- Comportamento térmico da mistura física lissamina:quitosana:timolol:água.	93
Figura 34- Comportamento térmico das amostras 1 CB e 1 CF.	94
Figura 35- Comportamento térmico das amostras 2 CB e 2 CF.	95
Figura 36- Comportamento térmico das amostras 3 CB e 3 CF.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Parâmetros de avaliação da adequabilidade do sistema	47
Tabela 2- Resultados obtidos na avaliação da adequabilidade do sistema	47
Tabela 3- Preparo das soluções da linearidade	52
Tabela 4- Resultados obtidos no ensaio da linearidade da bimatoprostá	53
Tabela 5- Resultados obtidos no ensaio da linearidade do maleato de timolol	53
Tabela 6- Preparo das soluções da exatidão	58
Tabela 7- Resultados obtidos no ensaio da exatidão da bimatoprostá	59
Tabela 8- Resultados obtidos no ensaio da exatidão do maleato de timolol.	60
Tabela 9- Resultados obtidos no ensaio da precisão da bimatoprostá	61
Tabela 10- Resultados obtidos no ensaio da precisão do maleato de timolol	62
Tabela 11- Parâmetros avaliados no teste de Youden & Steiner	63
Tabela 12- Delineamento do teste de Youden & Steiner	63
Tabela 13- Resultados obtidos no ensaio de Robustez para os ativos bimatoprostá e maleato de timolol	64
Tabela 14- Avaliação dos parâmetros alterados no teste de robustez	64
Tabela 15- Resultados encontrados para determinação de peso para os dispositivos desenvolvidos com uma, duas e três camadas.	74
Tabela 16- Valores médios de determinação do pH de superfície para os dispositivos desenvolvidos	82
Tabela 17- Teor de fármaco nos dispositivos desenvolvidos	97
Tabela 18- Uniformidade de conteúdo dos dispositivos desenvolvidos- Valor de aceitação	98
Tabela 19- Uniformidade de conteúdo dos dispositivos desenvolvidos- Conteúdo médio	98

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Potencial de hidratação dos insertes brancos monocamada e dos insertes monocamada contendo os fármacos bimatoprost e maleato de timolol	77
Gráfico 2- Potencial de hidratação dos insertes brancos bicamada e dos insertes bicamada contendo os fármacos bimatoprost e maleato de timolol	80
Gráfico 3- Potencial de hidratação dos insertes brancos tricamada e dos insertes tricamada contendo os fármacos bimatoprost e maleato de timolol	81
Gráfico 4- Potencial de liberação <i>in vitro</i> dos insertes monocamada contendo os fármacos bimatoprost e maleato de timolol	100
Gráfico 5- Potencial de liberação <i>in vitro</i> dos insertes bicamada contendo os fármacos bimatoprost e maleato de timolol	102
Gráfico 6- Potencial de liberação <i>in vitro</i> dos insertes tricamada contendo os fármacos bimatoprost e maleato de timolol	102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATR-FTIR	Absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coefficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
GPAA	Glaucoma primário de ângulo aberto
GPAF	Glaucoma primário de ângulo fechado
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PIO	Pressão Intraocular
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
REC	Recuperação
SQR	Substância química de referência
TG	Termogravimetria
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i>
VA	Valor de aceitação

SUMÁRIO

PARTE 1- INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, OBJETIVOS E MATERIAIS	15
1 INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Anatomia e fisiologia do olho	19
2.2 Glaucoma	20
2.2.1 Tipos de glaucoma	22
2.2.2 Epidemiologia	22
2.2.3 Fatores de risco	23
2.2.4 Diagnóstico	23
2.2.5 Tratamento	25
2.3 Insertes oculares	28
2.3.1 Quitosana	28
2.4 Dispositivos de liberação sustentada atualmente aprovados	29
2.5 Terapias de liberação sustentada sob investigação clínica	30
2.6 Dispositivos de liberação multidroga	32
2.7 Justificativa	33
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.1.1 Objetivos específicos	34
4 MATERIAIS	35
4.1 Validação do método analítico	35
4.2 Produção e caracterização dos insertes	35
Parte 2- DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MALEATO DE TIMOLOL E BIMATOPROSTA EM INSERTE OCULAR	37

5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA	37
5.1 Desenvolvimento do método analítico	38
5.1.1 Teste 1	38
5.1.2 Teste 2	40
5.1.3 Teste 3	41
5.1.4 Teste 4	42
5.1.5 Teste 5	43
5.1.6 Método analítico final	45
5.2 Validação do método analítico	47
5.2.1 Adequabilidade do sistema	47
5.2.2 Seletividade	48
5.2.3 Linearidade	52
5.2.4 Faixa de trabalho (intervalo)	57
5.2.5 Exatidão	57
5.2.6 Precisão	60
5.2.7 Robustez	63
Parte 3- PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS DE LIBERAÇÃO DE MALEATO DE TIMOLOL E BIMATOPROSTA	65
6 MÉTODOS	65
6.1 Preparo de dispositivos poliméricos	65
6.1.1 Preparo de dispositivos poliméricos brancos monocamada	65
6.1.2 Preparo de dispositivos poliméricos brancos bicamada	65
6.1.3 Preparo de dispositivos poliméricos brancos tricamada	65
6.1.4 Preparo de dispositivos poliméricos monocamada contendo fármaco	65
6.1.5 Preparo dos dispositivos poliméricos bicamada contendo fármaco	66
6.1.6 Preparo dos dispositivos poliméricos tricamada contendo fármaco	66
6.1.7 Preparo da lágrima artificial pH 7,0	67
6.2 Caracterização dos dispositivos poliméricos	67
6.2.1 Porcentagem de hidratação (intumescimento)	67
6.2.2 Determinação de peso	68
6.2.3 Avaliação do pH de superfície	69

6.2.4 Espectrometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (ATR-FTIR)	69
6.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	69
6.2.6 Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC)	69
6.2.7 Teor de fármaco no dispositivo	70
6.2.8 Uniformidade de conteúdo do dispositivo	70
6.2.9 Potencial de liberação do fármaco e perfil de liberação <i>in vitro</i>	71
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
7.1 Determinação de peso	74
7.2 Porcentagem de hidratação (intumescimento)	76
7.3 pH de superfície	82
7.4 Espectrometria de na região do infravermelho	83
7.5 Microscopia eletrônica de varredura	87
7.6 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria	90
7.7 Teor de fármaco nos dispositivos	97
7.8 Uniformidade de conteúdo dos dispositivos	98
7.9 Potencial de liberação e testes de liberação <i>in vitro</i>	99
8 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS	106

PARTE 1- INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, OBJETIVOS E MATERIAIS

1 INTRODUÇÃO

O glaucoma é uma das principais causas de cegueira no mundo, estima-se que a doença irá afetar 111,1 milhões de indivíduos até 2040 (KESAV *et al.*, 2021). Trata-se de uma doença crônica cujo tratamento consiste na redução da pressão intraocular (PIO). O tipo mais comum da doença é o glaucoma primário de ângulo aberto (RIBEIRO *et al.*, 2018).

Em quase todo os tipos de glaucoma, o comprometimento do sistema nervoso se deve ao desequilíbrio entre a produção e a drenagem do humor aquoso, causando uma pressão no nervo óptico. O principal sintoma é a elevação da PIO e pode levar à cegueira, que não pode ser restaurada. No entanto, é evitável e danos adicionais podem ser minimizados com tratamento adequado, que se concentra no manejo da PIO (CEGIELSKA, SAJKIEWICZ, 2019).

Na maioria dos países, os análogos da prostaglandina como a bimatoprosta (Figura 1) são o tratamento de primeira linha do glaucoma (YADAV *et al.*, 2019). O timolol, um betabloqueador, tornou-se a primeira escolha no tratamento do glaucoma após a aprovação pelo FDA em 1978 (Figura 2) (PATEL *et al.*, 2022; UMEZURIKE *et al.*, 2019; YADAV *et al.*, 2019). Ambos são comumente usados na forma de colírio.

Figura 1-Estrutura química do fármaco bimatoprosta

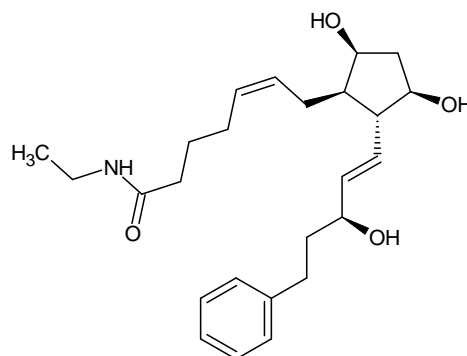
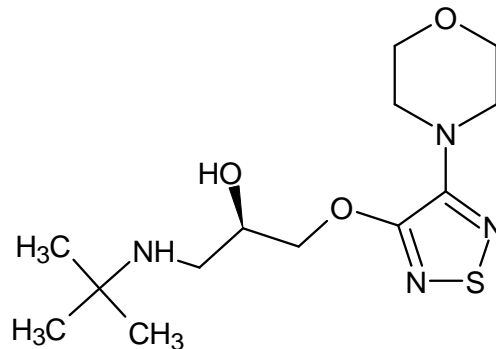


Figura 2- Estrutura química do fármaco timolol



A bimatoprost é um fármaco análogo de prostaglandina, age melhorando o fluxo uveoescleral, reduzindo a pressão intraocular, já os betabloqueadores como o timolol reduzem a pressão intraocular através da redução do humor aquoso. Em ambas as classes terapêuticas, a forma farmacêutica mais utilizada é o colírio, isso dificulta a adesão ao tratamento, pois além de causar desconforto é de difícil aplicação (KATZ *et al.*, 2010; KONSTAS *et al.*, 1999; LEWIS *et al.*, 2017; SEAL *et al.*, 2019).

O timolol é um antagonista não seletivo de beta-adrenoceptor, seu principal uso é em preparações oculares para o tratamento do glaucoma desde a sua aprovação para uso em 1978. O maleto de timolol tem o registro mais longo de segurança e eficácia na redução da PIO (PATEL *et al.*, 2022; SAH, SURESH, 2017; UMEZURIKE *et al.*, 2019; YADAV *et al.*, 201).

A terapia medicamentosa é o tratamento de primeira escolha, porém a baixa adesão é um dos principais obstáculos do tratamento, que inclui também o tempo e a duração do tratamento, bem como percepções errôneas sobre a natureza irreversível da perda de visão. Além disso, regimes de dosagem complexos com um ou mais medicamentos exigem muito da rotina diária dos pacientes (KESAV *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2020).

Além das limitações de adesão, também existem barreiras significativas à administração de medicamentos utilizando via sistêmica, como a oral, com efeitos colaterais significativos. Por outro lado, a biodisponibilidade de medicamentos tópicos utilizando a via ocular pode resultar em níveis de medicação abaixo do ideal no local de aplicação. Isso ocorre devido à alta renovação do fluido lacrimal e a drenagem nasolacrimal que limitam o tempo de retenção do fármaco na superfície ocular (CESAR *et al.* 2019; KESAV *et al.*, 2021).

Devido aos desafios encontrados no tratamento do glaucoma, há muitos estudos envolvendo os sistemas modernos de liberação de fármacos. Além de melhorar adesão ao tratamento do glaucoma, os novos sistemas de entrega de drogas exibem muitos benefícios em relação às formulações convencionais, como melhorar a biodisponibilidade, evitar toxicidade sistêmica e melhorar o perfil terapêutico (CESAR *et al.*, 2019; FRANCA *et al.*, 2014; SAH, SURESH, 2017).

Nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido insertes para aplicação tópica ocular há mais de 12 anos e tem conseguido resultados satisfatórios no tratamento da doença (FRANCA *et al.*, 2014; FRANCA *et al.*, 2019; FRANCA *et al.*, 2020; CESAR *et al.*, 2019; CESAR *et al.*, 2021; RUBIÃO, *et al.* 2021). Todos os dispositivos desenvolvidos por nosso grupo, até o momento, permitem uma administração local, sustentada e prolongada de agentes terapêuticos em insertes monodroga. Este controle da liberação do fármaco e, portanto, da entrega deste ao seu alvo, prolonga sua permanência na janela terapêutica, causando um aumento significativo na eficácia da terapia e a redução dos efeitos colaterais de certos medicamentos. Outro benefício é permitir a redução da dosagem do fármaco, que tem grande importância econômica e resulta em um grande aumento na adesão ao medicamento. (CEGIELSKA, SAJKIEWICZ, 2019; SINGH *et al.*, 2020, FRANCA *et al.*, 2014).

Além dos sistemas modernos de liberação de fármacos, adicionalmente para melhorar a eficácia do tratamento uma outra alternativa é a utilização de mais de um ativo em uma mesma forma farmacêutica. No tratamento do glaucoma a associação do timolol ao bimatoprost em um colírio utilizado 1 vez ao dia apresentou redução significativa da PIO em comparação a utilização de um colírio de timolol 2 vezes ao dia (DESAI *et al.*, 2020).

A associação de fármacos aumenta a eficácia por meio de efeitos sinérgicos e aditivos, e por isso atingem o objetivo mais rapidamente. Além disso proporcionam maior comodidade para o paciente, devido diminuição do número de medicamentos administrados, promovendo maior adesão ao tratamento (RAMOS, DA SILVA, 2010).

Assim, a união entre sistemas de liberação eficientes e a possibilidade de empregar mais de um fármaco na forma farmacêutica tem sido uma busca por nosso grupo de pesquisa com vistas a implementação de melhoria no tratamento do glaucoma. Portanto, este trabalho teve por objetivo desenvolver e caracterizar insertes multidroga

para potencial aplicação tópica no tratamento do glaucoma e, em adição desenvolver método analítico para dois fármacos em um mesmo dispositivo.

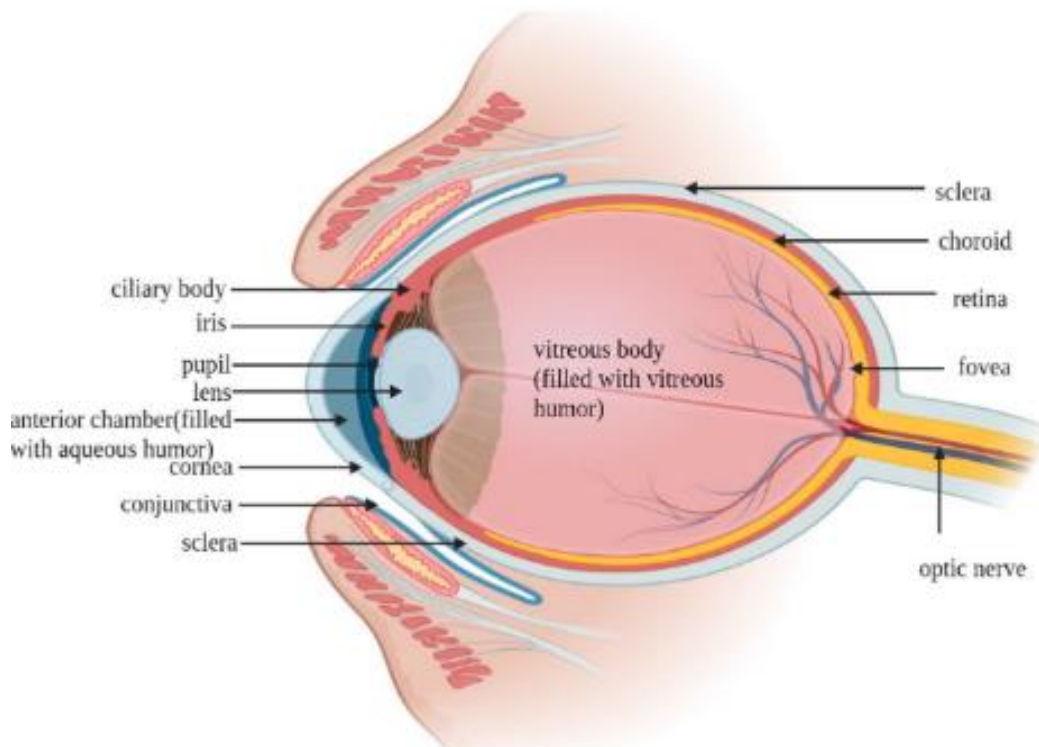
Este trabalho está dividido em três partes sendo uma revisão da literatura, seguida do desenvolvimento do método analítico e, por fim, a caracterização dos insertes obtidos com dois fármacos do arsenal terapêutico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomia e fisiologia do olho

O olho humano é um dos órgãos mais complexos e sensíveis do corpo (YADAV *et al.*, 2019). O sistema ocular (Figura 3) é um órgão sensorial que possui um tamanho de 24 mm e um peso de 7,5 g, sendo considerado 0,05% do corpo humano. Em sua classificação o sistema ocular é dividido em duas regiões: a região anterior, que inclui a córnea, humor aquoso, conjuntiva, íris, corpo ciliar e cristalino; e a região posterior, que inclui o humor vítreo, a retina, a coróide e o nervo óptico (CHOLKAR *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2021). Embora ambas sejam preenchidas por líquido, a câmara anterior é preenchida com humor aquoso, enquanto a câmara posterior, devido à sua proximidade com os nervos ópticos, é preenchida com humor vítreo (YADAV *et al.*, 2019).

Figura 3- Anatomia do olho humano



Fonte: (GUPTA *et al.*, 2021).

Um dos componentes da região anterior é o corpo ciliar que é o responsável pela produção do humor aquoso, um fluido ocular claro e ligeiramente alcalino que fornece nutrientes à retina (GUPTA *et al.*, 2021). O humor aquoso flui da câmara posterior para a câmara anterior através da malha trabecular, um tecido esponjoso localizado ao

redor a base da córnea e depois drena para o canal de *Schlemm* (GUPTA *et al.*, 2021; YADAV *et al.*, 2019). O líquido é drenado para o sistema venoso que constitui as veias intraescleral, episcleral e por último conjuntival. Todo o processo, portanto, constitui o sistema de drenagem do olho e se este sistema de drenagem estiver total ou parcialmente bloqueado, há um aumento da pressão dentro do olho (YADAV *et al.*, 2019).

2.2 Glaucoma

Glaucoma é um distúrbio ocular crônico (PATEL *et al.*, 2022). A doença caracteriza-se como uma neuropatia óptica com correspondente perda progressiva e irreversível do campo visual (KESAV *et al.*, 2021), devido à perda de células ganglionares da retina, afinamento da camada de fibras nervosas da retina e escavação do disco óptico. A escavação do disco óptico é aumentada proporcionalmente à ação do glaucoma nas células ganglionares da retina e nos seus axônios. O glaucoma é uma doença assintomática até sua fase final onde se inicia a perda de visão (MANTRAVADI, VADHAR, 2015; CEGIELSKA, SAJKIEWICZ, 2019; PATEL *et al.*, 2022).

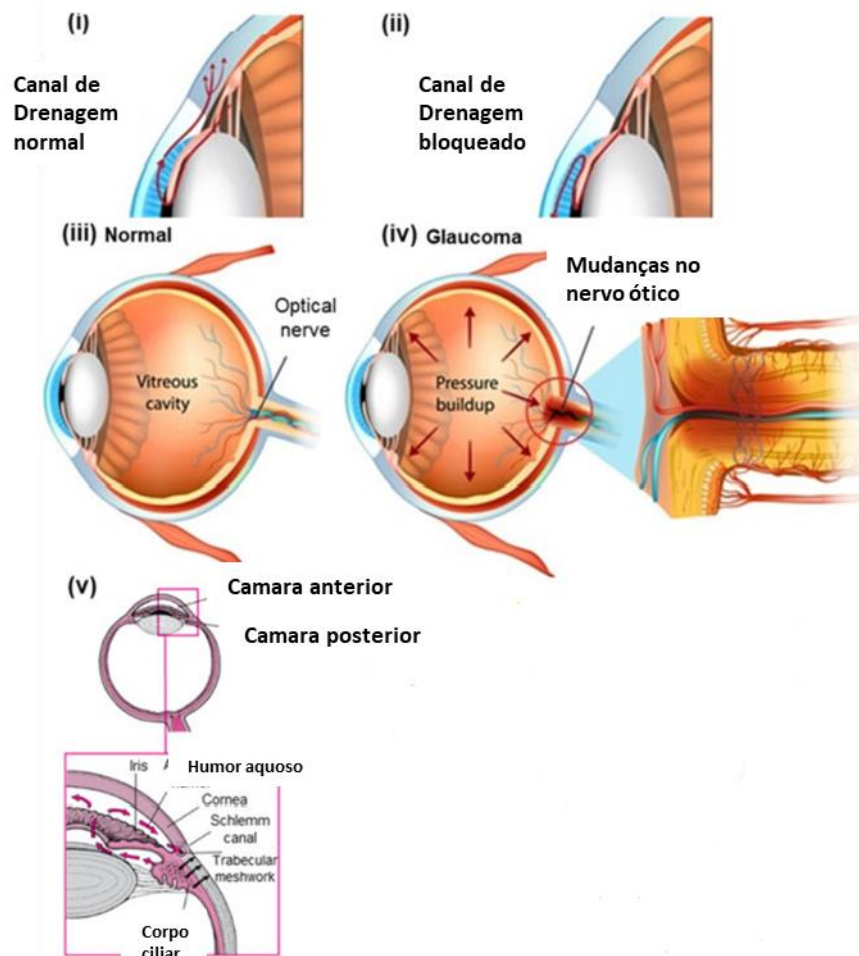
Glaucoma é um grupo de doenças/distúrbios oculares lentamente progressivos resultantes do aumento da pressão intraocular (PIO) (YADAV *et al.*, 2019). Os valores normais situam-se entre 10-21 mmHg (CONITEC, 2018). Este aumento da PIO não pode ser tolerado por olhos normais e eventualmente causa lesão progressiva do nervo óptico. O dano ininterrupto de longo prazo ao nervo óptico leva à falha de comunicação entre a retina e o cérebro e, eventualmente, a uma perda irreversível da visão (YADAV *et al.*, 2019).

A neuropatia óptica glaucomatosa é resultado da degeneração do nervo óptico associada à perda progressiva de células ganglionares da retina, distúrbios do suprimento sanguíneo do disco óptico e ativação e alteração correspondente nas células gliais. Os objetivos atuais do tratamento do glaucoma são prevenir o dano do nervo óptico, manter o campo visual do paciente e a qualidade de vida restringindo os efeitos adversos da terapia. Entre os múltiplos fatores de risco do glaucoma, a PIO é o fator mais crítico e o único potencialmente modificável. A progressão do glaucoma é impedida pela redução da PIO, portanto precisa ser considerada como o primeiro

elemento a ser alterado no início do tratamento e é a principal abordagem comprovada de controle do glaucoma (PATEL *et al.*, 2022; UMEZURIKE *et al.*, 2019; WEINREB *et al.*, 2016).

A Figura 4 apresenta, de forma esquemática, a comparação entre um olho sadio e outro com a doença do glaucoma.

Figura 4- Ilustração esquemática comparativa entre olho normal e olho com glaucoma



Fonte: Adaptado (PATEL *et al.*, 2022)

Os canais de drenagem normais e bloqueados são apresentados na Fig. 4 (i-ii). Olhos com glaucoma apresentam acúmulo de pressão, que eventualmente causa alteração no nervo óptico, conforme apresentado na Fig. 4 (iv). O fluxo de fluido através das câmaras anterior e posterior e componentes correspondentes na Fig. 4 (v), uma imagem vetorial de glaucoma de ângulo aberto mostra que o fluido é gerado no corpo ciliar atrás da íris (isto é, câmara posterior) e flui através da porção frontal do olho (isto é, câmara anterior) e finalmente sai pelo canal de drenagem ou raiz uveoscleral como mostrado na seta preta.

2.2.1 Tipos de glaucoma

As duas categorias principais são o glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) e o glaucoma primário de ângulo fechado (GPAF). Glaucoma de ângulo aberto é a forma mais comum de glaucoma, que se desenvolve principalmente lentamente (CEGIELSKA, SAJKIEWICZ, 2019; UMEZURIKE *et al.*, 2019).

O glaucoma de ângulo fechado ocorre inesperadamente. Os sinais e sintomas comuns do glaucoma de ângulo fechado são dor e leve perda de visão. Danos permanentes podem ser evitados se o paciente procurar imediatamente ajuda médica ao primeiro sinal de desconforto (YADAV *et al.*, 2019).

O principal tipo da doença é o glaucoma primário de ângulo aberto, neste glaucoma o ângulo entre a íris e a córnea é amplo e não constitui um obstáculo para o fluxo aquoso (CEGIELSKA, SAJKIEWICZ, 2019; WEINREB *et al.*, 2016). É diagnosticado por PIO superior a 21 mmHg, associado 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. Segundo diversos estudos populacionais, a prevalência aumenta à medida que a PIO se eleva. Ademais, pesquisas demonstraram que a redução pressórica retarda a progressão do dano glaucomatoso (CONITEC, 2018).

2.2.2 Epidemiologia

Mais de 2 bilhões de pessoas em todo o mundo vivem com deficiência visual ou cegueira, e pelo menos 1,1 bilhão de pessoas vivem com perda de visão porque não recebem os cuidados de que precisam para condições como miopia e hipermetropia, glaucoma e catarata (WHO, 2022).

Espera-se que esses números aumentem substancialmente devido ao crescimento populacional, envelhecimento e mudanças no estilo de vida, como redução do tempo gasto ao ar livre e maior tempo gasto em atividades intensivas de visão de perto. Combinado com o acesso limitado a cuidados oftalmológicos, particularmente em países de baixa e média renda, espera-se que metade da população global viva com deficiência visual até 2050 (KESAV, *et al.*, 2021, WHO, 2022).

O glaucoma é a segunda causa de cegueira mais comum no mundo (KESAV *et al.*, 2021; PATEL *et al.*, 2022). O relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) intitulado “relatório mundial sobre a visão” publicado em 2020 afirma que pelo menos 76 milhões de pessoas sofrem de glaucoma e prevê um aumento significativo de 1,3 vezes até 2030. No Brasil a doença atinge mais de 900 mil pessoas (DINIZ *et al.*, 2021).

Glaucoma afeta principalmente pessoas de meia-idade e idosos e é a segunda principal causa de perda de visão depois da catarata (YADAV *et al.*, 2019). Os estudos mostraram que o glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) leva à cegueira bilateral em 9% dos pacientes e à cegueira unilateral em 27% dos pacientes, dentro de 20 anos das primeiras alterações glaucomatosas (SINGH *et al.*, 2020).

2.2.3 Fatores de risco

Vários fatores de risco, além da PIO aumentada, já foram identificados: idade acima de 40 anos, escavação do nervo óptico aumentada, etnia (negra para o de ângulo aberto e amarela para o de ângulo fechado), história familiar, ametropia (miopia para o de ângulo aberto e hipermetropia para o de ângulo fechado), pressão de perfusão ocular diminuída, *diabetes mellitus* tipo 2 e fatores genéticos (CONITEC, 2018; YADAV *et al.*, 2019).

2.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico do glaucoma em seus estágios iniciais é desafiador. O diagnóstico incorreto pode levar à falha na identificação de indivíduos com a condição durante seus estágios iniciais, até que ocorra uma perda funcional significativa. Assim, a detecção precoce do glaucoma permite um rápido tratamento para retardar a perda da visão (KIM, CHO, OH, 2017).

A avaliação oftalmológica do paciente deve ser binocular e abordar os seguintes itens para o diagnóstico do glaucoma e para a determinação da sua gravidade: anamnese; medida da acuidade visual (AV) 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; a aferição da pressão intraocular (PIO) através da tonometria, deve ser feita com tonômetro adequadamente calibrado, em diferentes dias e horários, para reconhecimento da flutuação diária; e 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 (CONITEC, 2018; ESPORCATTE, DA SILVA, 2022).

Se houver suspeita de glaucoma, exames devem ser realizados como forma de complementar a investigação diagnóstica e nos casos de glaucoma estabelecido, visam auxiliar na definição etiológica e de gravidade (CONITEC, 2018; ESPORCATTE, DA SILVA, 2022; UMEZURIKE *et al.*, 2019).

A gonioscopia 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 de 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 (CONITEC, 2018; ESPORCATTE, DA SILVA, 2022).

A paquimetria ultrassônica avalia a espessura corneana central e influencia a estimativa da PIO, portanto o exame ser realizado em todos os pacientes suspeitos ou glaucomatosos (CONITEC, 2018; DINIZ FILHO, SCHIMITI, 2022; ESPORCATTE, DA SILVA, 2022).

Outra avaliação é através da documentação fotográfica do disco óptico que trata-se de uma avaliação estrutural fundamental. Por meio dela, é possível detectar sinais sugestivos de progressão da neuropatia, como a presença de hemorragia de disco (CONITEC, 2018; ESPORCATTE, DA SILVA, 2022).

Até o presente momento, o padrão-ouro para acompanhamento do dano visual provocado pelo glaucoma é a perimetria visual computadorizada padrão branco no branco. A perimetria é um exame complementar fundamental na investigação de indivíduos suspeitos e no seguimento de pacientes com diagnóstico confirmado de glaucoma (DINIZ FILHO, SCHIMITI, 2022; ESPORCATTE, DA SILVA, 2022).

A tomografia de coerência óptica (TCO) é uma ferramenta que fornece informações qualitativas e quantitativas sobre o disco óptico e a espessura da camada de fibras nervosas peripapilar, sendo seu uso justificado principalmente nos casos de glaucomas iniciais a moderados. TCO é recomendável na análise estrutural do glaucoma e há evidências científicas suficientes para seu uso no diagnóstico e seguimento da doença. Para analisar a progressão do glaucoma por meio da TCO, há que se utilizar o mesmo equipamento, verificar se os critérios mínimos de qualidade de imagem foram atendidos, a ausência de artefatos e correlacionar os dados do exame com os achados clínicos (CONITEC, 2018; ESPORCATTE, DA SILVA, 2022).

A orientação para seguimento clínico de pacientes com glaucoma é baseada no estadiamento da doença, de acordo com critérios funcionais e/ou estruturais. O estadiamento estrutural pode ser feito por meio de alterações no disco óptico observadas à fundoscopia, de acordo com diferentes métodos de escala e também, mais recentemente, pelos achados na TCO (BRUSINI, 2018; DINIZ FILHO, SCHIMITI, 2022; ESPORCATTE, DA SILVA, 2022).

2.2.5 Tratamento

Estudos fornecem evidências de que a redução da PIO previne a progressão nos estágios iniciais e tardio da doença e o grau de proteção é proporcional à diminuição do seu valor. Embora não haja cura, no entanto, é evitável e danos adicionais podem ser minimizados com tratamento adequado (CEGIELSKA, SAJKIEWICZ, 2019; KESAV *et al.*, 2021).

Portanto, é a PIO que precisa ser considerada como o primeiro elemento a ser alterado no início do tratamento, e é a principal abordagem comprovada de controle do glaucoma (CONITEC, 2018; ESPORCATTE, DA SILVA, 2022; PATEL *et al.*, 2022).

O tratamento do glaucoma é realizado através de terapias medicamentosas (Agonista colinérgico, betabloqueador, agonista da prostaglandina, agonista alfa adrenérgico, inibidor da anidrase carbônica e colinérgicos ou mióticos) (CEGIELSKA, SAJKIEWICZ, 2019; PATEL *et al.*, 2022; YADAV *et al.*, 2019), terapias a laser (Trabeculoplastia, iridotomia, iridoplastia, ciclotocoagulação) (PATEL *et al.*, 2022; YADAV *et al.*, 2019) e terapias cirúrgicas (Trabeculectomia, implantes de drenagem

de glaucoma, esclerectomia profunda, viscocanalostomia, goniotomia, trabeculotomia) (PATEL *et al.*, 2022).

2.2.5.1 Análogos da prostaglandina

Na maioria dos países, os análogos da prostaglandina são o tratamento de primeira linha do glaucoma (YADAV *et al.*, 2019). Os análogos da prostaglandina aumentam a drenagem do humor aquoso, diminuindo assim a pressão intraocular no olho. Promovem o relaxamento dos músculos do interior do olho, aumentando assim o escoamento do fluido (PATEL *et al.*, 2022; YADAV *et al.*, 2019). As prostaglandinas são pró- fármacos hidrofóbicos que imitam a prostaglandina em nosso corpo para aumentar a drenagem do fluido através do canal de *Schlemm* (YADAV *et al.*, 2019; WADHWA *et al.*, 2022). A família das prostaglandinas tem efeitos colaterais mínimos, pois são administradas em uma concentração muito baixa. Isso torna essas drogas muito atraentes para pacientes e médicos. No entanto, as prostaglandinas têm efeitos colaterais oculares locais, como irritação, vermelhidão dos olhos e descoloração da íris e da pele ao redor (YADAV *et al.*, 2019).

2.2.5.2 Beta bloqueadores

Os betabloqueadores são agonistas dos receptores beta adrenérgicos que reduzem a PIO ao diminuir a produção de humor aquoso no olho (PATEL *et al.*, 2022; YADAV *et al.*, 2019; WADHWA *et al.*, 2022). Eles são classificados em duas categorias, ou seja, betabloqueadores não seletivos (timolol, levobunol, etc.) e betabloqueadores seletivos (betaxolol). Após a aprovação do primeiro betabloqueador para o tratamento da redução da pressão intraocular pelo FDA, o timolol tornou-se a primeira escolha no tratamento do glaucoma. Eles reduzem a pressão bloqueando o beta-adrenoceptor no corpo ciliar. Assim, leva a uma menor produção de humor aquoso e redução da PIO (PATEL *et al.*, 2022; UMEZURIKE *et al.*, 2019; YADAV *et al.*, 2019).

Os betabloqueadores têm a capacidade de diminuir a frequência cardíaca e podem causar efeitos colaterais adversos ao paciente com histórico médico de doença cardíaca (YADAV *et al.*, 2019; WADHWA *et al.*, 2022).

2.2.5.3 Inibidores da anidrase carbônica

Os inibidores da anidrase carbônica diminuem a secreção do humor aquoso por meio da redução da atividade enzimática no corpo ciliar. Inibem a catálise da isoenzima II da anidrase carbônica, que é diretamente responsável pela conversão de CO_2 e H_2O em HCO_3 . Esta inibição de CO_2 e H_2O a HCO_3 leva à diminuição da produção de humor aquoso no olho. A dorzolamida foi o primeiro inibidor da anidrase carbônica lançado como colírio tópico para redução da PIO (PATEL *et al.*, 2022; YADAV *et al.*, 2019; WADHWA *et al.*, 2022).

2.2.5.4 Agonistas alfa-adrenérgicos

Os agonistas alfa-adrenérgicos reduzem a pressão ocular através da estimulação alfa-adrenérgica. A estimulação causa constrição nos vasos sanguíneos e assim diminui a produção do humor aquoso (YADAV *et al.*, 2019; WADHWA *et al.*, 2022).

No tratamento do glaucoma são usados alfa-agonistas adrenérgicos seletivos como a praclonidina e brominidina, um derivado da clonidina. A clonidina é um fármaco anti-hipertensor sistêmico, diminui a PIO ao diminuir a produção de humor aquoso. Porém, reduz visivelmente a pressão arterial sistêmica. A apraclonidina funciona de maneira semelhante à da clonidina, exceto pelo fato de não atravessar a barreira hematoencefálica e, portanto, não ocorrer hipotensão sistêmica (YADAV *et al.*, 2019).

2.2.5.5 Colinérgicos ou mióticos

Mióticos, agonistas colinérgicos ou outros parassimpaticomiméticos são a opção preferida como tratamento de terceira linha. Os mióticos frequentemente administrados são a pilocarpina e o carbachol (YADAV *et al.*, 2019; WADHWA *et al.*, 2022).

Essas drogas aumentam a taxa de drenagem do humor aquoso do olho pela constrição das fibras da malha trabecular (YADAV *et al.*, 2019; WADHWA *et al.*, 2022).

Os mióticos são baratos quando comparados a outras medicações oculares tópicas, porém eles possuem algumas desvantagens como necessidade de administração frequente, visão turva e espasmo. A administração frequente de pelo menos quatro vezes ao dia causa incomplacência do paciente e casos de miopia induzida (YADAV *et al.*, 2019).

2.3 Insertes oculares

As inserções oculares são dispositivos sólidos ou semi-sólidos destinados a serem colocados no saco conjuntival entre a pálpebra inferior e o próprio olho para administrar drogas na superfície ocular. O objetivo destes dispositivos é a liberação constante do fármaco por um período prolongado, minimizando a absorção sistêmica pela mucosa nasal e melhorando a adesão do paciente devido à frequência reduzida de administração (FRANCA *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2020; WADHWA *et al.*, 2022).

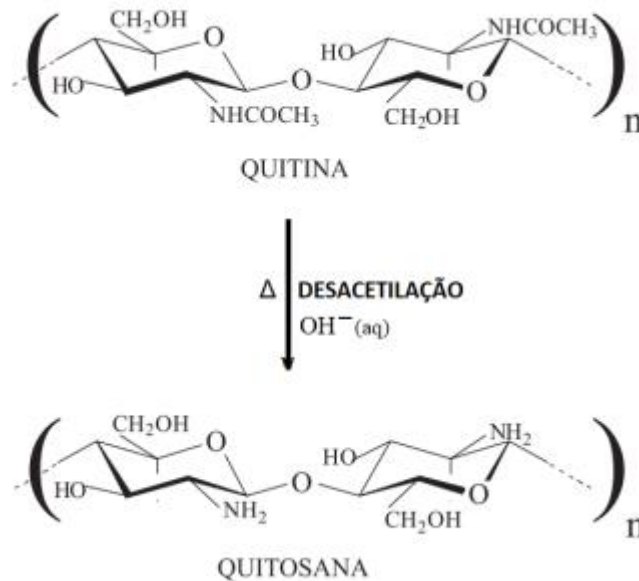
Com base em suas propriedades físicas e químicas, os insertes são classificados em insolúveis, solúveis ou biodegradáveis (SINGH *et al.*, 2020). As inserções, geralmente, são feitas de polímeros biodegradáveis, como a quitosana (FRANCA *et al.*, 2014).

2.3.1 Quitosana

A quitosana é um polímero muito utilizado em aplicações oftalmológicas devido às suas características biológicas favoráveis como bioadesão, permeabilidade, por ser biodegradável, não tóxico e biocompatível, que pode aumentar a biodisponibilidade intraocular de drogas hidrofílicas e lipofílicas (FRANCA *et al.*, 2014; LARANJEIRA, FÁVERE, 2009).

Trata-se de um derivado da quitina, um polímero natural amplamente disponível na natureza, geralmente obtido de animais marinhos, como caranguejos, camarões, crustáceos, fungos e exoesqueleto de insetos. O principal processo de extração da quitosana de seu polímero parental quitina é a desacetilação (Figura 5). A quitina é a forma parental da quitosana, que é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, e na água, enquanto a quitosana é solúvel em ácido aquoso de pH 6,0 ou inferior, principalmente devido à quaternização de grupos amina (pKa 6,3) (COLLADO-GONZÁLEZ, *et al.*, 2019; PATEL *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2018).

Figura 5- Desacetilação da quitina na formação da quitosana



Fonte: (SILVA *et al.* 2018).

A quitosana é um polímero biodegradável, bioativo e mucoadesivo, que tem sido muito utilizado na aplicação biomédica (FRANCA *et al.*, 2014; PATEL *et al.*, 2022). A quitosana exibe carga superficial positiva (ou seja, cátion) devido à protonação de grande quantidade de grupos amino e forma vários sais. Por outro lado, a esclera presente no olho apresenta resíduos de ácido siálico, carregados negativamente. Assim, pode-se supor que a bioadesão pode ocorrer entre os grupos amino protonados do quitosana e os resíduos de ácido siálico por intermédio de interações eletrostáticas e, portanto, pode conduzir à biodisponibilidade de longo prazo (PATEL *et al.*, 2022).

2.4 Dispositivos de liberação sustentada atualmente aprovados

O Ocusert (Alza Corporation, EUA), um sistema terapêutico ocular de pilocarpina foi o mais antigo sistema de entrega de medicamentos de liberação controlada aprovado pelo FDA nos Estados Unidos no início da década de 1970. Era um reservatório de pilocarpina dentro de uma membrana microporosa de acetato suportada por um anel de dióxido de titânio (CHATTERS, 2019; KESAV *et al.*, 2021).

O efeito terapêutico de Ocusert foi limitado por efeitos secundários tais como desalojamento da unidade e "dose de despejo" que resultou num efeito de explosão

não desejado. Embora o sistema de pilocarpina de Ocuser tenha sido descontinuado e retirado do mercado, o desenho foi adotado para o tratamento de doenças do segmento posterior, como a uveíte não infecciosa e retinite do citomegalovírus (CHATERS, 2019; KESAV *et al.*, 2021).

Em março de 2020 o FDA dos Estados Unidos aprovou um implante ocular para redução da PIO. O anel ocular de Bimatoprost SR, comercializado como Durysta™ (Allergan, Dublin, Irlanda) é composto por um anel interno de polipropileno dentro de uma matriz de silicone sem conservantes que é impregnada com 13 mg de bimatoprost. O inserte disponível possui 24-29 mm de diâmetro, e foi desenvolvido para ser usado por 180 dias. O desenho tem a vantagem de uma grande área de superfície que pode permitir a entrega de uma combinação de drogas. O implante pode ser inserido na clínica ou na sala de cirurgia e não precisa ser removido, pois a matriz de polímero PLGA é biodegradável (BELAMKAR *et al.*, 2022; KESAV *et al.*, 2021).

Atualmente, o FDA só aprovou o implante para administração única em pacientes. O implante também apresentou um perfil de segurança muito favorável e uma experiência de tratamento positiva para os pacientes. Os eventos adversos foram mais comuns em olhos com implantes e incluíram hiperemia conjuntival, sensação de corpo estranho e dor ocular, mas foram resolvidos após vários dias e associados ao procedimento de implantação em vez do implante (BELAMKAR *et al.*, 2022).

Há outras terapias SR sob investigação incluem: anel ocular bimatoprost (Allergan) (identificador ClinicalTrials.gov: NCT01915940), iDose® (Glaukos Corporation) (NCT03519386), ENV515 (Envisia Therapeutics) (NCT02371746), OTX-TP (Ocular Therapeutix) (NCT02914509), OTX-TIC (Ocular Therapeutix) (NCT04060144) e latanoprost free acid SR (PolyActiva) (NCT04060758) (BELAMKAR *et al.*, 2022; KESAV *et al.*, 2021).

2.5 Terapias de liberação sustentada sob investigação clínica

Além do anel de Bimatoprost SR que é o único sistema de administração de medicamentos SR aprovado, existem muitos outros atualmente sob investigação. Uma dessas terapias é o Bimatoprost Ocular Ring, também produzido pela Allergan. Ao contrário do Bimatoprost SR, este dispositivo consiste em uma

estrutura interna de suporte de polipropileno com uma matriz externa de silicone contendo 13 mg de bimatoprost. Esta inserção extraocular tem uma duração prevista de seis meses e atualmente completou a Fase II de testes (BELAMKAR *et al.*, 2022; CHATERS, 2019; KESAV *et al.*, 2021).

O implante intraocular iDose[®] produzido pela Glaukos Corporation (San Clemente, Califórnia) é atualmente o mais avançado em desenvolvimento, com testes de Fase III em andamento e com conclusão e aprovação do FDA em 2023. Este implante de titânio é colocado intraocularmente na malha trabecular com uma âncora escleral. O implante libera uma formulação patenteada de travoprost e tem uma duração alvo de seis a doze meses. O implante iDose requer inserção cirúrgica e remoção na sala de cirurgia. Consiste em três partes principais que incluem uma âncora escleral que é inserida na parede interna da esclera através da malha trabecular, o corpo de titânio que serve como reservatório para a droga e uma membrana que elui a droga intracameramente (BELAMKAR *et al.*, CAPITENA YOUNG, KAHOOK, SEIBOLD, 2019; CHATERS, 2019; 2022; KESAV *et al.*, 2021).

Outro implante intraocular conhecido como ENV515 desenvolvido pela Envisia Therapeutics (Research Triangle Park, Carolina do Norte) concluiu os testes da Fase II. Este dispositivo em forma de bastonete é colocado intraocularmente no ângulo iridocorneano da câmara anterior. Este implante consiste em um sistema de liberação de droga biodegradável que libera travoprost e tem duração prevista de seis a doze meses. O ENV515 destina-se a ser inserido na clínica, mas não precisa ser removido (BELAMKAR *et al.*, 2022; KESAV *et al.*, 2021).

Ocular Therapeutix (OTX) (Bedford, Massachusetts) projetou um *plug* intracanalicular punctal, OTX-TP, para a entrega de travoprost para a superfície ocular. Tradicionalmente, os tampões na forma de *plugs*, também conhecidos como tampões lacrimais, são comumente usados para tratar o olho seco. Ao impedir a drenagem de lágrimas através do ducto nasolacrimal, estes tampões ajudam a manter o volume de lágrimas na superfície do olho. Os plugues têm a vantagem de serem facilmente inseridos e removidos em um ambiente clínico, além de serem amplamente bem tolerados pelos pacientes. Os estudos primários de viabilidade descobriram que a OTX-TP foi bem tolerada com uma taxa de retenção de 100% em 10 dias e um efeito sustentado de redução da PIO durante um período de um mês (BELAMKAR *et al.*,

CAPITENA YOUNG, KAHOOK, SEIBOLD, 2019; CHATERS, 2019; 2022; KESAV *et al.*, 2021).

A Mati Therapeutics (Austin, Texas) também está desenvolvendo um sistema de administração de tampão em forma de *plug* conhecido como Evolute para POAG, bem como para alívio de alergias e administração de medicamentos anti-inflamatórios não esteróides. Quando carregado com latanoprostá para pacientes com GPAA, dois estudos de Fase II recentemente concluídos demonstraram taxas de retenção de mais de 90% em 12 semanas e redução de pressão de 7 mmHg em comparação com 5 mmHg em controles de latanoprostá tópico (BELAMKAR *et al.*, 2022; KESAV *et al.*, 2021).

2.6 Dispositivos de liberação multidroga

Têm sido descritos na literatura sistemas de liberação multidrogas para o potencial tratamento do glaucoma. Uma justificativa para este fato é a possibilidade de melhorar a eficácia do tratamento utilizando dois mecanismos distintos para a abordagem medicamentosa ao glaucoma. Neste caso, fármacos que já são descritos na literatura para o tratamento da doença são utilizados em conjunto em um mesmo dispositivo.

Desai e colaboradores (2020) descreveram o desenvolvimento de lentes oculares para liberação de maleato de timolol e de bimatoprostá. O dispositivo foi capaz de liberar os princípios ativos com redução da pressão intraocular por no máximo 120 horas quando testados em animais. Nos testes *in vitro* demonstraram um grande efeito *burst* nos primeiros 30 minutos de liberação. Este dispositivo apresentou um curto período de liberação (apesar de ser maior do que um colírio) necessitando, portanto da troca da lente periodicamente em intervalos relativamente curtos. Além disso, envolve, para sua produção, grande complexidade industrial e alto custo.

Por outro lado, Maccon & Chauhan (2021) desenvolveram oleogéis para liberação dos fármacos maleato de timolol e metformina para veiculação ocular. Neste estudo foi desenvolvido um oleogel que possibilitou a liberação dos fármacos por mais de 30 dias. Não houve um efeito *burst* como o encontrado por Desai e colaboradores, porém sua administração requer a injeção do oleogel no local de aplicação o que pode ocasionar desconforto para o paciente.

Do ponto de vista clínico, apesar de se ter encontrado dispositivos capazes de liberar mais de um fármaco, o que é feito normalmente no consultório médico é a utilização de mais de um colírio, por parte do prescritos, no tratamento do glaucoma. Nakano e colaboradores (2016) descreveram os benefícios deste tratamento com fármacos antiglaucomatosos, com mecanismos de ação diferentes, visando o desenvolvimento de sinergismo no tratamento da doença. Neste caso, foram utilizados colírios em concomitância e, portanto, apresentam todas as limitações inerentes à forma farmacêutica e ao tipo de abordagem clínica (como posologia) envolvidos no tratamento.

2.7 Justificativa

Como se percebe, há necessidade premente de se desenvolver dispositivos efetivos para o tratamento do glaucoma onde as deficiências da forma farmacêutica colírio são diminuídas ou eliminadas completamente. Há, também, uma tendência à utilização de mais de um fármaco para melhorar a efetividade do tratamento do glaucoma.

Neste sentido, este trabalho aborda o desenvolvimento e caracterização de dispositivo com mais de um fármaco para o potencial tratamento do glaucoma, bem como o desenvolvimento de um método analítico para o doseamento do bimatoprost e do maleato de timolol, duas substâncias empregadas no tratamento do glaucoma.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolvimento e caracterização de um sistema polimérico contendo os fármacos bimatoprostá e maleato de timolol para uso potencial no tratamento de glaucoma, além do desenvolvimento de método analítico para possibilitar a dosagem destes fármacos no dispositivo desenvolvido.

3.1.1 Objetivos específicos

- Desenvolver inserte polimérico sem fármacos e com os fármacos bimatoprostá e maleato de timolol para o tratamento de glaucoma.
- Desenvolver e validar método analítico para quantificação dos fármacos bimatoprostá e maleato de timolol nos insertes oculares.
- Caracterizar os insertes poliméricos com e sem os fármacos bimatoprostá e maleato de timolol, de forma físico-química através de determinação de peso, análise térmica, espectrometria no infravermelho, potencial de hidratação, microscopia eletrônica de varredura, pH de superfície, teor dos fármacos, uniformidade de conteúdo dos fármacos e liberação *in vitro*.

4 MATERIAIS

4.1 Validação do método analítico

Foram utilizados como materiais na parte do desenvolvimento analítico: as duas substâncias de referência (bimatoprost e maleato de timolol) ambas compradas da Sigma-Aldrich®Iceland. Os demais materiais são descritos abaixo.

- Ácido fosfórico foi fornecido pela Merck (Damstadt, Alemanha),
- Ácido acético foi fornecido pela Química Moderna (Barueri, São Paulo)
- Acetonitrila, grau HPLC fornecidos pela JT Backer (Pensilvânia, EUA)
- Fosfato de potássio dibásico fornecido pela Anidrol (Diadema, São Paulo)
- Água ultrapurificada, tratada por osmose reversa em aparelho água milliQ (Marca Millipore, modelo Direct-Q, Morshem, França).
- Coluna cromatográfica: Luna C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex, California, EUA)
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC): Alliance 2695 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA), equipado com desgaseificador, bomba quaternária, forno de colunas, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) na região do ultravioleta e visível. Software Empower.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC): LaChrom Elite (Merck Hitachi, Tokyo, Japão), equipado com desgaseificador, bomba quaternária, forno de colunas, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) na região do ultravioleta e visível. Software EzChrom.
- Para a avaliação estatística, empregou-se o software Microsoft Excel 2007.

4.2 Produção e caracterização dos insertes

Foram utilizados, como materiais, na parte do desenvolvimento, produção e caracterização dos insertes, o polímero quitosana (quitosana de médio peso molecular - Sigma-Aldrich®Iceland), colírio contendo 0,5% p/v de maleato de timolol (Teuto®, Anápolis, Brasil), colírio genérico contendo bimatoprost 0,3 mg/mL (Medley®, Campinas, Brasil). Água destilada e água ultrapurificada Milli-Q® (Millipore, MA, EUA). Os demais reagentes e solventes utilizados apresentavam pureza analítica e fazem parte da grade de materiais do laboratório e não foram

purificados previamente. As vidrarias utilizadas fazem parte do almoxarifado do laboratório.

PARTE 2- DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MALEATO DE TIMOLOL E BIMATOPROSTA EM INSERTE OCULAR

5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A validação analítica é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos (BRASIL, 2017).

A validação de métodos analíticos é o processo pelo qual se estabelece, por meio de estudos laboratoriais, que as características de performance do método, também denominadas parâmetros de validação, apresentam os requisitos necessários para aplicação analítica pretendida (USA, 2022).

No Brasil a validação de métodos analíticos é regulada pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166 de 24 de julho de 2017. Esta Resolução se aplica a métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as suas fases de produção.

Para a quantificação do teor e avaliação da uniformidade de conteúdo da bimatoprostina e do maleato de timolol foi necessário o desenvolvimento e validação do método analítico, pois não há monografia disponível em compêndio oficial para a quantificação da associação destes fármacos em nenhuma forma farmacêutica.

O método desenvolvido foi baseado na monografia da solução oftálmica de maleato de timolol da United States Pharmacopoeia (USP) 43ª edição (2021), com as devidas alterações para a quantificação em paralelo da bimatoprostina. A bimatoprostina não possui nenhuma monografia em compêndio oficial reconhecido pela ANVISA (BRASIL, 2009).

Por se tratar de um método analítico com a finalidade de quantificação do teor e da uniformidade de conteúdo, foram considerados os seguintes parâmetros na validação analítica: seletividade, precisão (intermediária e repetibilidade), exatidão, linearidade, intervalo e robustez (BRASIL, 2017).

5.1 Desenvolvimento do método analítico

A técnica de escolha para quantificação dos ativos maleato de timolol e da bimatoprost foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por se tratar de técnica capaz de separar duas ou mais substâncias provenientes de uma mesma matriz.

Para quantificação do ativo maleato de timolol há monografia disponível na Farmacopeia Americana (USP), descrita como *Timolol Maleate Ophthalmic Solution*. Por outro lado, para a bimatoprost não há nenhum método farmacopeico disponível, por isso foi realizada uma busca por artigos que descrevessem um método analítico para quantificação deste ativo. Um dos estudos encontrados foi o de Kumar e seus colaboradores (2011), para a quantificação da bimatoprost em formas farmacêuticas.

Algumas condições do método analítico descrito por Kumar (2011) são semelhantes às condições descritas na monografia da USP para quantificação do maleato de timolol em soluções oftálmicas. Com isso, foi vislumbrada a hipótese de desenvolvimento de um único método para a quantificação dos dois ativos, a fim de reduzir tempo e custo da análise e ainda diminuir a geração de resíduos para o meio ambiente.

Para a escolha do melhor método foram realizados vários testes, descritos a seguir.

5.1.1 Teste 1

Parâmetros cromatográficos

- Comprimento de onda: 210 nm
- Coluna: C18, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm
- Temperatura da coluna: 30°C
- Fluxo: 1,0 mL/min
- Volume de injeção: 20 µL

Preparo das Soluções

Solução tampão: Pesou-se, cerca de 11,1 g de fosfato de potássio dibásico e transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL. Adicionou-se, cerca de 700 mL de água ultrapurificada e solubilizou-se. Completou-se o volume com água ultrapurificada e homogeneizou-se. O pH foi ajustado para 2,8 com ácido ortofosfórico.

Fase móvel: Misturou-se 55 partes de solução tampão e 45 partes de acetonitrila (55:45). Filtrou-se em membrana de celulose regenerada 0,45 µm e desgaseificou-se.

Diluyente: tampão fosfato e acetonitrila na proporção de 55:45 v / v.

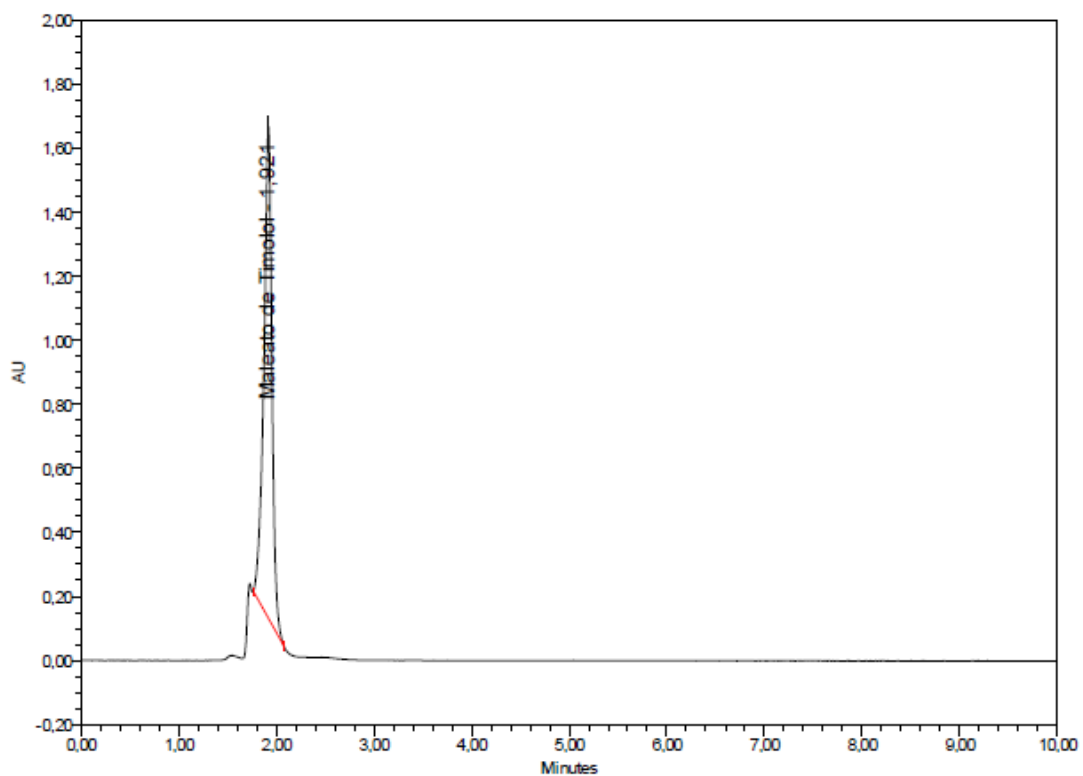
Solução padrão de bimatoprost: 0,1 mg/mL em diluyente

Solução padrão de maleato de timolol: 0,1mg/mL em diluyente

Resultados

A condição proposta foi adequada para o fármaco bimatoprost, porém a mesma não foi seletiva para o fármaco maleato de timolol. Houve coeluição de picos no tempo de retenção do maleato de timolol como mostrado na Figura 6.

Figura 6- Cromatograma obtido para o maleato de timolol no teste 1 em 210 nm



Através da varredura espectral na faixa de comprimento de onda de 190 a 400 nm, observou-se que a coeluição ocorria apenas em comprimentos de ondas mais baixos, onde há maior absorção de substâncias. Observou-se também que no comprimento de onda de 295 nm (comprimento de onda do método farmacopeico para quantificação de maleato de timolol) não houve coeluição com o pico do maleato de timolol, porém neste comprimento de onda o bimatoprost não foi detectado. Assim, optou-se pela realização de novo teste para melhorar as condições cromatográficas.

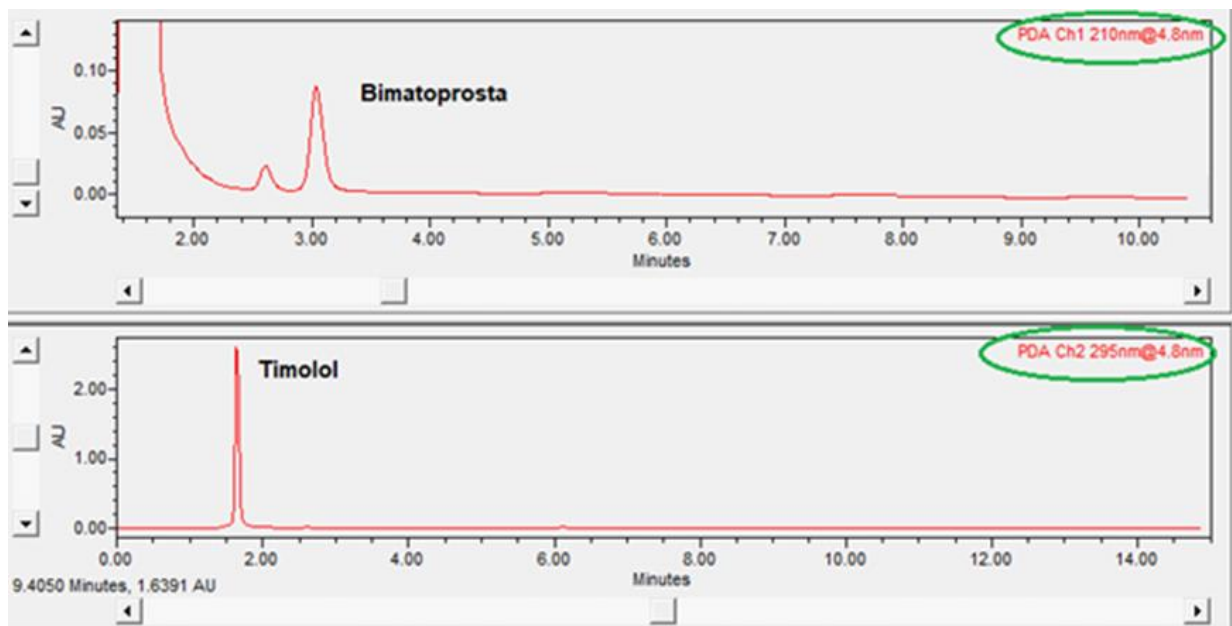
5.1.2 Teste 2

No teste 2 houve apenas alteração do comprimento de onda em relação ao teste 1. Neste teste as amostras foram lidas em 2 comprimentos de onda: 210 nm para detecção da bimatoprost e 295 nm para detecção do maleato de timolol.

Resultados

A condição proposta foi adequada para os fármacos bimatoprost e maleato de timolol (Figura 7).

Figura 7- Cromatograma referente ao teste 2 para quantificação dos ativos bimatoprost (210 nm) e maleato de timolol (295 nm).



Como mostra a Figura 7, o pico referente a bimatoprost apresentou tempo de retenção de aproximadamente 3 minutos no comprimento de onda de 210 nm e o

maleato de timolol apresentou tempo de retenção de aproximadamente 1,6 minutos no comprimento de onda de 295 nm. Esta condição demonstrou-se satisfatória, porém não foi feita com as concentrações determinadas para os ensaios dos fármacos. Neste sentido, o próximo teste foi realizado tentando adequar este parâmetro.

5.1.3 Teste 3

Conforme descrito, apesar de satisfatórios, os resultados do teste 2 deveriam ser adequados também para a concentração dos fármacos que serão utilizados no método analítico para quantificação destes no inserte ocular. Portanto, preparou-se uma solução padrão com a concentração desejada dos fármacos.

Preparo das soluções

Solução padrão estoque de bimatoprost: pesou-se, cerca de 1,0 mg de padrão de bimatoprost para um balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 5 mL de água ultrapurificada e agitou-se até completa solubilização do fármaco. Completou-se o volume com água ultrapurificada e homogeneizou. A concentração de bimatoprost obtida neste ensaio foi de 0,1 mg/mL.

Solução padrão estoque de maleato de timolol: pesou-se cerca de 1 mg de maleato de timolol e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 5 mL de diluente e agitou-se até completa solubilização do fármaco. A concentração de maleato de timolol obtida neste ensaio foi de 0,1 mg/mL.

Solução padrão: transferiu 0,075 mL da solução padrão estoque de bimatoprost e 1,25 mL da solução padrão estoque de maleato de timolol para um balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume do balão volumétrico com diluente e homogeneizou. Filtrou-se e transferiu para o *vial* utilizando unidade filtrante de celulose regenerada 0,45 µm. Concentração de bimatoprost = 0,00075 mg/mL (75 µg/mL) e maleato de timolol = 0,0125 mg/mL (12,5 µg/mL).

As demais soluções e condições cromatográficas estão conforme no teste 2.

Resultados

Não houve detecção da bimatoprost nesta condição. Como a única condição alterada foi a concentração do fármaco na amostra, sugeriu-se aumentar a quantidade de fármaco na amostra para que o equipamento fosse capaz de detectar.

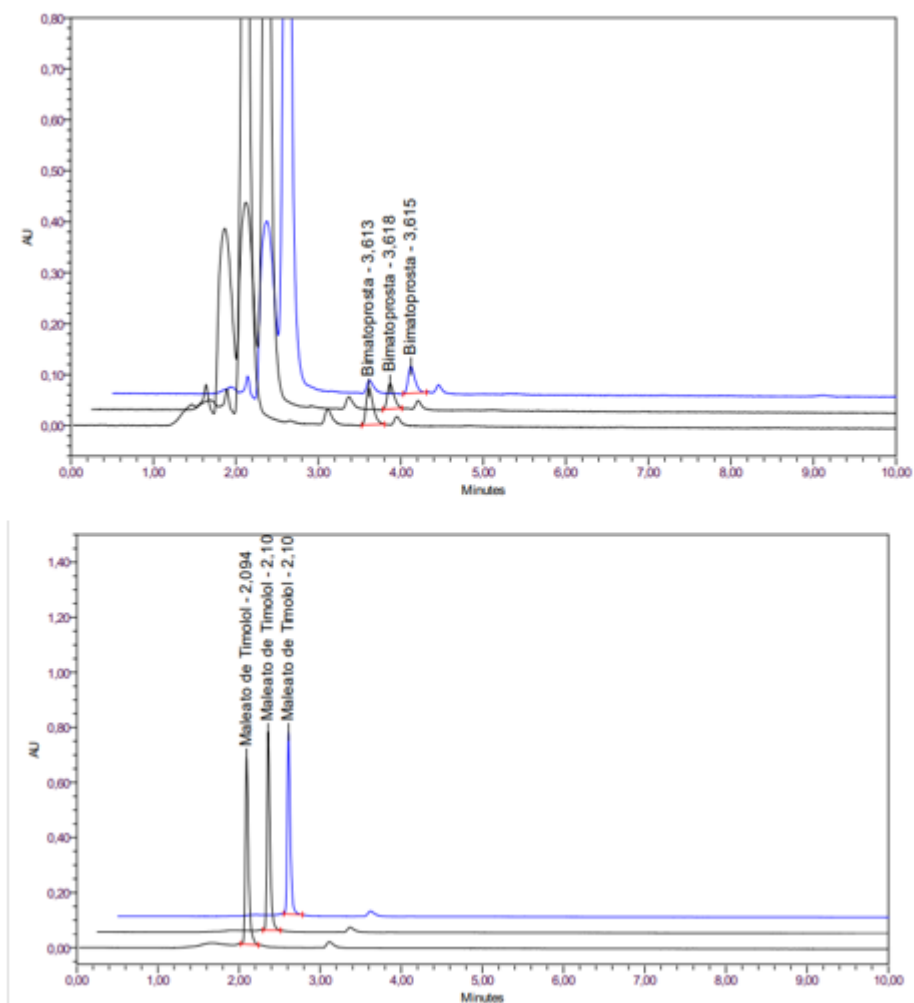
5.1.4 Teste 4

Como não houve detecção da bimatoprost, a alternativa é o aumento da quantidade de substância na amostra que chega ao detector do cromatógrafo. Como a concentração dos fármacos na solução padrão foi delineada para ser representativa dos insertes oculares, a primeira alternativa foi aumento do volume de injeção de 20 µL para 100 µL.

Resultados

A condição proposta foi adequada para os fármacos bimatoprost e maleato de timolol (Figura 8).

Figura 8- Cromatogramas referentes ao teste 4 para quantificação dos ativos (a) bimatoprost (210 nm) e (b) maleato de timolol (295 nm).



Como mostra a Figura 8, o pico referente a bimatoprostá apresentou tempo de retenção de aproximadamente 3,6 minutos no comprimento de onda de 210 nm e o maleato de timolol apresentou tempo de retenção de aproximadamente 2,1 minutos no comprimento de onda de 295 nm.

5.1.5 Teste 5

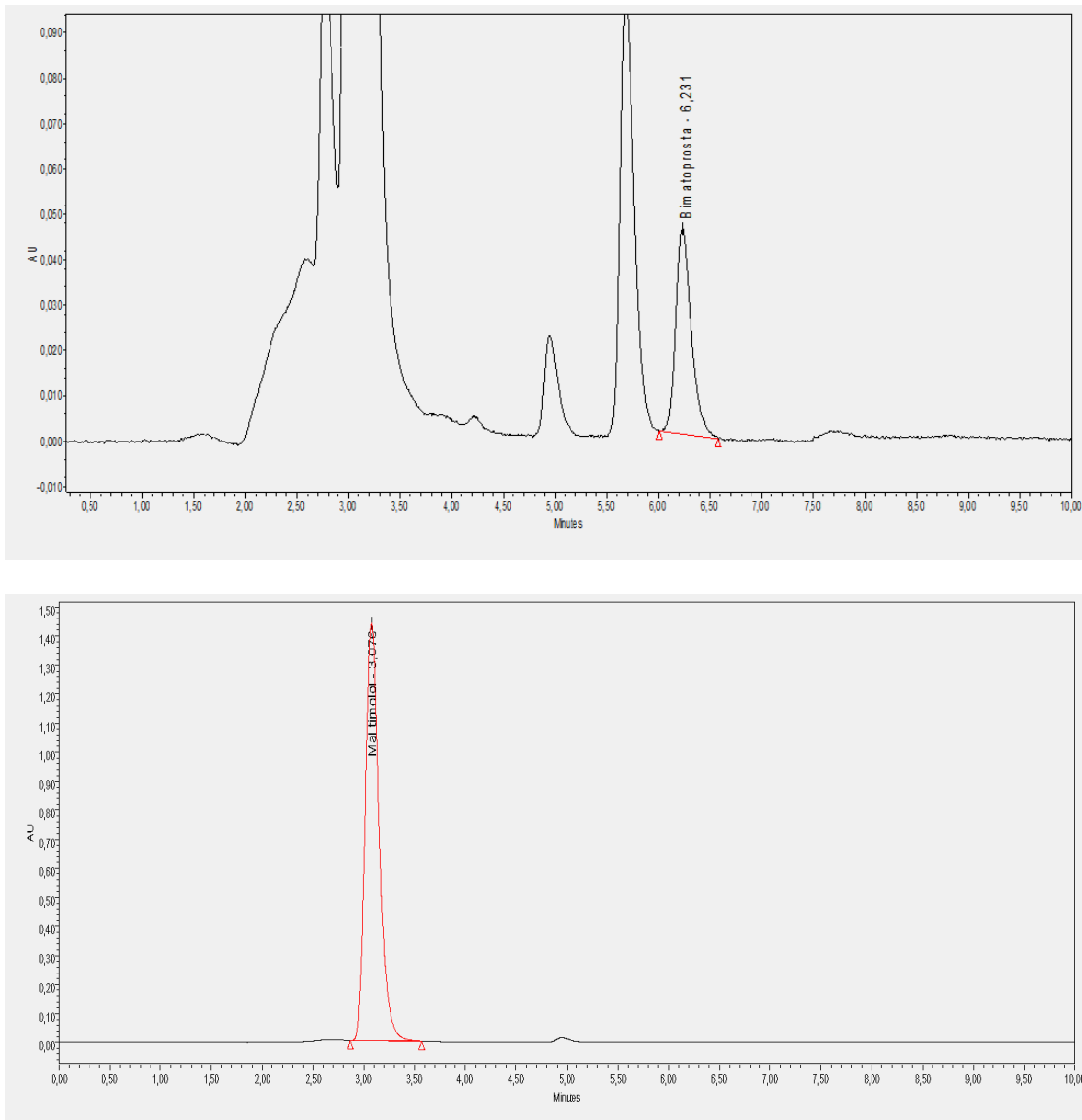
Os resultados encontrados no teste 4 foram satisfatórios, porém no decorrer das injeções a pressão da coluna cromatográfica aumentou muito, atingindo o valor máximo recomendado pelo fabricante do equipamento (5000 psi). Este fato pode estar relacionado ao aumento da injeção e pela concentração da solução de tampão na fase móvel.

Como as condições do método atendiam bem aos dois fármacos, o objetivo deste teste era realizar alguns ajustes que favorecessem a diminuição da pressão na coluna sem alterar o preparo das soluções. Sendo assim, optou-se pela diminuição do fluxo da fase móvel de 1,0 mL/minuto para 0,8 mL/minuto pois quanto maior o fluxo maior a pressão, e pela substituição da coluna cromatográfica C18, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm por uma coluna C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, pois a pressão resultante de um mesmo valor de fluxo é maior em uma coluna de menor comprimento quando comparada a uma coluna de maior comprimento.

Resultados

Com as alterações propostas, houve uma diminuição significativa da pressão na coluna cromatográfica. Como mostra a Figura 9, o cromatograma obtido no teste 5, devido ao aumento do comprimento da coluna e a diminuição do fluxo da fase móvel possibilitaram aumentos nos tempos de retenção dos ativos. Deste modo, o pico referente a bimatoprostá apresentou tempo de retenção de aproximadamente 6 minutos e o maleato de timolol apresentou tempo de retenção de aproximadamente 3 minutos. O volume morto da coluna foi de aproximadamente 1,5 minutos (determinado através da primeira oscilação da linha de base), sendo assim não há interferência no tempo de retenção dos ativos.

Figura 9- Cromatogramas referentes ao teste 5 para quantificação dos ativos bimatoprost e maleato de timolol.



5.1.6 Método analítico final

Dentre os métodos testados, o que apresentou melhor resultado foi o método utilizado no teste 5, que utilizava coluna de fase reversa C18 com tamanho de partícula de 5 μm , 25 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno. Como fase móvel, uma mistura de tampão fosfato pH 2,8 e acetonitrila (65:35). O fluxo adotado foi de 0,8 mL/min e a detecção para os fármacos foi em 210nm para a bimatoprost e em 295 nm para o maleato de timolol. O volume de injeção foi de 100 μL . O diluente utilizado foi a própria fase móvel.

Para o preparo da solução tampão, foi pesado cerca de 11,1 g de fosfato de potássio dibásico e transferido para o balão volumétrico de 1000 mL. Adicionou-se, cerca de 700 mL de água ultrapurificada e agitou-se até completa solubilização. Completou-se o volume com água ultrapurificada e homogeneizou-se. Ajustou-se o pH para 2,8 com ácido ortofosfórico.

Para o preparo da fase móvel, misturou 55 partes de solução tampão e 45 partes de acetonitrila (55:45). Filtrou-se em membrana de celulose regenerada 0,45 µm e desgaseificou-se.

Para o preparo da solução padrão, primeiramente foram preparadas as soluções padrão estoque.

Solução padrão estoque de bimatoprost: pesou-se, cerca de 1,0 mg de padrão de bimatoprost para um balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 5 mL de água ultrapurificada e agitou-se até completa solubilização do fármaco. Completou-se o volume com água ultrapurificada e homogeneizou. A concentração de bimatoprost obtida neste ensaio foi de 0,1 mg/mL.

Solução padrão estoque de maleato de timolol: Pesou-se cerca de 1 mg de maleato de timolol e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 5 mL de diluente e agitou-se até completa solubilização do fármaco. A concentração de maleato de timolol obtida neste ensaio foi de 0,1 mg/mL.

Solução padrão: Transferiu 0,075 mL da solução padrão estoque de bimatoprost e 1,25 mL da solução padrão estoque de maleato de timolol para um balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume do balão volumétrico com diluente e homogeneizou. Filtrou-se e transferiu para o *vial* utilizando unidade filtrante de celulose regenerada 0,45 µm. Concentração de bimatoprost = 0,00075 mg/mL (75 µg/mL) e maleato de timolol = 0,0125 mg/mL (12,5 µg/mL).

Para o preparo da solução amostra foi pesado um inserte (equivalente a 0,125 mg de maleato de timolol e 0,0075 mg de bimatoprost) e transferido para um balão volumétrico de 10 mL. Adicionou 2,0 mL de solução de ácido acético 1,5% e aguardou-se completa solubilização. O volume do balão volumétrico foi completado com diluente seguido de homogeneização. Posteriormente, filtrou-se e transferiu-se esta solução para o *vial* utilizando unidade filtrante de celulose regenerada 0,45 µm, obtendo a

concentração de 0,00075 mg/mL (0,75 µg/mL) de bimatoprost e 0,125 mg/mL (12,5 µg/mL) de maleato de timolol.

Após o desenvolvimento do método, ele foi validado de acordo com as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelecidas na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166 de julho de 2017. Utilizou-se, ainda, como referência, o capítulo geral da *United States Pharmacopoeia* (USP), o Guia de Validação do Instituto Nacional De Metrologia, Normalização E Qualidade Industrial (INMETRO), Guia de Validação de Procedimentos analíticos do *International Conference of Harmonization* (ICH) e o guia da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC).

Para a avaliação estatística dos testes da validação, empregou-se o software Microsoft Excel 2007.

5.2 Validação do método analítico

5.2.1 Adequabilidade do sistema

Para garantir que o sistema estava apto para o uso pretendido, a adequabilidade do sistema foi realizada previamente a cada corrida analítica (BRASIL, 2017).

Os parâmetros que foram definidos para avaliação da adequabilidade do sistema estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Parâmetros de avaliação da adequabilidade do sistema

Parâmetros	Critério
Desvio padrão entre as áreas dos picos de bimatoprost	Máximo 5,0%
Desvio padrão entre as áreas dos picos de maleato de timolol	Máximo 5,0%

Os resultados obtidos na avaliação da adequabilidade do sistema durante a validação do método analítico estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Resultados obtidos na avaliação da adequabilidade do sistema

Corrida	DPR (%) Bimatoprost	DPR (%) Maleato de timolol
1	0,795	2,444
2	1,255	1,687
3	2,495	1,227

Conforme apresentado na Tabela 2 todos os resultados obtidos foram satisfatórios, indicando que o sistema estava apto em todas as corridas analíticas.

5.2.2 Seletividade

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (BRASIL, 2017).

Para avaliar a seletividade do método foram avaliados o diluente, a solução placebo (inserte sem a presença dos dois fármacos), solução amostra (inserte contendo os dois fármacos) e a solução padrão. Para a solução amostra e solução padrão foi avaliada a pureza de pico dos ativos através do *software Ezchrom*.

5.2.2.1 Resultados

Os resultados demonstraram que o diluente e o placebo não interferem na quantificação dos ativos, ou seja, nenhum pico referente ao diluente e ao placebo possuem o mesmo tempo de retenção dos ativos bimatoprost (em 210 nm tempo de 6 min) e maleato de timolol (em 295 nm tempo de 3 min).

Figura 10- Cromatogramas referentes ao diluente (Tampão fosfato: acetonitrila (55:45) em 210nm (a) e 295 nm (b)

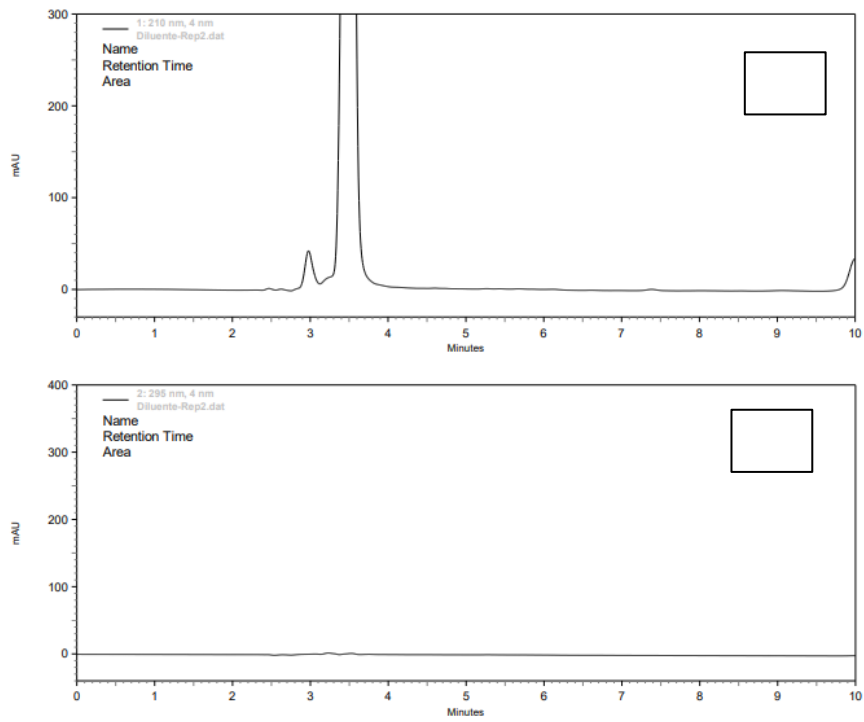


Figura 11- Cromatogramas referentes a solução placebo de 1 camada em 210 nm (a) e 295 nm (b)

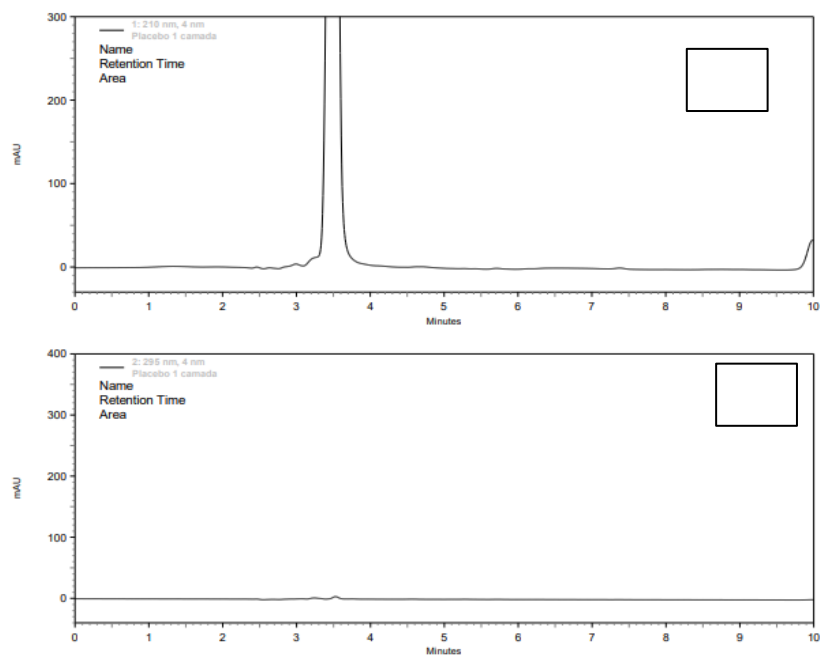


Figura 12- Cromatogramas referentes a solução placebo de 2 camadas em 210 nm (a) e 295 nm (b).

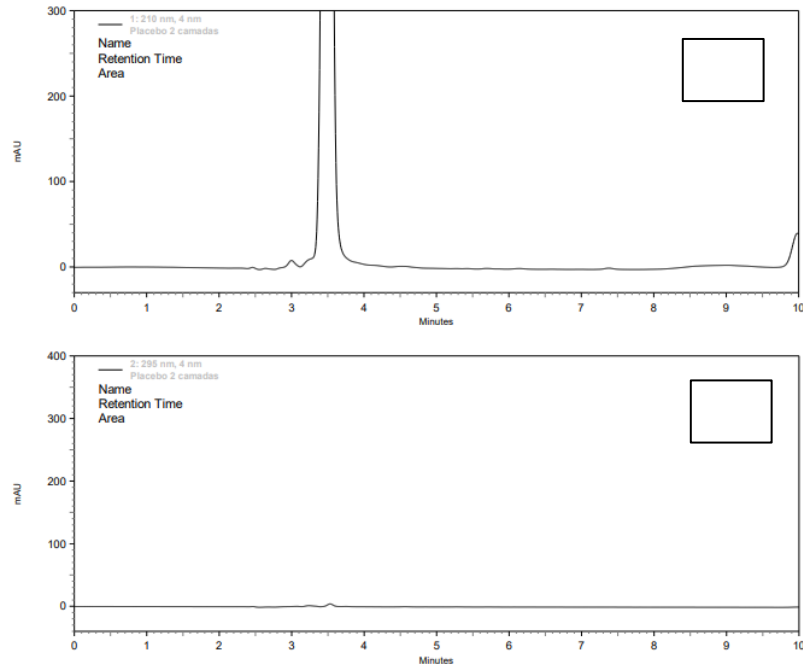


Figura 13- Cromatogramas referentes a solução placebo de 3 camadas em 210 nm (a) e 295 nm (b).

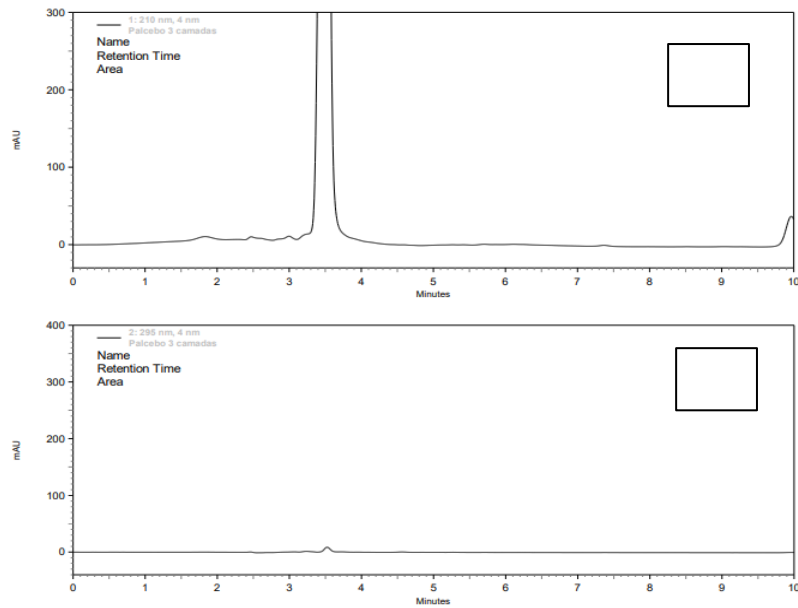


Figura 14- Cromatograma referente a solução amostra preparada com o inserte contendo bimatoprost com pico em 210nm (a) e timolol com pico em 295 nm (b).

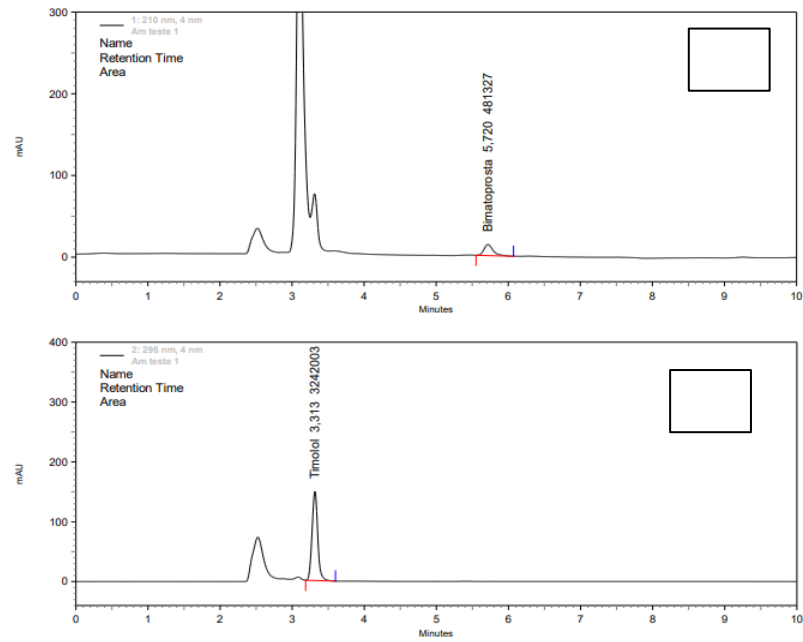
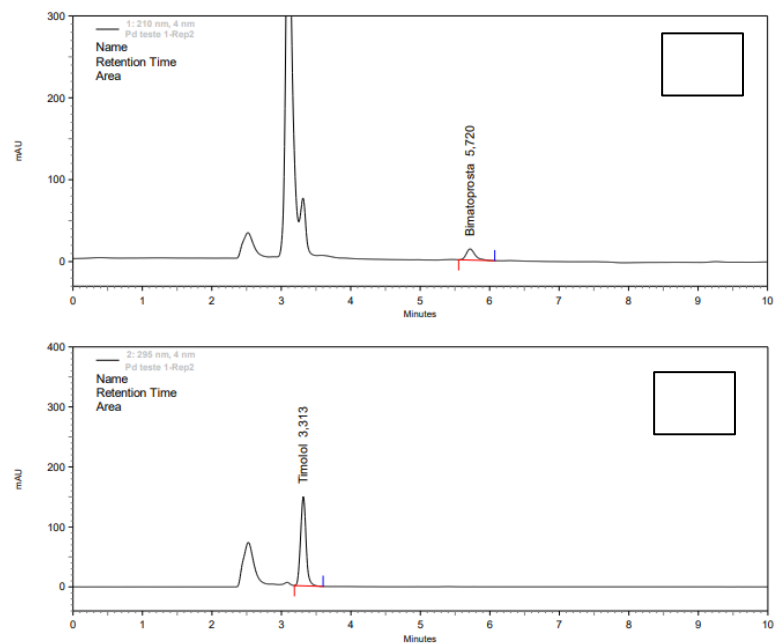


Figura 15- Cromatogramas referentes a solução padrão preparada com as substâncias químicas de referência bimatoprost (pico em 210nm) e timolol (pico em 295 nm)



As figuras acima mostram que tanto o diluente (Figura 10) quanto o placebo (Figuras 11; 12 e 13) não interferem na quantificação dos ativos bimatoprost e timolol, pois

não apresentam nenhum interferente com o mesmo tempo de retenção que os ativos. As Figuras 11, 12 e 13 mostraram ainda que não há diferença entre os placebos dos insertes contendo 1, 2 ou 3 camadas, desta forma foi utilizado apenas o placebo de 3 camadas para o restante da validação. O inserte de 3 camadas foi escolhido por apresentar maior quantidade de matriz e por isso possui maior risco de causar interferência no método.

As Figuras 14 e 15 referentes aos cromatogramas da solução amostra e solução padrão, respectivamente, mostraram que o padrão e amostra apresentaram mesmo perfil cromatográfico e os ativos bimatoprost e maleato de timolol apresentaram tempos de retenção semelhantes. Além disso, através da avaliação de pureza de pico, foi possível concluir que não houve coeluição de nenhum pico no mesmo tempo de retenção dos ativos, pois tanto na solução padrão quanto na solução amostra, os picos dos ativos apresentaram pureza de pico maior que 0,99, conforme é determinado pelo software.

Sendo assim, o método mostrou-se seletivo para a finalidade a que se destina.

5.2.3 Linearidade

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Uma relação linear deve ser avaliada em toda a faixa estabelecida para o método (BRASIL, 2017).

Para o estabelecimento da linearidade, foram utilizadas, 5 (cinco) concentrações diferentes da substância química de referência (SQR) das soluções preparadas e em triplicata.

As curvas de calibração foram construídas a partir de três soluções padrão estoque de bimatoprost e maleato de timolol. Para o preparo das soluções padrão estoque de bimatoprost e maleato de timolol pesou-se 1,00 mg de cada ativo para balão volumétrico de 10 mL, as soluções foram preparadas separadamente. As alíquotas das soluções padrão estoque foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3- Preparo das soluções da linearidade

Faixa de trabalho (%)	Bimatoprostá		Maleato de timolol	
	Alíquota da solução estoque (µL)	Concentração (µg/mL)	Alíquota da solução estoque (µL)	Concentração (µg/mL)
70	52,5	0,53	875	8,75
80	60,0	0,60	1000	10,00
100	75,0	0,75	1250	12,50
120	90,0	0,90	1500	15,00
130	97,5	0,98	1625	16,25

As três curvas obtidas foram tratadas por regressão linear utilizando o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) para obtenção da equação da reta.

Empregou-se o teste F na análise de variância com o objetivo de testar a significância da estimativa do coeficiente associado à variável independente – x, concentração, e calcular o coeficiente de determinação (R^2), com o objetivo de averiguar o grau de explicação do modelo. A homocedasticidade, isto é, homogeneidade da variância dos resíduos foi avaliada pelo teste de Cochran (INMETRO, 2011).

Após essas análises, foi construída a curva analítica das respostas em função da concentração do bimatoprostá e maleato de timolol assim como a representação gráfica dos mesmos. Foi obtido o gráfico de dispersão dos resíduos, determinada a equação da reta de regressão de y em x e a avaliada a associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (R) e determinação (R^2).

5.2.3.1 Resultados

Os resultados obtidos para a bimatoprostá e para o maleato de timolol estão apresentados nas Tabelas 4 e 5 respectivamente.

Tabela 4-Resultados obtidos no ensaio da linearidade da bimatoprostá

Concentração (%)	Concentração (µg/mL)	Área Curva 1	Área Curva 2	Área Curva 3	Média das áreas
70	0,5	339368	339830	341555	343870,7

80	0,6	387140	378875	383650	383221,7
100	0,8	483076	489272	482206	484851,3
120	0,9	573485	571139	584173	576265,7
130	1,0	627145	625544	651285	634658,0

Tabela 5- Resultados obtidos no ensaio da linearidade do maleato de timolol

Concentração (%)	Concentração (µg/mL)	Área Curva 1	Área Curva 2	Área Curva 3	Média das áreas
70	8,8	4576272	4793772	4798897	4722980,3
80	10,0	5242949	5477313	5480371	5400211,0
100	12,5	6567334	6854472	6851313	6757706,3
120	15,0	7951955	8248666	8225977	8142199,3
130	16,3	8604080	8828120	8845324	8759174,7

Em complementação as Tabelas 4 e 5, os gráficos (Figuras 16 e 17) apresentam a avaliação visual da linearidade, foi avaliada a relação linear entre as variáveis pelo coeficiente de correlação de Person (r), com valores de r^2 superiores à 0,990. Para a bimatoprostá o r^2 foi 0,9985 e para maleato de timolol foi 0,9998, demonstrando que há proporcionalidade entre a concentração (eixo x) do analito e sua resposta que é medida pela área do pico (eixo y).

Figura 16- Curva obtida no ensaio da linearidade da bimatoprostá. Eixo x concentração µg/mL e eixo y valores de área.

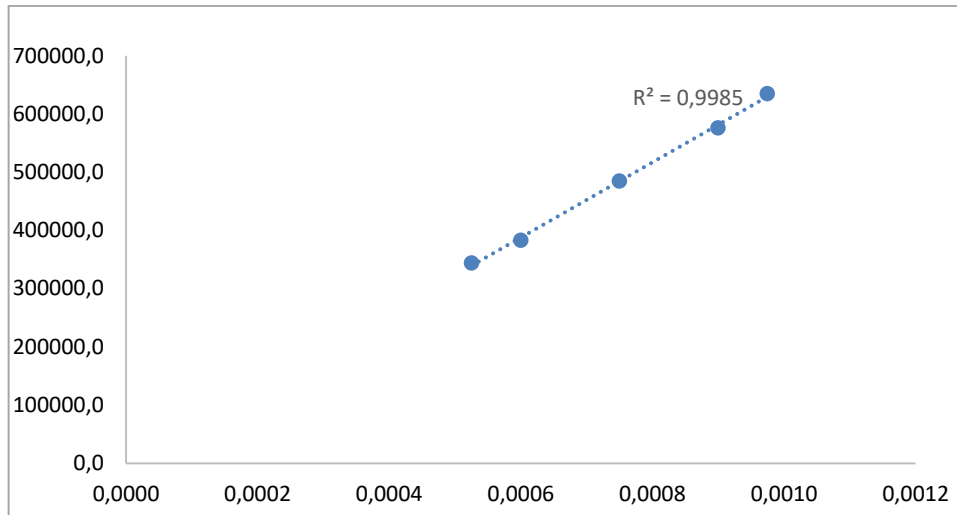
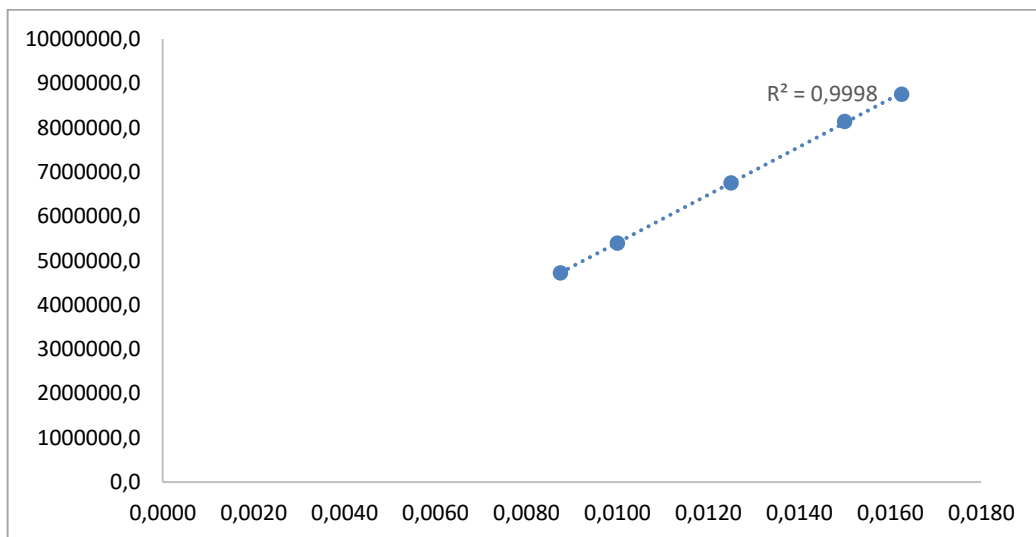


Figura 17- Curva obtida no ensaio da linearidade da bimatoprost. Eixo x concentração µg/mL e eixo y valores de área.



A regressão de Y em X pelo método dos mínimos quadrados foi utilizada para estimativa da reta, sendo a regressão da reta dada por:

$$y = a + bx$$

Onde:

$$b = \text{Inclinação da reta de mínimos quadrados: } (b) = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\left[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right]}$$

$$a = \text{Intercepto da reta do mínimo quadrados: } (a) = \bar{y} - b\bar{x}$$

Desta forma, a equação da reta obtida para a bimatoprostá foi $y = 554,3 + 645358,97x$ e para o maleato de timolol $y = -9914,77 + 541309,53x$.

Foi ainda realizado o teste de Cochran para os dados visando a avaliação da homogeneidade das variâncias (homocedasticidade), comparando a maior variância com a soma das variâncias. O critério foi ao nível de 5,0% de significância (“C calculado” em relação a “C crítico”), de forma que:

$$C_{\text{Calculado}} < C_{\text{Crítico}} \text{ ® Aceita-se a hipótese nula (homocedástico)}$$

$$C_{\text{Calculado}} \geq C_{\text{Crítico}} \text{ ® Rejeita-se a hipótese nula (heterocedástico)}$$

Sendo o $C_{\text{crítico}}$ calculado de acordo com o número de medidas (réplicas) e com o número de pontos ao nível de significância de 5% (BRASIL, 2017).

Na validação do método obteve-se o C calculado igual a 0,651 para a bimatoprostá e 0,254 para o maleato de timolol, sendo todos menores que o C crítico 0,684, evidenciando a homoscedasticidade das curvas obtidas, e que o método dos mínimos quadrados ordinários é adequado.

Empregou-se também o teste F na análise de variância com o objetivo de testar a significância da estimativa do coeficiente associado à variável independente – x, concentração, e calcular o coeficiente de determinação (r^2) com o objetivo de averiguar o grau de explicação do modelo.

Por meio dos dados obtidos na análise de variância (ANOVA), pode-se concluir que a regressão é significativa, pois F calculado para bimatoprostá (4,89) e maleato de

timolol (5,32), é maior que F tabelado (4,67). Ou seja, há diferença estatística entre as médias das áreas das diferentes concentrações dos analitos utilizadas no teste de linearidade.

Também foram avaliados os gráficos de resíduos gerados pela regressão, sendo as representações gráficas apresentadas nas Figura 18 e 19. Nestas pode-se verificar que os dados de regressão se comportam de forma homogênea e estão normalmente distribuídos em torno da reta de regressão

Figura 18- Representação gráfica dos resíduos para bimatoprost.

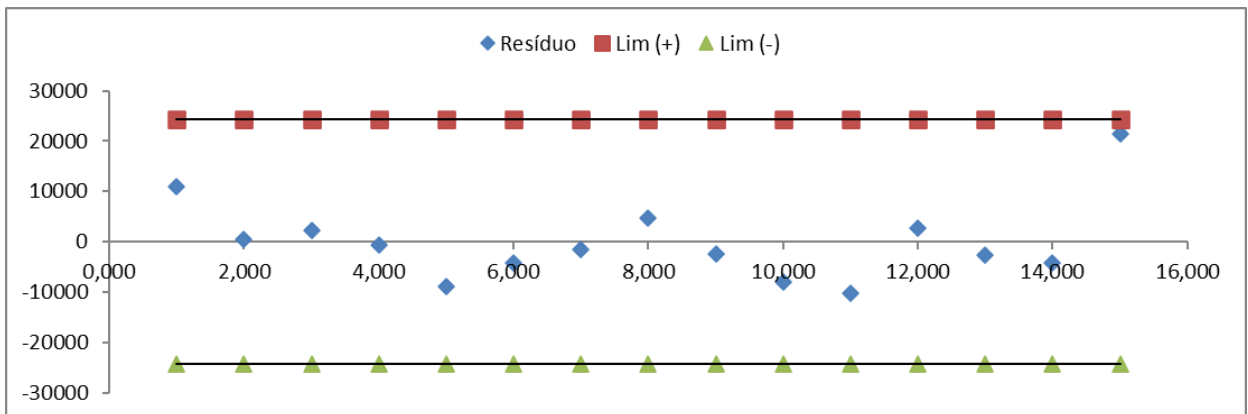
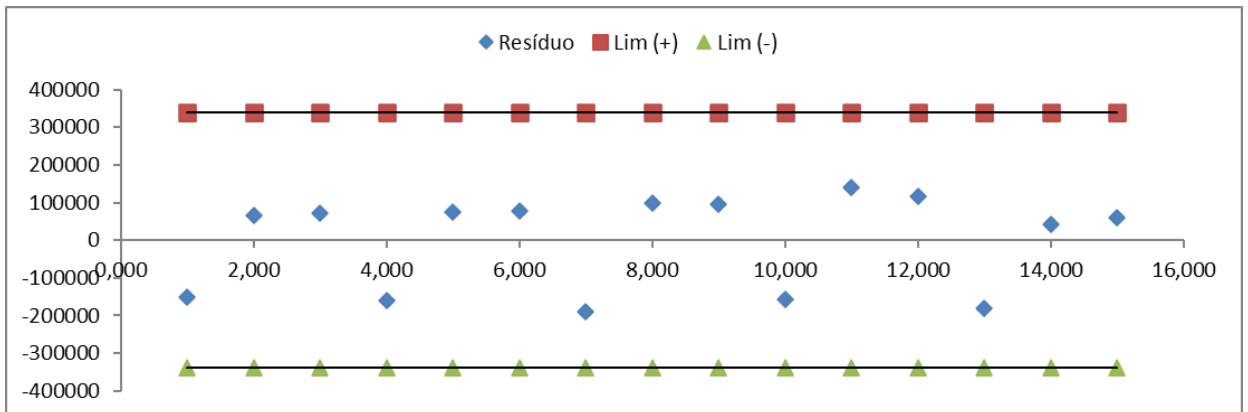


Figura 19- Representação gráfica dos resíduos para maleato de timolol.



Os resultados apresentados acima demonstraram que o método analítico foi linear para quantificação da bimatoprost e do maleato de timolol, ou seja, à medida que aumenta a concentração a resposta aumenta proporcionalmente.

5.2.4 Faixa de trabalho (intervalo)

A faixa de trabalho deve ser estabelecida a partir dos estudos de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão, sendo dependente da aplicação pretendida. Para métodos de teor a faixa é de 80% (oitenta por cento) a 120% (cento e vinte por cento) e para uniformidade de conteúdo: de 70% (setenta por cento) a 130% (cento e trinta por cento) (BRASIL, 2017).

Como o método deste estudo foi utilizado para avaliar o teor e a uniformidade de conteúdo dos insertes desenvolvidos, a faixa validada foi de 70% a 130%, abrangendo assim a faixa especificada para os dois métodos.

5.2.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (BRASIL, 2017).

Para o preparo da exatidão foi transferido um inserte sem os fármacos (branco) para balão volumétrico de 10,0 mL, adicionou 2 mL de solução de ácido acético 1,5% e aguardou até completa solubilização. Em seguida, contaminou o inserte com as soluções padrões estoque de bimatoprost e maleato de timolol, conforme preparo descrito no item 5.2.3, e as alíquotas foram transferidas conforme Tabela 6.

A exatidão foi verificada com 9 determinações contemplando o intervalo linear do método quantitativo para teor e uniformidade de conteúdo (70% até 130% da concentração de trabalho): 3 baixas: [70%]; 3 médias: [100%] e 3 altas: [130%].

Tabela 6- Preparo das soluções da exatidão

Faixa de trabalho (%)	Bimatoprost		Maleato de timolol	
	Alíquota da solução estoque (µL)	Concentração (µg/mL)	Alíquota da solução estoque (µL)	Concentração (µg/mL)
70	52,5	0,53	875	8,75
100	75,0	0,75	1250	12,50
130	97,5	0,98	1625	16,25

Para avaliação da exatidão foram adotados os critérios de aceitação preconizados pela AOAC (2019), conforme descrito na Figura 20. Para o ativo bimatoprost a

concentração de trabalho foi de 0,75 µg/mL (0,75 ppm) e, portanto, o critério de aceitação para recuperação foi de 80% a 110%. Para o maleato de timolol a concentração de trabalho foi de 12,5 µg/mL (12,5 ppm) e, portanto, o critério de aceitação foi de 90% a 107%.

Figura 20-Quadro da recuperação esperada como função da concentração do analito

Analito (%)	Fração de massa (C)	Unidade	Quantidade Recuperada (%)
100	1	100 %	98-102
10	10 ⁻¹	10 %	
1	10 ⁻²	1 %	97-103
0,1	10 ⁻³	0,1 %	95-105
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/Kg)	90-107
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/Kg)	80-110
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/Kg)	
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg/Kg)	
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg/Kg)	60-115
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg/Kg)	40-120

Fonte: AOAC (2019) com adaptações

O cálculo da recuperação da exatidão foi realizado conforme fórmula abaixo:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração obtida}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

5.2.5.1 Resultados

Os resultados obtidos para avaliação da exatidão da bimatoprost e do maleato de timolol estão apresentados nas Tabelas 7 e 8 abaixo.

Tabela 7- Resultados obtidos no ensaio da exatidão da bimatoprost

Concentração	Resposta	Recuperação (%)	CV (%)
--------------	----------	-----------------	--------

	344752	84,9	
Baixa (70%)	341343	84,1	1,66
	352560	86,8	
	482067	83,1	
Média (100%)	487315	84,0	1,26
	494274	85,2	
	639896	84,8	
Alta (130%)	753688	99,9	8,70
	665455	88,2	

Tabela 8- Resultados obtidos no ensaio da exatidão do maleato de timolol.

Concentração	Resposta	Recuperação (%)	CV (%)
	1 2920829	101,5	
Baixa (70%)	2 2932050	101,9	0,22
	3 2931423	101,8	
	4 4022171	98,7	
Média (100%)	5 4152525	102,0	1,73
	6 4049438	99,4	
	7 5312642	100,8	
Alta (130%)	8 5422461	103,0	1,11
	9 5333921	101,3	

Os resultados demonstraram que tanto a bimatoprostá quanto o maleato de timolol apresentaram uma recuperação satisfatória de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos pela AOAC e, portanto, o método é exato para a finalidade pretendida.

5.2.6 Precisão

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade (BRASIL, 2017).

A precisão foi avaliada com o conjunto de dados de precisão do analista 1 e analista 2 realizado em dias diferentes. A precisão de ambos os analistas foi realizada com o preparo de 3 replicatas em 3 diferentes níveis de concentração (baixo, médio e alto) do placebo contaminado com o padrão das substâncias químicas de referência. O intervalo avaliado foi de 70% a 130% da concentração de trabalho dos ativos bimatoprostá e maleato de timolol. Preparo conforme o item 5.2.5.

A precisão foi demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) das séries de medições do analista 1 (repetibilidade) e analista 2 (precisão intermediária) em conjunto, avaliado conforme a fórmula abaixo.

$$\text{Desvio Padrão Relativo (DPR)} = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração média}} \times 100$$

Para avaliação da precisão foram adotados os critérios de aceitação preconizados pela AOAC (2019), conforme descrito na Figura 21. Para o ativo bimatoprostá a concentração de trabalho é de 0,75 µg/mL (0,75 ppm) e, portanto, o critério de aceitação para o desvio padrão da precisão é 11%. Para o maleato de timolol a concentração de trabalho é 12,5 µg/mL (12,5 ppm) e, portanto, o critério de aceitação para o desvio padrão é de 5,3%.

Figura 21- Quadro da precisão esperada como função da concentração do analito

Analito (%)	Fração de massa (C)	Unidade	Desvio Padrão Relativo (%)
100	1	100 %	1,3

10	10⁻¹	10 %	1,9
1	10⁻²	1 %	2,7
0,1	10⁻³	0,1 %	3,7
0,01	10⁻⁴	100 ppm (mg/Kg)	5,3
0,001	10⁻⁵	10 ppm (mg/Kg)	7,3
0,0001	10⁻⁶	1 ppm (mg/Kg)	11
0,00001	10⁻⁷	100 ppb (µg/Kg)	15
0,000001	10⁻⁸	10 ppb (µg/Kg)	21
0,0000001	10⁻⁹	1 ppb (µg/Kg)	30

Fonte: AOAC (2019) com adaptações

5.2.6.1 Resultados

Os resultados obtidos para avaliação da precisão da bimatoprost e do maleato de timolol estão apresentados nas Tabelas 9 e 10 abaixo.

Tabela 9- Resultados obtidos no ensaio da precisão da bimatoprost

Nível	Analista 1 (dia 1)	Analista 2 (dia 2)	DPR
	59,42	58,52	
Baixo	58,84	59,90	1,53
	60,77	60,58	
	83,09	82,34	
Médio	84,00	82,01	1,82
	85,20	85,77	
	109,62	108,40	
Alto	112,68	111,15	2,10
	114,70	113,11	

Tabela 10- Resultados obtidos no ensaio da precisão do maleato de timolol

Nível	Analista 1 (dia 1)	Analista 2 (dia 2)	DPR
	73,36	73,31	
Baixo	73,64	72,28	1,02
	73,63	71,89	
	101,02	103,83	
Médio	104,30	101,41	1,32
	101,71	102,04	
	133,44	129,03	
Alto	136,19	132,03	1,82
	133,97	131,73	

Os resultados demonstram que tanto para o fármaco bimatoprostá quanto para o maleato de timolol o método apresentou precisão (repetibilidade e precisão intermediária) satisfatória de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos pela AOAC e, portanto, o método é preciso para a finalidade pretendida.

5.2.7 Robustez

A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas (BRASIL, 2017). Caso haja susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas por meio de precauções descritas no método.

A robustez foi delineada a partir do método proposto por Youden & Steiner (Inmetro, 2003, DOQ-CGCRE-008), conforme Tabela 11.

Tabela 11- Parâmetros avaliados no teste de Youden & Steiner

Parâmetro	Condição Original	Condição alterada
Fluxo da fase móvel (A/a)	A – 0,8 mL/ minuto	a – 1,0 mL/minuto
pH da fase móvel (B/b)	B – 2,8	b – 3,0

Parâmetro	Condição Original	Condição alterada
Temperatura da coluna (C/c)	C – 30,0°C	c – 32,0 °C
Composição da fase móvel: Tampão: acetonitrila (D/d)	D – 55:45	d – 53:47

Este procedimento permite avaliar até 7 variáveis com 8 análises de uma amostra e padrão conforme mostra a Tabela 12.

Tabela 12- Delineamento do teste de Youden & Steiner

Variáveis	Experimentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Fluxo da fase móvel (A/a)	A	A	A	A	a	A	a	a
pH da fase móvel (B/b)	B	B	b	b	B	B	b	b
Temperatura da coluna (C/c)	C	c	C	c	C	C	C	c
Composição da fase móvel: Tampão: acetonitrila (D/d)	D	D	d	d	d	D	D	D

5.2.7.1 Resultados

Os resultados obtidos para avaliação da robustez da bimatoprostá e do maleato de timolol estão apresentados na Tabela 13 abaixo.

Tabela 13- Resultados obtidos no ensaio de Robustez para os ativos bimatoprostá e maleato de timolol

Experimentos	Teor de Bimatoprostá (%)	Teor de Maleato de timolol (%)
1 - Controle	96,8	95,3
2	87,9	93,8
3	85,7	97,3
4	101,8	96,9
5	84,3	97,6
6	94,6	97,3
7	100,6	97,0

8	96,6	106,3
---	------	-------

A avaliação dos resultados de acordo com os parâmetros alterados está apresentada Tabela 14 abaixo.

Tabela 14- Avaliação dos parâmetros alterados no teste de robustez para os fármacos bimatoprost e maleato de timolol

Parâmetros	Varição [%]	Status
Fluxo da fase móvel	0,98	Aprovado
pH da fase móvel	5,30	Reprovado
Temperatura da coluna	3,36	Aprovado
Composição da fase móvel	-3,87	Aprovado

Após a avaliação dos resultados, pode-se afirmar que o método analítico não foi capaz de resistir às pequenas e deliberadas variações no parâmetro pH da fase móvel, pois apresentou variação superior a 5%. Dessa forma, estas condições devem ser bem controladas durante execução do método.

Para os parâmetros fluxo da fase móvel, temperatura da coluna e composição da fase móvel o método foi robusto.

PARTE 3- PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS DE LIBERAÇÃO DE MALEATO DE TIMOLOL E BIMATOPROSTA

6 MÉTODOS

6.1 Preparo de dispositivos poliméricos

6.1.1 Preparo de dispositivos poliméricos brancos monocamada

Os insertes brancos monocamada foram preparados pela adição de 2% p/v de quitosana a uma solução contendo ácido acético 1,5% v/v em água milliQ. Foi adicionado 100 µL da solução do corante lissamina verde. A dispersão foi agitada por 24 horas, com a obtenção de gel espesso, o qual foi espalhado sobre uma placa siliconada perfurada. Após agitação, o preparado foi seco por cerca 24 horas, à temperatura ambiente, para a obtenção dos dispositivos.

6.1.2 Preparo de dispositivos poliméricos brancos bicamada

Os insertes brancos bicamadas foram obtidos semelhantemente aos de monocamada (5.1.1). Assim, após secagem da primeira camada, adicionou-se uma segunda camada (da mesma dispersão polimérica) sobre a placa de silicone já com o inserte formado referente à primeira camada. Essa dispersão foi deixada secar por cerca de dois dias, à temperatura ambiente e protegida da luz, para a obtenção do inserte de duas camadas.

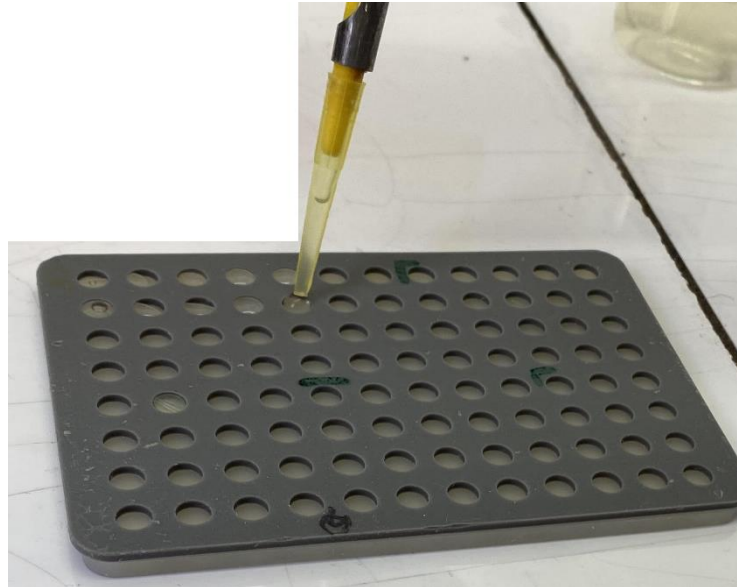
6.1.3 Preparo de dispositivos poliméricos brancos tricamada

Os insertes brancos tricamada foram obtidos, inicialmente, de forma idêntica aos insertes bicamadas. Porém, após o processo de secagem da segunda camada, foi adicionada a terceira dispersão (idêntica às anteriores) e posteriormente seca por cerca de três dias à temperatura ambiente e protegida da luz.

6.1.4 Preparo de dispositivos poliméricos monocamada contendo fármaco

Para a obtenção dos dispositivos poliméricos monocamada contendo fármaco, adicionou-se à uma solução de ácido acético 1,5% v/v, 100 μ L da solução do corante lissamina verde, 25 μ L da solução de colírio de bimatoprost e 25 μ L da solução de colírio de maleato de timolol sob agitação magnética. Foram adicionados, à esta solução, 2% p/v de quitosana. A dispersão coloidal foi agitada por 24 horas em agitador magnético para a obtenção de um gel viscoso contendo os fármacos. O gel obtido foi adicionado, com auxílio de pipeta automática (40 μ L), em placa siliconada perfurada e deixado secar por cerca de 24 horas para a obtenção dos insertes monocamada, conforme mostra a Figura 22.

Figura 22- Obtenção dos insertes monocamada em placa siliconada



6.1.5 Preparo dos dispositivos poliméricos bicamada contendo fármaco

Para o preparo dos dispositivos bicamada com fármaco foi seguido o método de preparo do inserte branco de duas camadas (6.1.4) trocando a adição de dispersão sem fármaco por uma dispersão com fármaco idêntica à obtida para o inserte monocamada com a substância ativa. Assim, a dispersão de quitosana 2% p/v em ácido acético 1,5% v/v foi preparada e adicionada em placa perfurada. Após secagem por 24 horas à temperatura ambiente, foi adicionada a segunda camada com fármaco. Esta segunda camada foi obtida pela adição da dispersão cuidadosamente pipetada de fármacos e polímero obtida no item 6.1.4 e colocada sobre a primeira camada previamente feita sem fármaco, com secagem por período de 48 horas.

6.1.6 Preparo dos dispositivos poliméricos tricamada contendo fármaco

Para o preparo dos dispositivos tricamada foi adicionada ao inserte bicamada com fármaco (item 6.1.5), uma camada de dispersão polimérica sem fármaco produzida idênticamente ao descrito na obtenção do inserte monocamada sem fármaco (item 6.1.1). Após a adição desta terceira camada, o inserte foi seco por cerca de três dias à temperatura ambiente.

6.1.7 Preparo da lágrima artificial pH 7,0

Foi preparada uma solução com 0,2% de NaHCO_3 , 0,008% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,67% de NaCl em água MilliQ (MARQUES *et al.*, 2011).

6.2 Caracterização dos dispositivos poliméricos

No sentido de avaliar as características físicas e químicas dos sistemas obtidos, os insertes secos, obtidos na forma de dispositivos circulares de 5 mm de diâmetro foram utilizados para avaliação dos seguintes parâmetros: porcentagem de hidratação, determinação de peso, pH de superfície, espectro na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, termogramas com curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG), teor de fármaco e uniformidade de conteúdo, potencial de liberação do fármaco incorporado e perfil de liberação *in vitro*.

6.2.1 Porcentagem de hidratação (intumescimento)

A propriedade de intumescimento dos insertes foi avaliada pela determinação da porcentagem de hidratação. Para isso, foi utilizado método descrito por Öner *et al.* (2007) segundo o qual, a capacidade de hidratação dos dispositivos é determinada pela diferença de peso antes e depois de serem imersos em solvente, sendo que em nosso estudo, utilizamos lágrima artificial (MARQUES *et al.*, 2011). Assim, três amostras foram pesadas e, posteriormente, cada uma foi imersa em quantidade de lágrima artificial suficiente para cobrir os insertes durante todo o experimento (aproximadamente 20 mL). Os tempos de imersão para as amostras foram de 5, 10, 20, 30 e 60 min. Após imersão durante o tempo determinado, as amostras foram removidas do meio, secas cuidadosamente com papel absorvente, e pesadas. A porcentagem de hidratação foi calculada de acordo com a equação abaixo.

$$\% \text{Hidratação} = \left[\frac{x_t - x_0}{x_0} \right] \times 100$$

onde x_t é o peso do inserte intumescido após o tempo t e x_0 é o peso original do inserte no tempo zero. Esse experimento foi realizado em triplicata.

6.2.2 Determinação de peso

O teste se aplica a formas farmacêuticas sólidas em dose unitária (comprimidos não revestidos, comprimidos revestidos, pastilhas, cápsulas duras e moles e supositórios), formas farmacêuticas sólidas acondicionadas em recipientes para dose unitária (pós estéreis, pós liofilizados, pós para injetáveis e pós para reconstituição de uso oral) e a formas farmacêuticas sólidas e semissólidas acondicionadas em recipientes para doses múltiplas (granulados, pós, géis, cremes, pomadas e pós para reconstituição). As pesagens devem ser feitas em balanças de sensibilidade adequada (BRASIL, 2019).

Para produtos em dose unitária, o teste possibilita verificar se as unidades de um mesmo lote apresentam uniformidade de peso. Com isso, visando realizar o teste, é necessário determinar, previamente, o peso médio de unidades do lote. (BRASIL, 2019).

Contudo, como a Farmacopeia Brasileira não apresenta o teste de determinação de peso para insertes oculares. Neste caso, visando determinar a homogeneidade do peso dos dispositivos, foi adotado os mesmos critérios da forma farmacêutica comprimido, haja vista que esta, de todas as formas farmacêuticas supracitadas, é a que mais se aproxima do objeto de estudo.

De acordo com o procedimento para comprimidos não revestidos ou revestidos com filme, deve-se pesar individualmente, 20 comprimidos e determinar o peso médio. Pode-se tolerar, no máximo, duas unidades fora dos limites especificados, em relação ao peso médio, porém, nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas (BRASIL, 2019). Assim, adotou-se estes limites de forma semelhante ao que a Farmacopeia Brasileira 6ª edição adota para comprimidos não-revestidos ou revestidos com filme, comprimidos efervescentes, comprimidos sublinguais, comprimidos vaginais e pastilhas possuindo como referência 80 mg ou menos $\pm 10,0\%$ da forma farmacêutica sólida.

6.2.3 Avaliação do pH de superfície

Para a avaliação do pH de superfície, os insertes foram molhados com 300 μL de água purificada e em seguida, o pH da superfície molhada foi medido com fita de pH. Esse experimento foi realizado em triplicata.

6.2.4 Espectrometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (ATR-FTIR)

O polímero (quitosana) os insertes brancos e os insertes contendo fármacos foram analisados por espectrometria na região do infravermelho para avaliação e caracterização das alterações moleculares decorrentes do processo de produção do inserte e da capacidade dos insertes de incorporar o fármaco. Para a análise dos materiais, os insertes foram finamente cortados, com o auxílio de tesoura, e, os pedaços obtidos, bem como os polímeros, foram avaliados diretamente em espectrômetro Termo Fischer IS5 (USA).

6.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os insertes desenvolvidos foram analisados por MEV com o intuito de caracterizar morfologicamente os dispositivos. As amostras foram diretamente analisadas no equipamento (JEOL, modelo JSM-6360LV) operado entre 2,5 e 10 kV, em baixo vácuo para as amostras sem revestimento e entre 2,5 e 10 kV para as amostras com revestimento de carbono. Foram feitos cortes criogênicos para visualização da fratura com o intuito de se verificar as diferentes camadas existentes nos insertes assim como a possibilidade de identificar fármacos no estado sólido. Foi analisado, também, a superfície dos insertes com o intuito de verificar a existência de sólidos. Vários aumentos foram utilizados para a obtenção de imagens adequadas.

6.2.6 Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O comportamento térmico das amostras foi avaliado por meio de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA). As curvas TG foram derivadas em 1ª ordem para confirmação dos fenômenos térmicos (dados não divulgados).

As curvas DSC foram obtidas na célula DSC60 Shimadzu sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹. As amostras de lissamina, quitosana e timolol foram submetidas à um ciclo de aquecimento de 30 a 400 °C. As demais foram submetidas a dois ciclos de aquecimento, sendo o primeiro de 30 a 200°C e o segundo de 30 a 400 °C. Utilizou-

se cadinho de alumínio fechado e massa de amostra, exatamente cerca de, 2,0 mg. O equipamento foi previamente calibrado com padrão Índio ($T_{\text{onset}} = 156,63 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta H_{\text{fus}} = 28,45 \text{ J.g}^{-1}$).

As curvas TG/DTA simultâneas foram obtidas na termobalança DTG60 Shimadzu em atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min^{-1} . As amostras de lissamina, quitosana e timolol foram submetidas à um ciclo de aquecimento de 30 a $400 \text{ }^\circ\text{C}$. As demais foram submetidas a dois ciclos de aquecimento, sendo o primeiro de 30 a 200°C e o segundo de 30 a $400 \text{ }^\circ\text{C}$. Utilizou-se cadinho de alumina aberto e massa de amostra, exatamente cerca de, 3,0 mg.

6.2.7 Teor de fármaco no dispositivo

O teor médio de fármaco no dispositivo foi avaliado pela imersão de um *pool* de 10 insertes, aleatoriamente selecionados, em 20 mL de solução de ácido acético 1,5%, em um balão volumétrico de 100 mL. Para prosseguir com o doseamento, foi aguardado a completa solubilização dos mesmos neste sistema. Após solubilização, o volume do balão volumétrico foi completado com o diluente (tampão fosfato e acetonitrila na proporção de 55:45 v/v) e a solução foi homogeneizada. Três alíquotas da solução obtida foram filtradas com utilização de filtro de membrana de celulose regenerada $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ e quantificadas para a avaliação do teor médio dos fármacos no dispositivo. A análise foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência conforme método previamente validado (item 5).

6.2.8 Uniformidade de conteúdo do dispositivo

A uniformidade de conteúdo do dispositivo foi avaliada pela imersão de insertes, aleatoriamente selecionados, em 2 mL de solução de ácido acético 1,5%, em um balão volumétrico de 10 mL, e aguardar até completa solubilização. Após solubilização, o volume do balão volumétrico foi completado com o diluente (tampão fosfato e acetonitrila na proporção de 55:45 v/v) e as soluções foram homogeneizadas. O procedimento foi realizado para 10 amostras como preconizado na F.Bras.6ªEd. Para isso, uma alíquota de cada solução obtida foi filtrada com utilização de filtro de membrana de celulose regenerada $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ e quantificadas para a avaliação da uniformidade de conteúdo dos fármacos no dispositivo. A análise foi realizada em

cromatógrafo líquido de alta eficiência conforme método previamente validado (item 5).

Para fins de cálculo, a avaliação da uniformidade de conteúdo foi realizada através do Valor de Aceitação (VA), segundo equação:

$$VA = |M - \bar{X}| + ks$$

onde M é um valor de referência dependente do valor do teor, \bar{X} é a média dos conteúdos individuais expressa como porcentagem da quantidade declarada, k é a constante de aceitabilidade (se $n=10$, $k=2,4$) e s é o desvio padrão da amostra.

6.2.9 Potencial de liberação do fármaco e perfil de liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* dos fármacos foi realizado utilizando membranas de diálise para retenção dos insertes permitindo somente passagem de substâncias de baixa massa molecular. Assim, os insertes contendo os fármacos foram colocados em sacos, previamente confeccionados de diálise com *cut off* de 10000 Da (Sigma-aldrich®, EUA). As membranas de diálise foram incubadas em quantidade de meio suficiente para recobrir todos os insertes (aproximadamente 3 mL) de meio de liberação constituído de lágrima artificial (Figura 23). Este sistema foi colocado em agitador de bancada a $37 \pm 0,5$ °C, com agitação contínua. Alíquotas (1 mL) do meio de liberação foram coletadas nos intervalos de tempo de 0; 5; 10; 20; 30 e 60 minutos, 24, 48, 72 e 96 horas. O meio de liberação foi totalmente repostado a cada coleta. A quantidade dos fármacos, maleato de timolol e bimatoprost, liberada foi avaliada por metodologia previamente validada para quantificação dos fármacos (item 5).

Figura 23- Preparação insertes oculares em membrana de diálise para o ensaio de liberação *in vitro*.

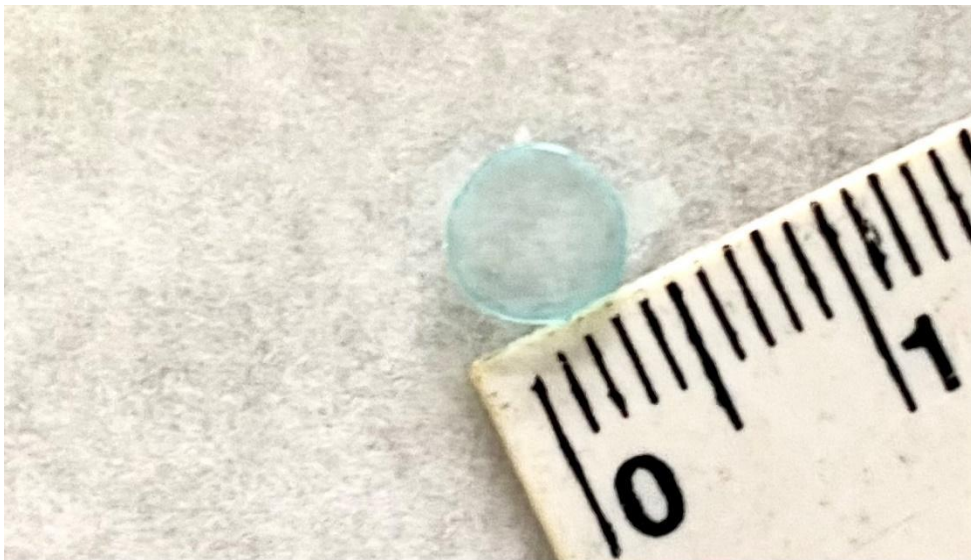


7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os insertes foram obtidos com e sem fármacos, pelo método de evaporação do solvente, sendo de mono, bi e tricamadas. O método de evaporação do solvente já é utilizado pela literatura e permite a obtenção de sistemas de liberação extremamente versáteis, sólidos, e passíveis de utilização em mucosas corpóreas dependendo do tipo de polímero empregado (FRANCA *et al.*, 2014; CESAR *et al.*, 2019). Os insertes obtidos neste trabalho foram insertes de quitosana, um polímero natural já utilizado por nosso grupo de pesquisa há 12 anos para produção de dispositivos de liberação de fármacos.

Os insertes produzidos com mais de uma camada não tiveram separação identificadas visualmente, demonstrando que foi possível obter, com o método de evaporação do solvente, um sistema íntegro. Os insertes produzidos (Figura 24) possuem formato circular, 5 milímetros de diâmetro e coloração azul em função da presença do corante Lissamina.

Figura 24- Insete ocular obtido pelo método de evaporação de solvente



A utilização de placa de Petri como suporte para a produção dos insertes também tem sido utilizada pela literatura. Contudo, oposto a isso, em experimentos prévios (não publicados), foi verificado que a utilização deste suporte conduzia a uma heterogeneidade no conteúdo dos fármacos, fazendo com que optássemos pela utilização do suporte de silicone, com volume e diâmetros adequados e constantes para a produção dos sistemas poliméricos.

7.1 Determinação de peso

A homogeneidade de massa para dispositivos sólidos é determinada, quando prevista, utilizando o teste de determinação de peso descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019). Contudo, os dispositivos produzidos neste trabalho não se enquadram em nenhuma das formas farmacêuticas apresentadas para este teste. Dessa forma, com o intuito de submeter o dispositivo desenvolvido a uma condição estabelecida por um compêndio oficial, utilizamos como referência de determinação da homogeneidade de peso, os parâmetros descritos anteriormente (item 5.2.2). Neste caso, os limites de variação são de $\pm 10\%$ em relação ao peso médio das amostras testadas. Assim, é possível observar na Tabela 15 os pesos dos dispositivos obtidos bem como suas variações unitárias, em porcentagem, em relação a estes pesos médios.

Tabela 15- Resultados encontrados para determinação de peso para os dispositivos desenvolvidos com uma, duas e três camadas.

Amostra	Peso (mg)			Desvio em função do peso médio (%)		
	Monocamada	Bicamada	Tricamada	Monocamada	Bicamada	Tricamada
1	1,79	3,72	5,08	1,6	4,2	5,2
2	1,74	3,64	5,05	4,4	2,0	4,6
3	1,86	3,47	4,84	2,2	2,8	0,2
4	1,86	3,5	4,96	2,2	2,0	2,7
5	1,71	3,7	4,84	6,0	3,6	0,2
6	1,86	3,72	4,66	2,2	4,2	3,5
7	1,79	3,38	5,14	1,6	5,3	6,4
8	1,77	3,42	5,13	2,7	4,2	6,2
9	1,76	3,48	4,83	3,3	2,5	0,0
10	1,78	3,52	4,98	2,2	1,4	3,1
11	1,87	3,72	4,74	2,7	4,2	1,9
12	1,81	3,64	5,05	0,5	2,0	4,6
13	1,78	3,47	4,48	2,2	2,8	7,2
14	1,88	3,5	4,82	3,3	2,0	0,2
15	1,89	3,7	4,8	3,8	3,6	0,6
16	1,83	3,72	4,71	0,5	4,2	2,5
17	1,83	3,48	4,44	0,5	2,5	8,1
18	1,95	3,42	5,14	7,1	4,2	6,4
19	1,94	3,48	4,45	6,6	2,5	7,9
20	1,69	3,72	4,51	7,1	4,2	6,6
Peso Médio	1,82	3,57	4,83			

Como pode ser observado na Tabela 15, os pesos médios encontrados para os dispositivos foram de 1,52; 3,57 e 4,83 mg respectivamente referindo-se aos dispositivos mono, bi e tricamadas.

Para os dispositivos monocamadas, o menor desvio em relação ao peso médio foi de 0,5 % para as amostras 12, 16 e 17 e o maior desvio foi de 7,1 % para as amostras 18 e 20. Em todas as 20 amostras testadas não foi possível observar variação superior a ± 10 % em relação ao peso médio. Este resultado demonstra que os dispositivos apresentam uniformidade de massa e estão em acordo com o limite descrito na Farmacopeia Brasileira e utilizado neste trabalho com o mesmo fim daquele utilizado para verificação de uniformidade de massa em dispositivos sólidos.

Resultado semelhante, em relação à aprovação da uniformidade de massa, foi possível verificar para os dispositivos de duas e três camadas. É possível observar na tabela 15 que os dispositivos bicamadas apresentaram o menor valor de desvio em relação ao peso médio para a amostra 14 (1,4 %) e maior valor de desvio para a amostra 7 (5,3 %). Nos dispositivos tricamadas o menor valor foi da amostra 9 (sem variação em relação ao peso médio) e o maior valor foi para a amostra 17 (8,1 %). Portanto, os dispositivos de duas e três camadas também apresentaram uniformidade de massa.

Por outro lado, a uniformidade de conteúdo, requerida para verificar se há uma homogeneidade na distribuição do princípio ativo nestes dispositivos pode conduzir a um resultado não conforme caso, apesar de ter homogeneidade de massa, a homogeneidade do ativo não seja detectada. Assim, foi realizado o teste de uniformidade de conteúdo e os resultados deste teste estão apresentados no item 5.3.8.

Após verificação de que os insertes foram adequados em relação a este parâmetro farmacopeico para formas farmacêuticas sólidas, as demais caracterizações puderam ser realizadas a fim de determinar as demais propriedades físicas e químicas dos insertes produzidos.

7.2 Porcentagem de hidratação (intumescimento)

O teste de intumescimento é feito para medir a hidratação do sistema desenvolvido mediante o influxo de água do meio externo para o interior desta estrutura e verificar se o dispositivo mantém ou não sua integridade física. A quantidade de água que entra no sistema é proporcional a capacidade deste em interagir, por intermédio de interações do tipo ligação de hidrogênio entre o solvente e a rede polimérica. Assim, caso se tenha em um dispositivo uma rede polimérica muito bem estabelecida, coesa, forte, haverá menos influxo para o interior do dispositivo. O contrário pode acontecer caso a rede polimérica apresente características fracas para sua manutenção (HERMANS *et al.*, 2014).

Esta avaliação pode estar relacionada, também, à biodeasão ou mucoadesão do inserte, que interfere na liberação dos fármacos (VOLOD'KO *et al.*, 2021). Neste sentido, tem-se que a hidratação dos polímeros é a razão do relaxamento e interpenetração dos polímeros perante o contato com a mucina, principal proteína presente na camada de muco em todas as mucosas do corpo, inclusive a ocular. Formas mais hidratadas favorecem à esta interposição de cadeias e contribuem para aumentar as interações ocasionando uma maior mucoadesão (VOLOD'KO *et al.*, 2021). Por outro lado, um excesso desta hidratação (super-hidratação) pode resultar em uma diminuição das propriedades de mucoadesão devido à formação de mucilagem, o que impede a interpenetração entre o polímero e a mucina devido à diluição do sistema polímero/proteína (KARKI *et al.*, 2016).

Como dito anteriormente, além da dificuldade de adesão, este teste também é feito para verificar a estabilidade física do inserte mediante submissão a condição drástica de hidratação. Assim, caso haja uma extensa hidratação, o inserte pode perder sua integridade estrutural e quebrar. Esta quebra pode conduzir a um aumento da liberação do fármaco ou até mesmo sua saída do local de aplicação de forma precoce (VOLOD'KO *et al.*, 2021).

A quitosana é um polímero mucoadesivo capaz de produzir, em determinadas condições, insertes resistentes. Estes polímeros são compostos de redes hidrofílicas que contêm múltiplos grupos funcionais. Eles interagem com o muco não apenas por meio de emaranhados físicos, mas também por meio de interações químicas secundárias, resultando em redes fracamente reticuladas (VOLOD'KO *et al.*, 2021).

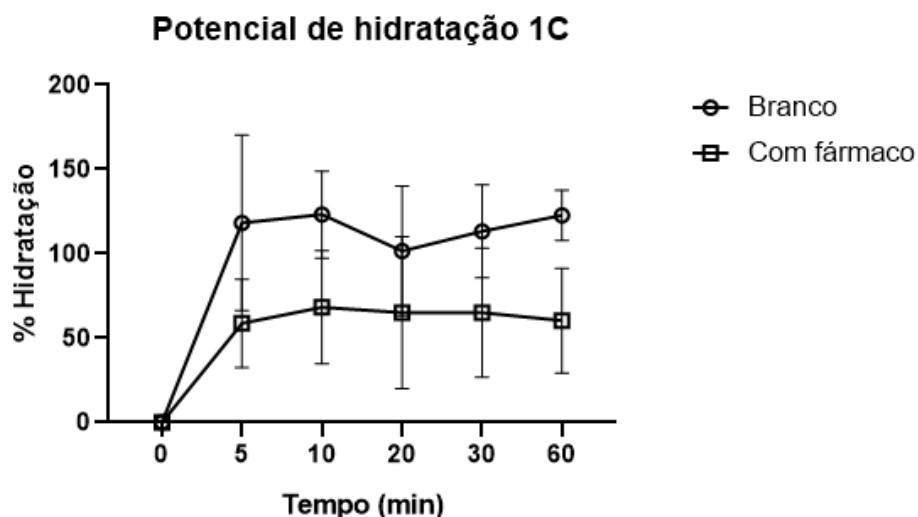
Ademais, tem-se que os insertes à base de quitosana possuem alta capacidade de intumescimento devido à natureza hidrofílica do polímero. Grupos hidroxila e amino

presentes em sua estrutura têm a capacidade de interagir com moléculas de água (HERMANS *et al.*, 2014).

Além das características mencionadas anteriormente dos insertes poliméricos, esta verificação pode sugerir, também, se houve ou não interação entre o polímero e os fármacos acarretando maior, menor ou nenhuma modificação na capacidade de intumescimento.

As propriedades de intumescimento dos insertes foram avaliadas por intermédio da determinação da porcentagem de hidratação para cada um dos dispositivos desenvolvidos, de uma, duas e três camadas. Os resultados obtidos para a porcentagem de hidratação dos insertes estão apresentados nos gráficos 1, 2 e 3.

Gráfico 1- Potencial de hidratação dos insertes brancos monocamada e dos insertes monocamada contendo os fármacos bimatoprost e maleato de timolol

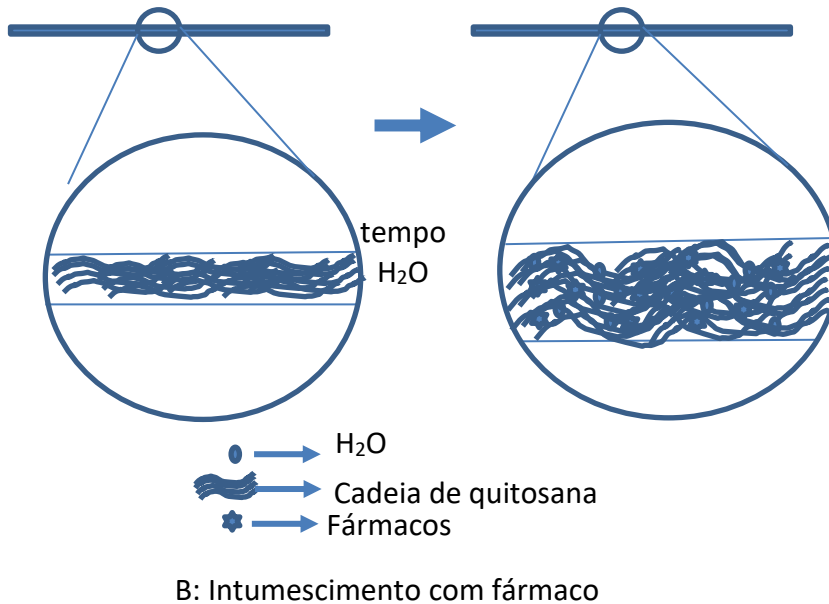
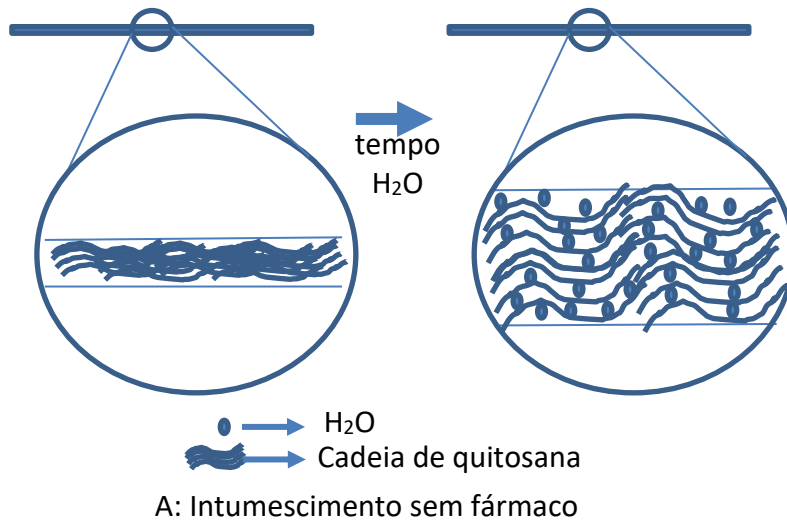


No gráfico 1, observa-se a capacidade de intumescimento ou absorção de água em função do tempo para os insertes monocamadas com e sem fármacos. Os insertes sem fármaco tiveram uma absorção de água muito mais efetiva, em torno de 120 %, quando comparado com a absorção de água dos insertes com fármaco, em torno de 60 %. Esta diferença pode ser atribuída ao aumento das interações intermoleculares entre os fármacos bimatoprost e maleato de timolol com o polímero quitosana fazendo com que a rede polimérica, na presença destas substâncias, fique mais forte, o que dificulta um influxo maior para o interior do dispositivo (Figura 25). Quando o número de ligações de hidrogênio e a força entre os polímeros aumentam, a difusão

das partículas de água na matriz hidratada ocorre a uma taxa lenta (KARKI *et al.*, 2016).

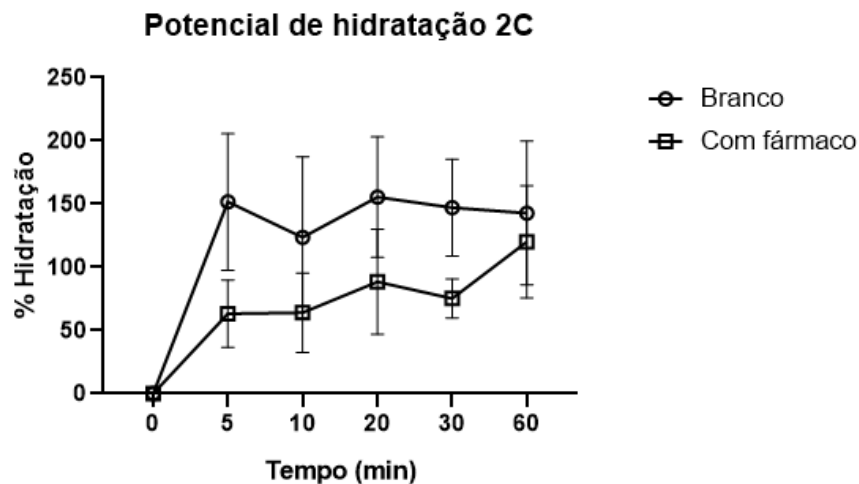
Este dado está em acordo com o descrito por Franca e colaboradores (2014) que descreve em seu estudo que as inserções oculares contendo o fármaco bimatoprost diminui a absorção de água quando comparado a inserção sem o fármaco. Hermans e seus colaboradores (2014), também relatou em seu estudo que insertes de quitosana carregados com fármaco apresentaram menor absorção de água quando comparado a um inserte sem o fármaco. Isso pode ser devido à formação de ligações de hidrogênio entre os fármacos e a matriz polimérica (KARKI *et al.*, 2016).

Figura 25- Esquema proposto de absorção de água pelo inserte em condições sem fármacos (A) e com fármacos (B)



No gráfico 2, pode-se observar, também, as capacidades de hidratação dos insertes de duas camadas em função do tempo.

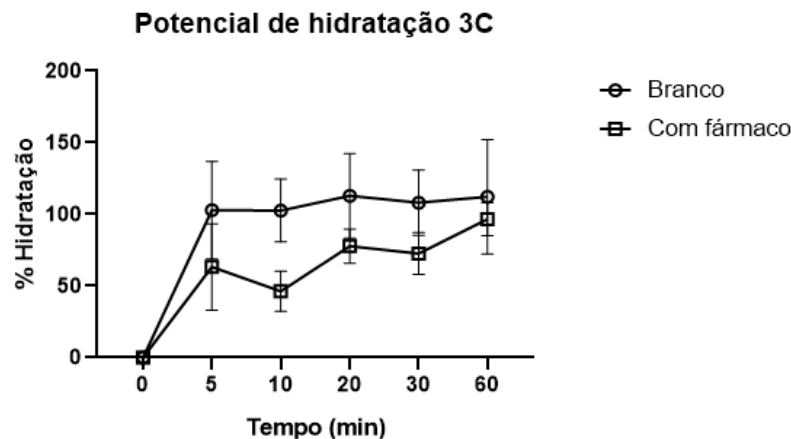
Gráfico 2- Potencial de hidratação dos insertes brancos bicamada e dos insertes bicamada contendo os fármacos bimatoprost e maleato de timolol



Analogamente aos insertes de uma camada, foram observados valores de absorção de água naquele com fármaco inferiores aos valores encontrados para os insertes sem fármaco. Neste caso, além da justificativa relacionada à presença do fármaco no inserte, o que aumenta as interações intermoleculares na rede do polímero quitosana, há também a possibilidade desta interação ter sido mais efetiva devido à presença da segunda camada com quitosana puro. Neste caso, uma hipótese para o evento, é a migração de parte do fármaco para o interior da primeira camada de polímero colocada anteriormente àquela com fármaco. Este dado é inovador na literatura e ainda não foi possível encontrar algum dispositivo que se comporte de forma semelhante ao que encontramos em nossos resultados.

Assim como com os outros dispositivos, observa-se no gráfico 3 um influxo menor de água para o dispositivo com fármaco em relação ao dispositivo branco. Porém, foi possível observar que apesar deste influxo ser menor, ele foi, proporcional aos demais, de intensidade relativamente inferior.

Gráfico 3- Potencial de hidratação dos insertes brancos tricamada e dos insertes tricamada contendo os fármacos bimatoprost e maleato de timolol



Neste caso, a presença de insertes brancos na parte superior e inferior do inserte com fármacos pode ter contribuído para um maior influxo de água no inserte com fármacos. Estes dados, também são inéditos e junto com o restante do trabalho podem contribuir para a literatura com um melhor entendimento sobre a hidratação de insertes com e sem fármacos hidrofílicos em filmes de quitosana com mais de uma camada.

Pode-se concluir, como observado, que todos os insertes se hidrataram muito rapidamente, atingindo mais de 50% de hidratação após 5 minutos. Em comparação aos dispositivos sem os fármacos os dispositivos contendo maleato de timolol e bimatoprost apresentaram uma porcentagem de hidratação muito menor. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados na literatura (FRANCA *et al.*, 2014; HERMANS *et al.*, 2014; KARKI *et al.*, 2016), que apresentaram dispositivos carregados com fármaco tendo menor absorção de água quando comparados dispositivos sem estas substâncias.

A importância desta elucidação está no fato de que o estado de intumescimento dos polímeros em função do tempo contribui para o seu comportamento mucoadesivo. Esta propriedade é iniciada pela hidratação, o que garante o sucesso da aplicação e a permanência da forma farmacêutica. Dessa forma, tem-se que a hidratação dos insertes poliméricos resulta em uma camada de gel hidratada permitindo o relaxamento das moléculas. Assim, seus grupos funcionais que realizam interações por ligações de hidrogênio são expostos e a interpenetração entre as moléculas da camada de muco é facilitada (HERMANS *et al.*, 2014).

Como dito previamente, além de avaliar o comportamento de intumescimento dos insertes, é importante também avaliar suas integridades físicas, de forma visual, dos

mesmos durante o teste de hidratação, para garantir que não haverá perda dos fármacos, por quebra do dispositivo, e problemas na aplicação e permanência dos insertes. Assim como no estudo de Franca (2014), durante a realização do teste, a integridade dos insertes testados não foi perdida tendo, para todos os insertes testados, sua estrutura física mantida, sem rachaduras ou rupturas.

7.3 pH de superfície

Quando se trata de formulações para aplicação tópica, a determinação de seu pH se torna relevante, pois pode ocorrer efeitos colaterais relacionados com irritação local, como a hiperemia. Neste contexto, o pH da lágrima é de aproximadamente 7,4, podendo o olho tolerar formulações cujo o pH varia entre 3,0 e 8,6, dependendo da capacidade de resistir às variações de íons ácidos e básicos da preparação. Além disso, é necessária outra frente de racionalização, uma vez que o valor de pH da formulação deve ser aquele em que a substância ativa é mais estável (IRIMIA, 2018).

Os valores médios mensurados para o pH de superfície dos dispositivos estão apresentados na Tabela 16. A avaliação foi realizada em triplicata e não houve desvio entre os resultados encontrados. Como esperado, o pH de superfície para os dispositivos foi ácido, devido à presença de ácido acético utilizado no processo de preparo dos insertes. Com estes dados, demonstrou-se que os valores de pH obtidos são suficientes para não provocar irritação ocular.

Tabela 16- Valores médios de determinação do pH de superfície para os dispositivos desenvolvidos

Dispositivos (n=3)	pH na superfície dos insertes \pm D.P.R.		
	Monocamada	Bicamada	Tricamada
Branco	5,0 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0
Com fármaco	5,0 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0

Dentre as variáveis as quais dependem o valor determinado para o pH dos insertes, tem-se em sua grande maioria o seu processo produtivo. Como neste caso o processo envolveu a adição de ácido acético, houve um valor de pH correspondente à faixa ácida. É possível encontrar na literatura, outros tipos de dispositivos que também foram feitos na forma de insertes, mas que apresentam valores diferentes quando comparados aos elaborados neste trabalho.

Zhao e seus colaboradores (2017), desenvolveram nanopartículas carregadas com maleato de timolol utilizando como polímero a quitosana (TM-CS-NP) e quitosana galactosilada (TM-GC-NP). O valor de pH do colírio maleato de timolol comercial foi de $6,57 \pm 0,12$. O pH das soluções TM-GC-NP e TM-CS-NP foi de $6,05 \pm 0,18$ e $4,63 \pm 0,23$, respectivamente. Ambos os resultados encontrados para o pH destas preparações encontram-se na faixa ácida da escala de pH.

Taghe e colaboradores (2020) também relatam valores de pH, neste trabalho para insertes com hidroxipiroilmetilcelulose e com hidroxietilcelulose, de 6,6 e 6,8, respectivamente. Ambos os valores determinados, também na faixa ácida de pH, não contribuíram para irritação ocular quando testados em coelhos.

Em adição, nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido diversos dispositivos com este mesmo polímero e método de fabricação sem apresentar irritação quando testado em animais (CESAR *et al.*, 2019) ou humanos (RUBIÃO *et al.*, 2021) como hiperemia ou qualquer outro tipo de sinal relacionado à irritação ocular.

7.4 Espectrometria de na região do infravermelho

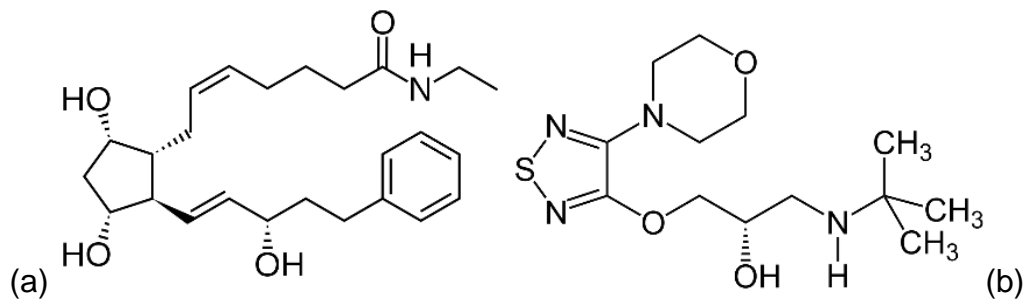
A espectrofotometria de absorção na região do infravermelho é um ensaio de identificação por excelência, sendo capaz de diferenciar substâncias com diferenças estruturais. Das três regiões do infravermelho (próximo, médio e distante), a região compreendida entre 4000 a 400 cm^{-1} (infravermelho médio) é a mais empregada para fins de identificação (BRASIL, 2019).

Quase todos os compostos com ligações covalentes, orgânicas ou inorgânicas, absorvem várias frequências da radiação eletromagnética na região infravermelha do espectro eletromagnético. A espectrometria de absorção na região do infravermelho (IV) é uma técnica relativamente simples, rápida, não destrutiva, com alta precisão, e requer uma mínima preparação de amostra (WOOD *et al.*, 1998). A radiação nesta faixa de energia corresponde à faixa que abrange as frequências vibracionais de alongamento e flexão das ligações (MOVASAGHI *et al.*, 2008; DAWAR *et al.*, 2010).

A utilização desta técnica permite a identificação de possíveis interações entre as substâncias que compõe a formulação proposta como inserte. Os fármacos utilizados neste trabalho, a bimatoprost e o maleato de timolol, apresentam grupos funcionais

capazes de interagir com a matriz polimérica do quitosana por intermédio de seus grupos químicos polares (figura 26).

Figura 26- Bimatoprost (a) e timolol (b) com grupos capazes de formar interações por ligações de hidrogênio



Assim, espectros na região do infravermelho foram obtidos para todos os dispositivos desenvolvidos neste trabalho com o intuito de verificar se houve ou não interações entre os fármacos e o polímero utilizado para formação do filme, e se estas interações são passíveis de serem detectadas por esta técnica. Além disso, pode-se verificar, também se houve ou não incompatibilidades entre o polímero e os fármacos.

Em estudos prévios de nosso grupo realizados por Franca e colaboradores, foi possível adquirir espectros de uma camada tanto para insertes feitos com bimatoprost quanto com timolol utilizando o mesmo polímero quitosana. Não havíamos feito, ainda, espectros com uma camada com os dois fármacos juntos. Porém, após sua realização, não foi possível identificar nenhuma diferença entre os espectros já adquiridos por Franca anteriormente e os feitos neste trabalho.

Assim, optamos por relatar os espectros obtidos pelos filmes de duas e três camadas, somente.

Nas Figuras 27 e 28, estão representados os espectros de absorção na região do infravermelho dos insertes brancos e dos insertes contendo o fármaco com duas e três camadas, respectivamente.

Figura 27- Espectros de absorção da região do infravermelho de (a) insertes bicamada contendo os fármacos maleato de timolol e bimatoprost e (b) insertes brancos bicamada

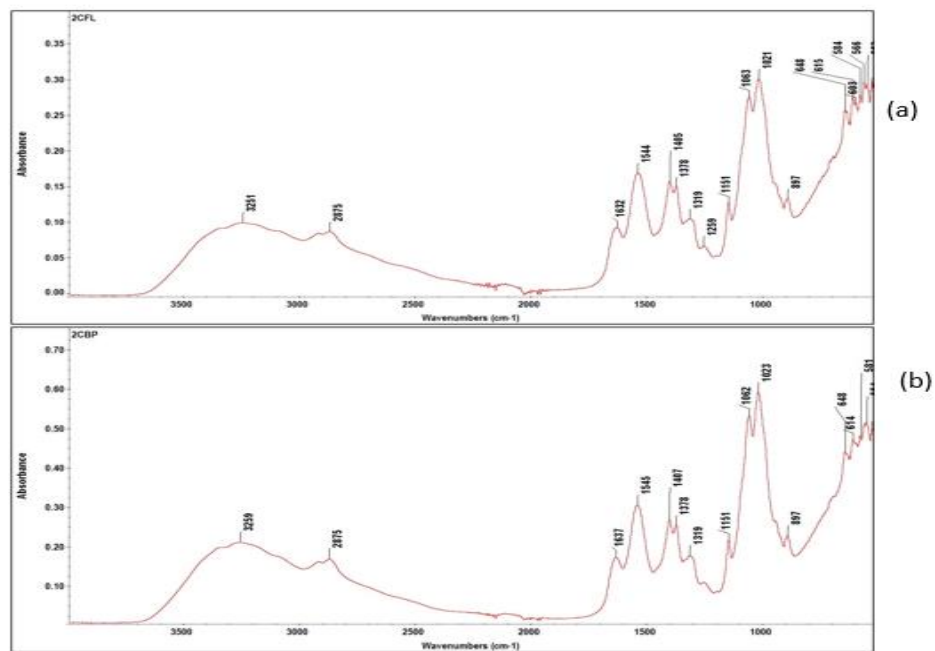
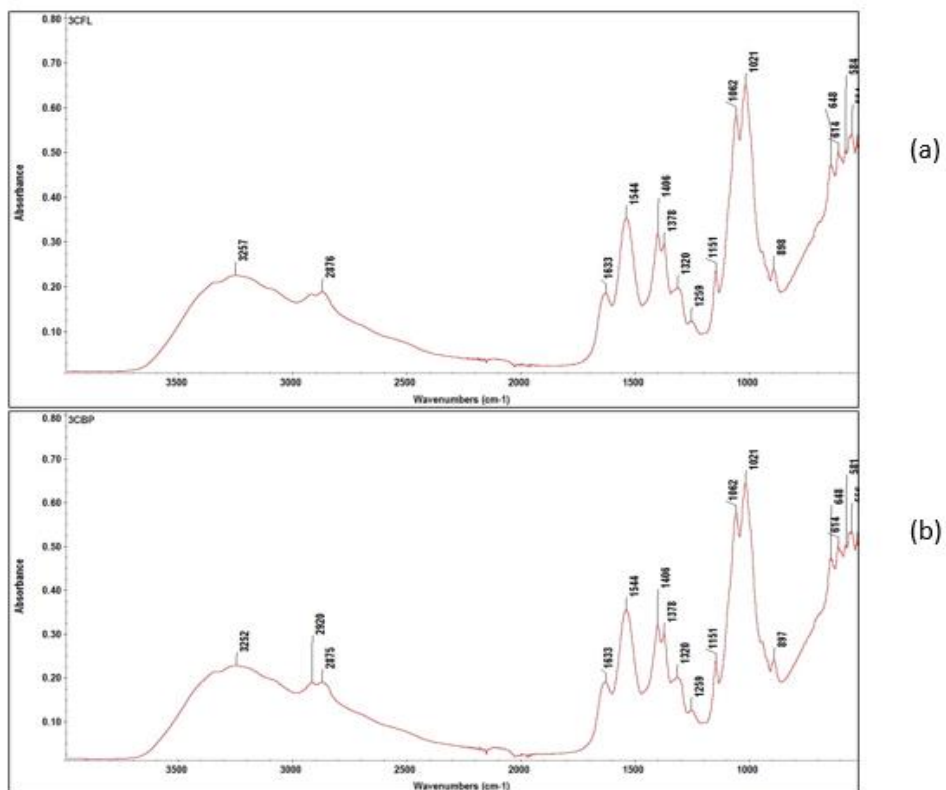


Figura 28- Espectros de absorção da região do infravermelho de (a) insertes tricamada contendo os fármacos maleato de timolol e bimatoprost e (b) insertes brancos tricamada



Como pode ser observado, nos dois espectros dos insertes brancos (figuras 27b e 28b), as bandas de absorção características do polímero quitosana (banda I de amida (C=O) entre 1632 e 1637 cm^{-1} ; sobreposição de banda II de amida e vibração de N-H

de amina, entre 1544 e 1545 cm^{-1} , sobreposição de bandas de estiramento de O-H e N-H entre 3251 e 3257 cm^{-1}), se mantiveram inalteradas.

Para os espectros contendo os fármacos maleato de timolol e bimatoprosta (figuras 27a e 28a) também não foi possível observar nenhuma modificação em relação aos espectros dos insertes brancos. Neste caso, bandas características dos fármacos também não foram observadas. Estes resultados podem ser explicados em função da baixa concentração dos fármacos nos dispositivos produzidos (FOUREAUX *et al.*, 2015; FRANCA *et al.*, 2014).

Por outro lado, é possível observar uma modificação no padrão de largura e intensidade das bandas na região de 3500 a 3000, região características de absorção de grupos capazes de exercer interações inter e intramoleculares por ligações de hidrogênio, como as aminas e as hidroxilas. Ambos grupos estão presentes na estrutura do quitosana sendo possíveis de realizar estas interações com os grupos funcionais dos fármacos testados. O bimatoprosta (Figura 26a) apresenta grupos amida e hidroxila em sua estrutura e o timolol (Figura 26b), apresenta tanto grupos amina, quanto hidroxila além de grupos éteres, capazes de realizar, também, estas interações intermoleculares.

Assim, apesar de não poder identificar bandas características dos fármacos no espectro determinado na região do infravermelho, a mudança do perfil das bandas na região de 3500 até 3000, com um ligeiro alargamento e diminuição de intensidade das mesmas é um indicativo de que pode estar ocorrendo um incremento nas interações por ligação de hidrogênio no core polimérico. Estes resultados, observados em todos os espectros relacionados aos insertes de quitosana de uma, duas e três camadas estão em acordo com os dados encontrados relacionados ao potencial de hidratação, onde houve um menor influxo de água nos insertes com a presença dos fármacos.

Hermans e seus colaboradores (2016) também detectaram mudanças na posição e formas das bandas em função da ligação de hidrogênio. O estudo mostrou que o deslocamento da frequência de estiramento C=O era mais pronunciada na presença de Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD). Este resultado indica ligações de hidrogênio entre quitosana e grupos hidroxila de HP- β -CD em vez da formação de ligações de hidrogênio intercadeias ou ligações de hidrogênio com glicerol. Além disso, a comparação dos espectros de FTIR revelou mudanças na posição e forma das bandas de absorção correspondentes aos grupos O-H/N-H ligados por hidrogênio

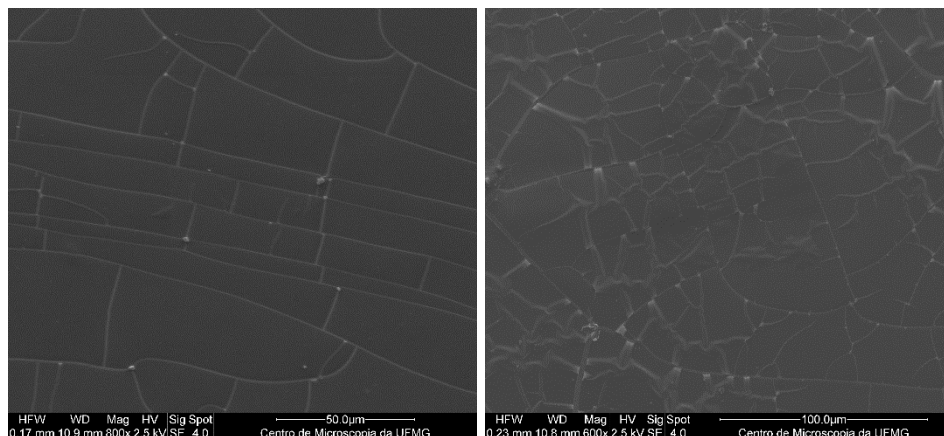
inter e intramolecular, o que pode ser atribuído à reorganização das ligações de hidrogênio devido à adição de plastificante e quitosana interações /ciclodextrina.

7.5 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica usada para estudar as superfícies dos materiais poliméricos tais como, plásticos, insertes, membranas, fibras e compósitos. O MEV é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. O princípio de um microscópio eletrônico de varredura consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007; GOLDSTEIN *et al.*, 2017).

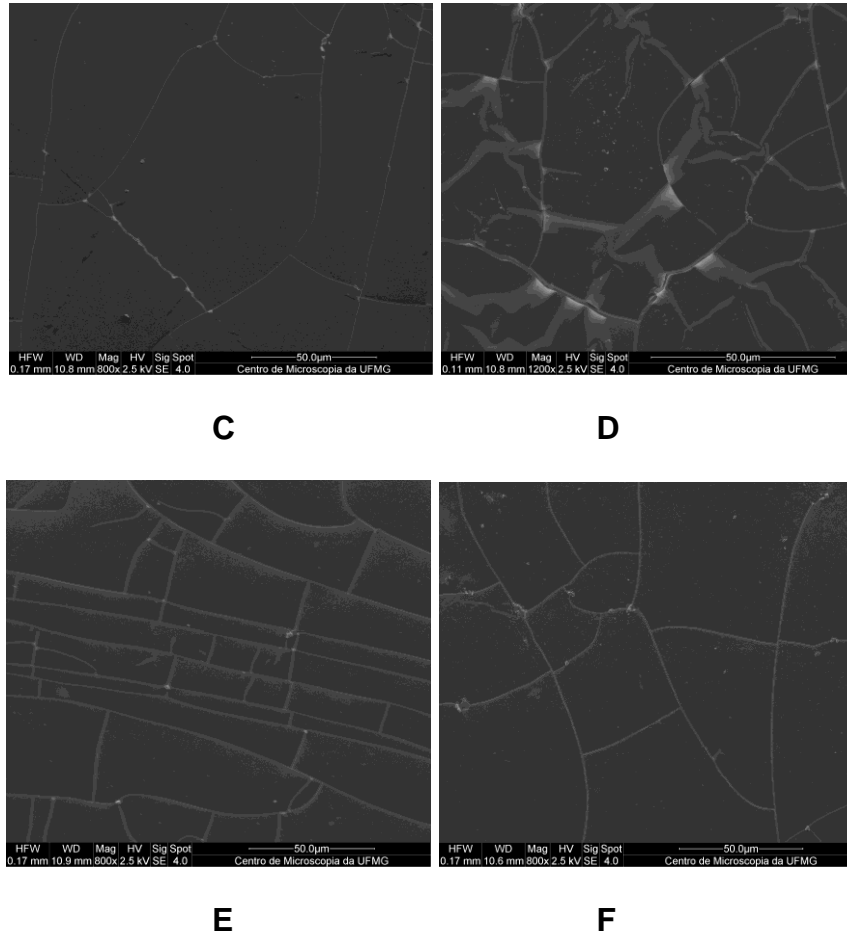
A caracterização morfológica dos insertes foi realizada por MEV. As micrografias eletrônicas de varredura obtidas para os dispositivos desenvolvidos estão apresentadas nas Figuras 29 e 30.

Figura 29- Micrografias eletrônicas de varredura da superfície dos insertes: monocamada (sem fármaco A e com fármaco B); bicamada (sem fármaco C e com fármaco D) e tricamada (sem fármaco E e com fármaco F)



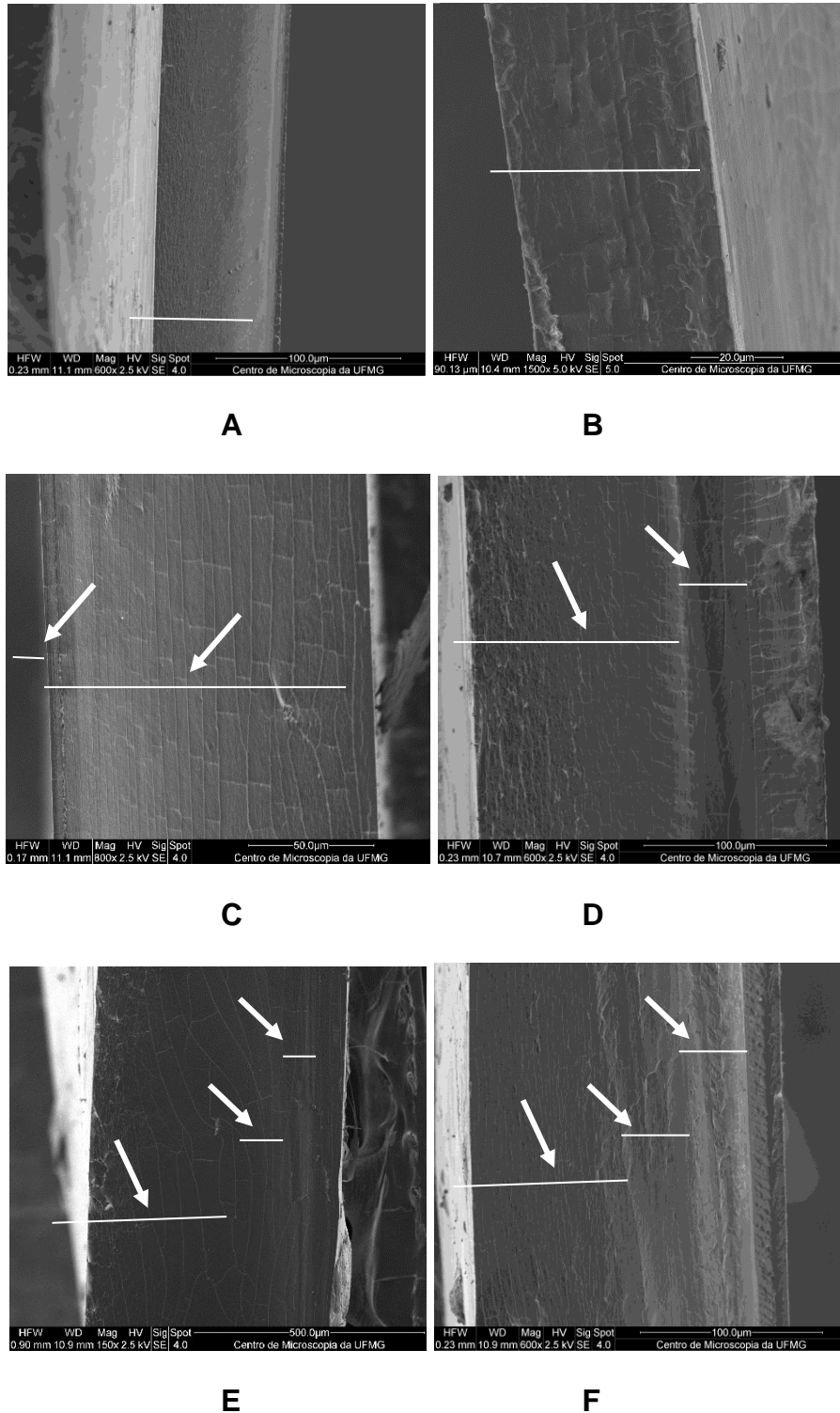
A

B



As micrografias constantes da figura 29 estão relacionadas ao corte de superfície dos insertes mono, di e tricamadas sem e com fármacos. Nestas, é possível observar que todas as superfícies se apresentam regulares, lisas e sem presença de sólidos. A ausência de sólidos é um indicativo de que os fármacos ficaram molecularmente dispersos na matriz polimérica. Este resultado é compatível com uma liberação não imediata do conteúdo dos fármacos utilizados no trabalho, conforme dado obtido de liberação *in vitro* apresentado no item 5.3.8. Em contrapartida, o aspecto craquelado observado é proveniente do revestimento de carbono utilizado sobre as amostras para melhorar a visualização do material com o aumento de voltagem durante a análise. O não revestimento poderia comprometer a superfície do inserte ocasionando furos na mesma e impossibilitando a aquisição de micrografias de MEV sem imperfeições.

Figura 30- Micrografias eletrônicas de varredura de corte lateral criogênico dos insertes: monocamada (sem fármaco A e com fármaco B); bicamada (sem fármaco C e com fármaco D) e tricamada (sem fármaco E e com fármaco F).



Por outro lado, na figura 30 é possível observar cortes criogênicos laterais para os insertes. Esses cortes possibilitam uma análise da superfície do interior dos dispositivos produzidos. Assim como nos cortes de superfície apresentados na figura

24, os cortes laterais não apresentam sólidos, corroborando a tese de que os fármacos estão dispersos molecularmente na estrutura do polímero. Ainda é possível identificar as camadas de cada um dos dispositivos (marcados com linhas e setas brancas na figura 25). Assim, na figura **30 A** e **B** é possível identificar somente uma camada do inserte. Na figura **30 C** e **D** é possível identificar duas camadas, sendo uma delas mais fina do que a outra. A existência de duas camadas de espessura diferente está relacionada ao processo produtivo em que após a secagem da primeira camada, há um maior empacotamento desta por pressão exercida pelas camadas adicionadas subsequentemente. Camadas mais espessas também é visualizado na figura **30 E** e **F**, de três camadas.

A existência destas camadas também foi confirmada analisando as curvas de DSC utilizadas para caracterizar os insertes e estão em acordo com estes dados de microscopia eletrônica.

7.6 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria

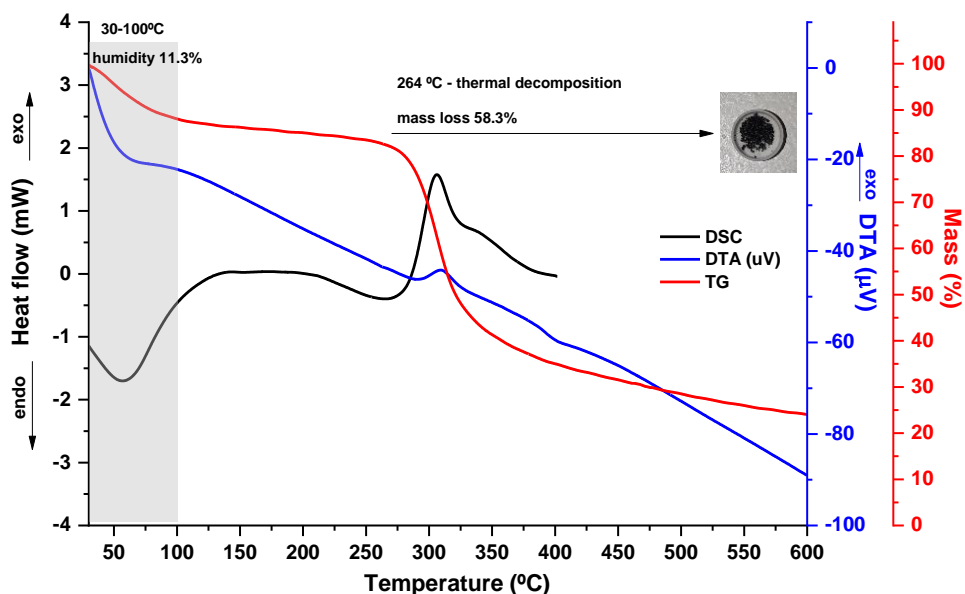
A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica que mede a variação na diferença de fluxo de calor de uma amostra e de uma referência enquanto eles são submetidos a um programa de temperatura controlada. Tem-se que a técnica é um método possível para determinar a modificação estrutural das moléculas de uma substância quando a ela se associa a outras substâncias, bem como eventos térmicos relacionados à estrutura da linha cristalina dos componentes da formulação (por exemplo, fusão), e aqueles relacionados à sua integridade térmica (decomposição) (CESAR *et al.*, 2019). Somado a isto, tem-se que é uma das abordagens mais eficazes para estudar a interação física entre drogas e matriz de uma mistura (ZHAO *et al.*, 2017).

Sob outra dialética, é necessário salientar que a DSC é uma ferramenta que indica uma interação entre os componentes de um sistema/complexo. Esta percepção, por sua vez, ocorre com vários parâmetros, exemplificados pela eliminação de picos endotérmicos, aparecimento de novos picos, mudança de pico, forma e seu início, temperatura de pico, ponto de fusão e área de pico relativa ou entalpia (CARRETTI *et al.*, 2022).

Os diferentes sistemas poliméricos foram submetidos a esta técnica com vistas a caracterizar os mesmos com relação aos eventos térmicos existentes nos insertes. Os resultados foram organizados em gráfico único, para cada amostra. As curvas de DSC (à esquerda, preto) e TG (à direita, vermelho) /DTA (à direita, azul) estão sobrepostas para adequada visualização dos fenômenos térmicos. Para cada amostra foram inseridas em detalhe, após as curvas de aquecimento correspondentes, fotos ilustrativas do aspecto das amostras diante do respectivo tratamento térmico. Para as curvas DSC relativas ao 2º aquecimento (segunda corrida térmica), não foi possível registrar a foto pois a análise foi feita em cadinho fechado.

A Figura 31 apresenta o comportamento térmico da quitosana. É possível identificar tanto na curva de DSC quanto de DTA, um pico exotérmico em aproximadamente 264°C sendo relacionada à degradação da cadeia principal da quitosana (FRANCA *et al.*, 2014). Estas curvas são acompanhadas pela perda de massa de aproximadamente 58,3 % registrada no termograma (linha em vermelho).

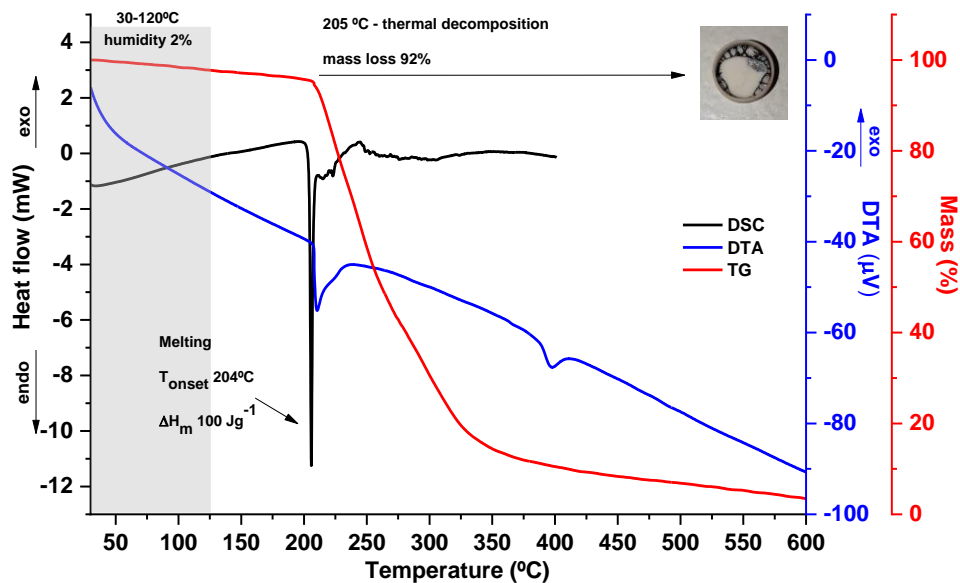
Figura 31- Comportamento térmico da quitosana.



Em adição, é possível identificar tanto na curva de DSC quanto na de DTA que entre as temperaturas de 30 e 100°C há evento térmico endotérmico relacionado à perda de água, comum em sistemas poliméricos hidrofílicos. Este evento térmico de desidratação é acompanhado da perda de 11,3 % de massa registrada no termograma (linha vermelha).

Na Figura 32, é possível verificar o termograma do maleato de timolol. Neste termograma, observam-se um evento térmico em 204°C no DSC e um evento térmico em 205°C no DTA relativos à fusão do maleato de timolol. Ambos os eventos registrados são acompanhados do registro da perda de massa da ordem de 92%. O segundo evento térmico na curva de DTA em aproximadamente 400° pode estar relacionado à decomposição do maleato de timolol

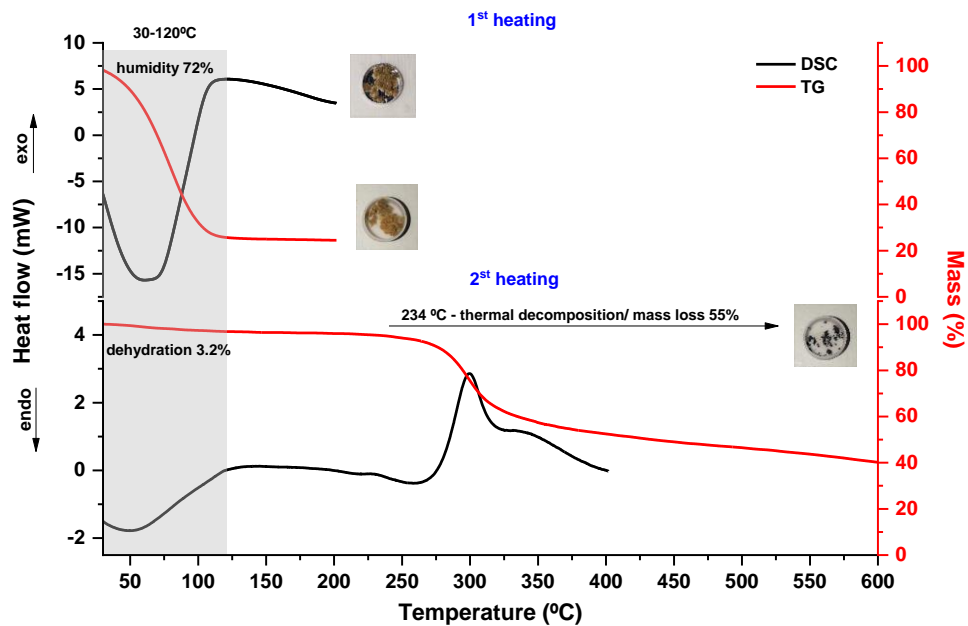
Figura 32- Comportamento térmico maleato de timolol.



A análise DSC dos componentes puros e suas misturas ajudaram a investigar as interações entre a droga e os polímeros (NEUFELD, BIANCO-PELED, 2017). Portanto, foi feito, a fim de determinar eventuais interações existentes entre os excipientes utilizados no desenvolvimento do inserte, o termograma da mistura física entre o timolol, o corante e o polímero quitosana.

Neste experimento, pode-se observar na Figura 33 que foram feitas duas corridas, sendo a primeira de 0 a 200°C para eliminação de água da mistura. Esta eliminação é feita para impedir que a presença da mesma possa atrapalhar a análise de algum resultado importante durante a leitura do termograma. É possível identificar nesta corrida, um comportamento semelhante à do quitosana puro. Com o processo de decomposição térmica do polímero sendo predominante em relação aos demais eventos térmicos.

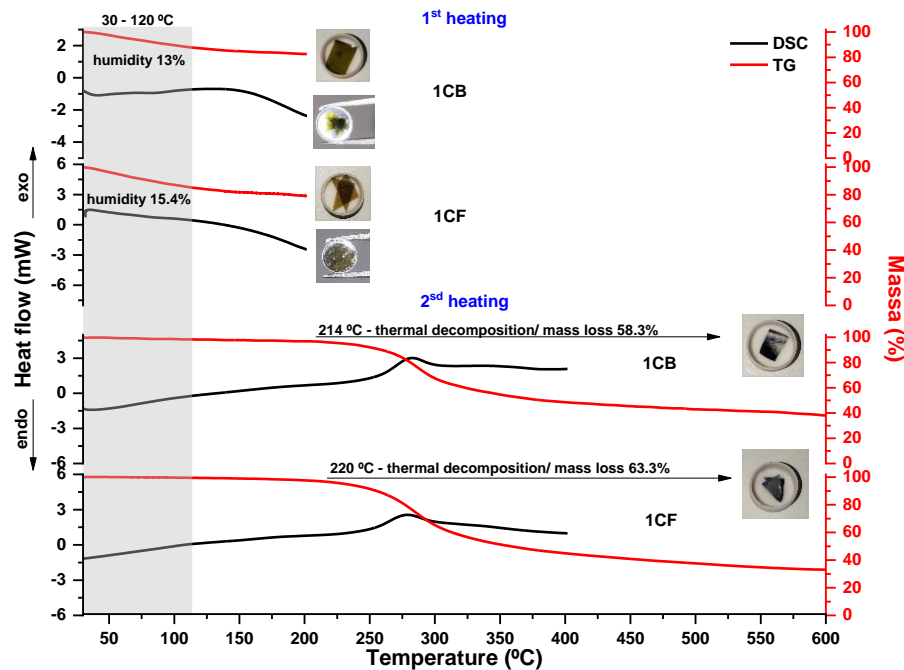
Figura 33- Comportamento térmico da mistura física lissamina:quitosana:timolol:água.



Nas Figuras 34 a 36, estão apresentados os comportamentos térmicos dos insertes sem os fármacos (CB) e dos insertes com os fármacos maleato de timolol e bimatoprost (CF), os resultados se referem aos insertes de 1 camada, 2 camadas e 3 camadas, respectivamente.

Assim, nos termogramas apresentados na Figura 34, foi possível observar na primeira parte do termograma, para ambos insertes com e sem fármacos, as curvas provenientes da primeira corrida térmica foi feita para eliminação de eventual presença de água. Este evento foi registrado a partir de 30° até 120°C em ambos os insertes e é condizente com a perda de água residual por evaporação nos insertes e estão de acordo com os descritos na literatura (FRANCA *et al.*, 2014; CESAR *et al.*, 2019).

Figura 34- Comportamento térmico das amostras 1 CB e 1 CF.



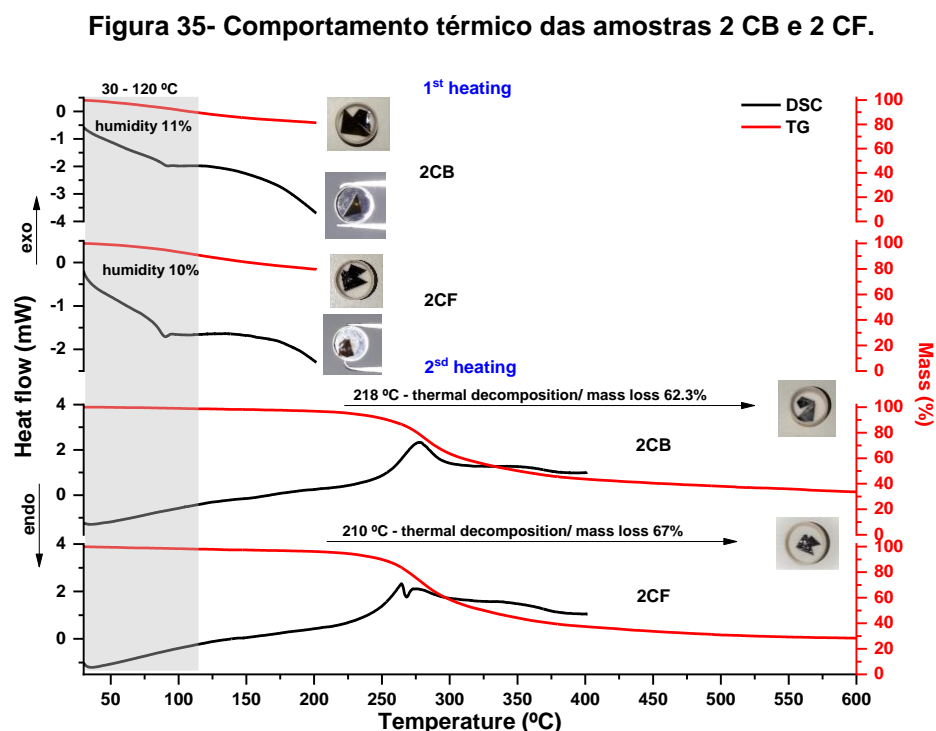
Por outro lado, é possível observar que há um evento térmico, registrado como sendo de decomposição térmica iniciando em 214 °C com perda de massa de 58,3% para o inserte branco, sem fármaco e um evento térmico semelhante para o inserte com os dois fármacos, porém iniciando em 220°C. Esta diferença de 6 °C pode ser atribuída a um maior arranjo, ou aumento de interações químicas, nas cadeias do polímero no termograma dos insertes com fármacos. Estes dados corroboram com os dados obtidos na técnica de espectrometria no infravermelho e também no teste de intumescimento dos insertes. Neste caso, pode-se justificar este dado pela maior eficiência nas interações intermoleculares do polímero sendo aumentadas pela presença dos fármacos na estrutura do inserte.

Outra observação que pode ser relatada é em relação ao polímero quitosana puro, termograma apresentado na Figura 31. Neste caso, a temperatura de decomposição é muito maior pois o polímero estava na forma cristalina, o que é diferente do polímero quando está disperso na forma de um inserte polimérico. No primeiro caso, as interações no retículo cristalino são maiores do que a observada no inserte ocasionando uma temperatura maior para romper esta estrutura.

Ainda em relação à Figura 35, não é possível visualizar o pico de um dos fármacos utilizados na forma sólida, o maleato de timolol, pois o mesmo encontra-se em

quantidade que não é possível detectá-lo pela técnica ou está totalmente disperso na forma molecular.

Nos termogramas referentes aos insertes de duas camadas (Figura 35) e aos insertes de 3 camadas (Figura 36), foi possível observar que os insertes com fármaco apresentaram diminuição do pico exotérmico que foi detectado a temperatura inferior a 300°C, permitindo inferir que a presença do fármaco no inserte exerce uma espécie de efeito plastificante, distanciando o polímero cadeias e consequentemente facilitando seu processo de decomposição em temperatura mais baixa (CESAR *et al.*, 2019).

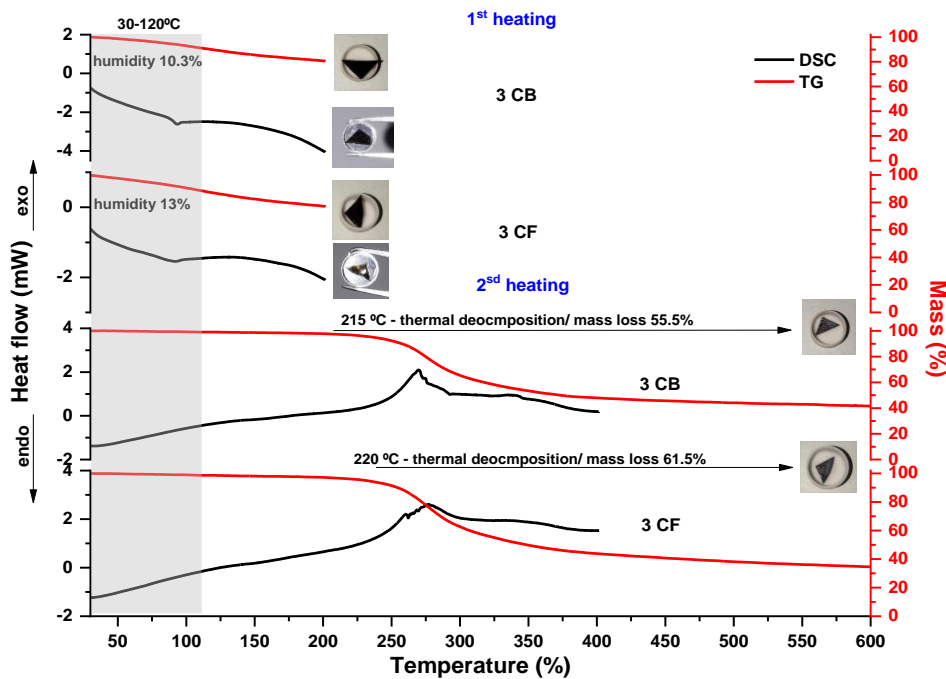


Fonte: Dados da pesquisa

Nos termogramas apresentados na Figura 35 é possível observar que há um evento térmico, registrado como sendo de decomposição térmica em 218 °C com perda de massa de 62,3% para o inserte branco, sem fármaco e um evento térmico semelhante para o inserte com os dois fármacos, porém iniciando em 210°C. Foi possível observar na curva de DSC do inserte com o fármaco que há dois eventos térmicos, o primeiro em aproximadamente 260°C e o segundo em aproximadamente 275°C, o que pode estar relacionado a presença das duas camadas do inserte. As diferenças identificadas nos insertes com e sem fármaco podem estar relacionadas ao fato de

que a presença do fármaco faz com que as camadas fiquem mais espessas (como demonstrado nas micrografias presentes na figura 30) fazendo com que o processo de desprendimento em função do aumento da temperatura fique mais evidente permitindo a detecção destes eventos pelo aparelho de análise térmica.

Figura 36- Comportamento térmico das amostras 3 CB e 3 CF.



Na figura 36, é possível observar que há um evento térmico, registrado como sendo de decomposição térmica iniciando em 215 °C com perda de massa de 55,5% para o inserte branco, sem fármaco e um evento térmico semelhante para o inserte com os dois fármacos, porém iniciando em 220°C. No inserte de 3 camadas com o fármaco foi possível observar a presença de três eventos térmicos, em aproximadamente 260°C, 275°C e 280°C, podendo estar relacionado a decomposição das interações entre os fármacos e as três camadas dos insertes.

Os insertes branco de 1 camada apresentaram a menor temperatura de decomposição, o que pode ser atribuído a menor quantidade de polímero presente.

Em um estudo semelhante, Neufeld (2017), apresentou em seu artigo "*Pectin-chitosan Physical Hydrogels as Potential Drug Delivery Vehicles*" (Hidrogéis Físicos de Pectina-Quitossana como Veículos Potenciais de Entrega de Fármacos), que a curva calorimétrica da quitossana é típica de um composto hidratado amorfo. Relatou um amplo pico endotérmico de 60°C a 180°C, correspondente à desidratação do polímero, que é seguido por um evento exotérmico que se inicia a 205°C,

correspondendo à degradação térmica das cadeias poliméricas. Este segundo evento endotérmico foi atribuído à quebra de interações eletrostáticas inespecíficas. A curva DSC da pectina mostrou uma ampla endotérmica de 130°C a 160°C, que está correlacionada com a perda de água associada a grupos hidrofílicos de polímeros, seguida de um pequeno fenômeno exotérmico em torno de 205°C, devido à decomposição das cadeias poliméricas.

7.7 Teor de fármaco nos dispositivos

A avaliação do teor do fármaco no dispositivo garante que a dose necessária para o tratamento vai estar disponível.

Quando um medicamento possui mais de um fármaco em sua composição tem-se potencialmente que sua eficácia é aumentada. No tratamento do glaucoma a associação do timolol ao bimatoprost em um colírio utilizado 1 vez ao dia apresentou redução significativa da PIO em comparação a utilização de um colírio de timolol 2 vezes ao dia (DESAI *et al.*, 2020).

Os dados obtidos para quantificação dos fármacos nos dispositivos estão apresentados na Tabela 17. Como não há em nenhum compendio oficial a especificação para um inserte ocular contendo os fármacos maleato de timolol e bimatoprost, para avaliar se os valores encontrados eram aceitáveis, foi definida a especificação de 90,0% a 110,0% baseada nas monografias *Timolol Maleate Ophthalmic Solution* e *Travoprost Ophthalmic Solution* ambas da Farmacopeia Americana (USP, 2021). Foi escolhida a monografia da travoprost por ser da mesma classe terapêutica da bimatoprost, uma vez que não se tem nenhuma monografia disponível para a bimatoprost. Os resultados de teor encontrados estão de acordo com a especificação.

Tabela 17- Teor de fármaco nos dispositivos desenvolvidos

Dispositivo	Teor (%) \pm D.P.R	
	Bimatoprost	Maleato de Timolol
1 camada	94,00 \pm 0,38	103,32 \pm 1,23
2 camadas	97,49 \pm 0,34	104,80 \pm 0,38
3 camadas	95,33 \pm 0,25	104,34 \pm 1,41

7.8 Uniformidade de conteúdo dos dispositivos

Uma grande preocupação no desenvolvimento de insertes é o teor dos fármacos e a uniformidade do produto obtido. Para assegurar a administração de doses corretas, cada unidade do lote de um medicamento deve conter quantidade do componente ativo próxima da quantidade declarada. O teste de uniformidade de doses unitárias possibilita avaliar a quantidade de componente ativo em unidades individuais do lote e verificar se esta quantidade é uniforme nas unidades testadas (BRASIL,2019).

A Farmacopeia Brasileira (2019), preconiza que o valor de aceitação no primeiro estágio da uniformidade de conteúdo seja menor ou igual a 15. Os valores de aceitação (VA) dos dispositivos apresentados na Tabela 18, estão de acordo com a especificação.

Os insertes também cumprem o teste para uniformidade de conteúdo para inserções oftálmicas (Eur. Ph. 2.9.6. Uniformidade do conteúdo das preparações de dose única) conforme preconizado inserte ficou dentro dos limites de 85-115% do conteúdo médio como mostra a Tabela 19.

Tabela 18- Uniformidade de conteúdo dos dispositivos desenvolvidos- Valor de aceitação

Dispositivo	Valor de Aceitação	
	Bimatoprostá	Maleato de timolol
1 camada	9,2	14,9
2 camadas	10,2	8,5
3 camadas	10,7	9,6

A tabela 18 mostrou que todos os dispositivos apresentaram valor de aceitação dentro da especificação (<15), sendo o maior valor obtido para o maleato de timolol no dispositivo de 1 camada e o menor valor também foi para o maleato de timolol, porém no dispositivo de 2 camadas.

Tabela 19- Uniformidade de conteúdo dos dispositivos desenvolvidos- Conteúdo médio

Dispositivo	Teor (%)			
	Bimatoprostá		Maleato de Timolol	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
1 camada	93,6	101,9	90,6	104,5
2 camadas	91,3	102,4	100,1	109,6
3 camadas	91,0	99,4	99,8	108,6

A tabela 19 mostrou que os dispositivos atendem ao especificado no capítulo geral para inserções oftálmicas da Farmacopeia Europeia (85% a 115% do conteúdo médio), o valor mínimo de teor encontrado foi referente ao maleato de timolol no inserte de 1 camada e o valor máximo foi encontrado para maleato de timolol no inserte de 2 camadas.

A variabilidade encontrada está relacionada a baixa concentração dos fármacos nos insertes (bimatoprost 0,015% e maleato de timolol 0,25%) associada a variabilidade do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência utilizado para quantificação dos fármacos.

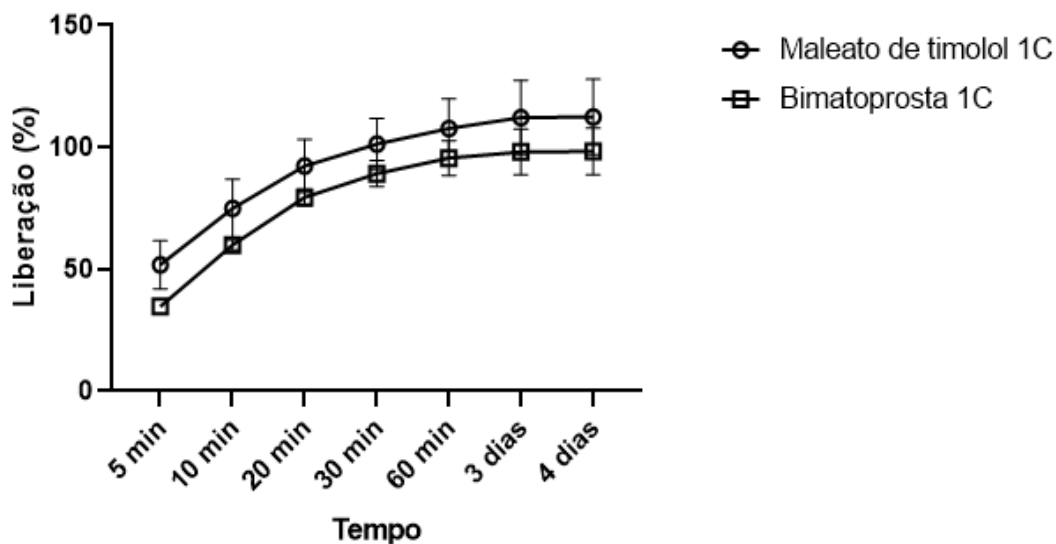
7.9 Potencial de liberação e testes de liberação *in vitro*

Os polímeros hidrofílicos quando imersos em meio aquoso começam a hidratação gradualmente, causando relaxamento das cadeias poliméricas com expansão de volume associada. A liberação do fármaco de sistemas expansíveis é complexa, e geralmente depende de um ou mais dos seguintes processos: entrada do meio aquoso em na matriz polimérica, inchaço do polímero, dissolução do fármaco no meio, difusão do fármaco através do polímero hidratado e erosão da matriz (HERMANS *et al*, 2014). Em complemento a isso, teve-se que no item 3.1 foi apresentado que os insertes a base de quitosana possuem alta capacidade de hidratação devido à natureza hidrofílica do polímero.

O maior influxo de água gerado pela presença do fármaco na estrutura polimérica ocasiona uma maior interação entre as moléculas dos polímeros e do fármaco. Com o maior influxo e conseqüentemente maior afastamento das cadeias poliméricas, a água passa a dissolver o fármaco, que é liberado da estrutura do inserte por um processo difusional. (FOUREAUX *et al.*, 2015; FRANÇA, *et al.*, 2014.a).

Os gráficos 4 a 6 apresentam o potencial de liberação *in vitro* dos insertes monocamada, bicamada e tricamada contendo os fármacos bimatoprost e maleato de timolol.

Gráfico 4- Potencial de liberação *in vitro* dos insertes monocamada contendo os fármacos bimatoprost e maleato de timolol



O gráfico 4, mostra que tanto o maleato de timolol quanto a bimatoprost tiveram uma liberação de mais de 50% após 10 minutos, sendo que este resultado está em conformidade com o resultado do teste de hidratação, onde o inserte apresentou hidratação superior a 50% em 5 minutos. A comparação com os resultados de hidratação dos insertes é uma etapa fundamental, pois está relacionada a bioadesão ou mucoadesão do inserte, que interfere na liberação dos fármacos. A quantidade de água que entra no sistema é proporcional a capacidade deste em interagir, por intermédio de interações com o polímero, caso se tenha em um dispositivo uma rede polimérica bem estabelecida, coesa, forte, haverá menos influxo para o interior do dispositivo e conseqüentemente menor liberação do fármaco.

Ademais, é importante ressaltar que os insertes monocamada tiveram uma liberação rápida dos fármacos, necessária para o efeito terapêutico, e que a liberação se manteve até 4 dias o que é necessário para manutenção do tratamento.

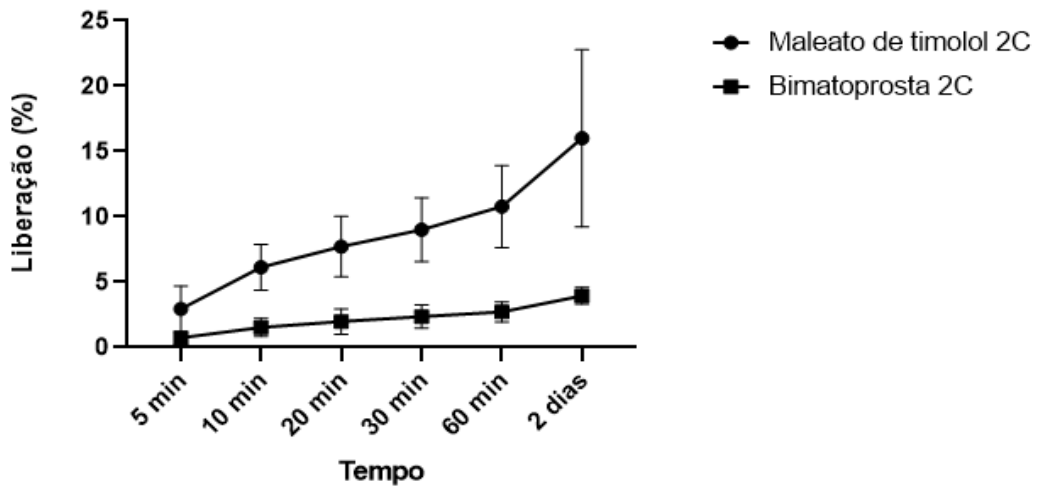
Hermans e seus colaboradores (2014) realizaram a caracterização de insertes mucoadesivos de quitosana para liberação oftálmica de ciclosporina A. Em seus achados encontraram que a liberação da droga foi relativamente rápida durante as primeiras 3 horas do experimento, sendo que este feito pode estar relacionado ao processo de inchamento inicial relativamente rápido dos insertes de quitosana. Contudo, após esta primeira fase, a curva de liberação reduz o coeficiente angular e

começa a formar um platô. Este acontecimento pode ser explicado pela formação de uma camada de gel inchada do polímero que retardou a penetração do meio de liberação e pode atuar como uma barreira de difusão para a liberação do fármaco. À medida que a camada de gel se torna mais espessa, a distância de difusão do fármaco aumenta. Conseqüentemente, a taxa de liberação diminui. Além disso, apenas uma erosão limitada do polímero inchado ocorreu devido à baixa solubilidade da quitosana em meio de pH neutro.

O perfil de liberação *in vitro* de maleato de timolol foi estudado por Zhao e seus colaboradores (2017), em diferentes formulações ao longo do tempo. Em seu desenho metodológico, avaliaram o perfil de liberação *in vitro* do maleato de timolol em colírio comercial em dois diferentes tipos de nanopartículas. Neste contexto, o colírio de maleato de timolol, apresentou, aproximadamente 48 e 89% da droga foi liberada após 0,5 e 2 h, respectivamente. A rápida liberação do maleato de timolol no colírio foi atribuída pelos autores à rápida difusão das drogas de moléculas pequenas. As nanopartículas carregadas com maleato de timolol e quitosana galactosilada e nanopartículas carregadas com maleato de timolol e quitosana apresentaram liberação de 32 e 36% em 1h seguida de liberação prolongada de 91 e 90% em 8 h, respectivamente.

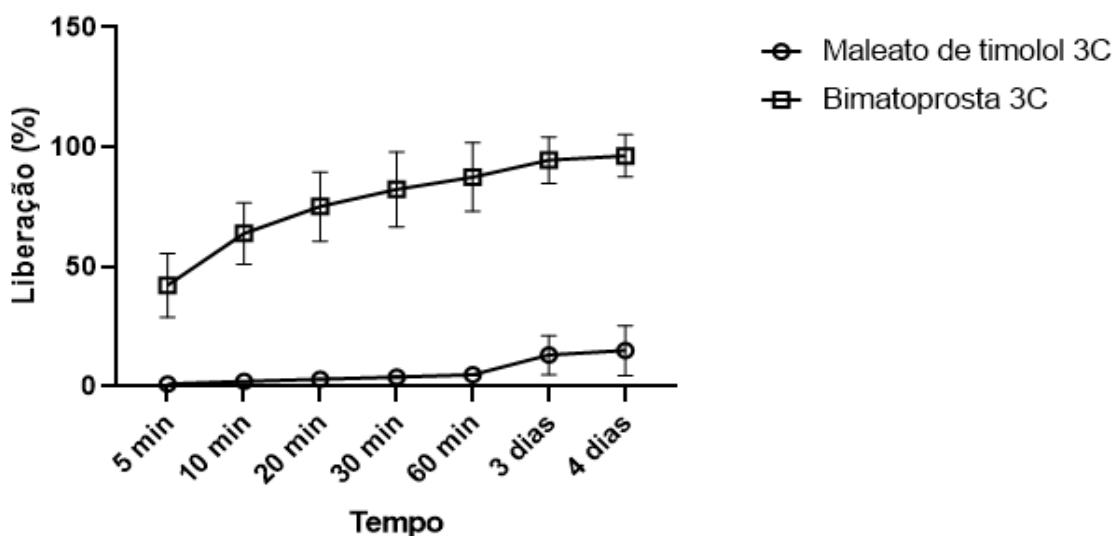
Do ponto de vista clínico, apresentar uma rápida liberação inicial pode ser ideal para alcançar o objetivo terapêutico visto que a concentração do fármaco é obtida em tempo mínimo e seguida uma liberação lenta para manter uma concentração mínima eficaz (SHI *et al.*, 2015). A liberação inicial rápida pode ser devido à difusão do fármaco adsorvido na superfície das nanopartículas ou fracamente encapsulado na rede polimérica (ABREGO *et al.*, 2014). Liberação estendida ocorrendo mais tarde pode ser explicado pela interação entre o maleato de timolol encapsulado na nanopartícula e o polímero, inchamento e degradação da matriz polimérica (ZHAO *et al.*, 2017).

Gráfico 5- Potencial de liberação *in vitro* dos insertes bicamada contendo os fármacos bimatoprost e maleato de timolol



O gráfico 5 referente a liberação *in vitro* do inserte bicamada, mostra que em ambos os casos (maleato de timolol e bimatoprost) tiveram uma liberação baixa (menor que 10%) nos primeiros tempos de coleta, o que pode estar relacionado a forte interação dos fármacos com a matriz polimérica que foi mais intensificada com a presença de uma segunda camada. É importante ressaltar também que a liberação foi aumentada ao longo do tempo, apresentado a maior liberação no tempo referente a dois dias.

Gráfico 6- Potencial de liberação *in vitro* dos insertes tricamada contendo os fármacos bimatoprost e maleato de timolol



O gráfico 6 referente a liberação *in vitro* do inserte tricamada, mostra que houve diferença no comportamento de liberação entre o maleato de timolol, que apresentou uma baixíssima liberação nos primeiros 60 minutos, e a bimatoprosta que apresentou maior liberação, atingindo mais 100% de liberação em 60 minutos.

8 CONCLUSÕES

Foi possível desenvolver dispositivos poliméricos de uma, duas e três camadas com dois tipos de fármacos para o potencial uso no tratamento do glaucoma. Os insertes se mantiveram íntegros durante o teste de hidratação. O valor médio de pH obtido para os insertes foi de 5,0, suficiente para não provocar irritação ocular.

Foi possível caracterizar os dispositivos produzidos utilizando, dentre outras técnicas, as de espectroscopia na região do infravermelho, curvas de DSC e TG e microscopia eletrônica de varredura.

Foi possível desenvolver e validar um método analítico para quantificação dos dois fármacos utilizados neste trabalho (bimatoprost e maleato de timolol). O método utilizado para quantificação e avaliação da uniformidade de conteúdo foi por cromatografia líquida de alta eficiência, foi previamente validado e se mostrou seletivo, linear, preciso e exato para a quantificação dos fármacos bimatoprost e maleato de timolol. Os valores de teor dos fármacos bem como o valor de aceitação (VA) da uniformidade de conteúdo estavam de acordo com o preconizado pelas principais farmacopeias.

O teste de liberação *in vitro* mostrou que os insertes monocamada tiveram uma liberação rápida dos fármacos, necessária para o efeito terapêutico, e que a liberação se manteve até 4 dias. Os insertes bicamada tiveram uma liberação baixa (menor que 10%) nos primeiros tempos de coleta (5 e 10 minutos), o que pode estar relacionado a forte interação dos fármacos com a matriz polimérica que foi mais intensificada com a presença de uma segunda camada, porém a liberação foi aumentando ao longo do tempo, apresentado a maior liberação no tempo referente a 2 dias (tempo máximo avaliado). Os insertes tricamada apresentaram diferença no comportamento de liberação entre o maleato de timolol, que apresentou uma baixíssima liberação nos primeiros 60 minutos, e a bimatoprost que apresentou maior liberação, atingindo mais 100% de liberação em 60 minutos, mas em ambos os fármacos a liberação se manteve até 4 dias.

A inovação deste trabalho reside no fato de se propor uma forma farmacêutica na forma de dispositivo polimérico hidrofílico para liberação de não de um, mas dois ativos, também hidrofílicos. Nosso grupo de pesquisa já havia conseguido produzir dispositivos com uma camada para liberação de um único ativo, porém a veiculação

de dois ativos poderia comprometer tanto a estabilidade do inserte quanto dos próprios ativos. Uma forma de tentar diminuir esta probabilidade foi a de tentar obter fármacos distribuídos em insertes não só com uma, mas com mais de uma camada.

Testes *in vivo* devem ser feitos para comprovar os resultados obtidos de forma *in vitro* para determinar a correlação *in vitro/in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABREGO, Guadalupe et al. Design of nanosuspensions and freeze-dried PLGA nanoparticles as a novel approach for ophthalmic delivery of pranoprofen. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 10, p. 3153-3164, 2014.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Appendix F: guidelines for standard method performance requirements. **Official methods of analysis of AOAC International**, 2019.
- BELAMKAR, Aditya et al. Sustained release glaucoma therapies: Novel modalities for overcoming key treatment barriers associated with topical medications. **Annals of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 343-358, 2022.
- BRASIL. ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária – resolução Nº 37, de 6 de julho de 2009. Trata da admissibilidade das Farmacopéias estrangeiras.
- BRASIL. ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária – RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 6 ed. Brasília: Anvisa, 2019. V.1.
- BRUSINI, P. OCT Glaucoma Staging System: a new method for retinal nerve fiber layer damage classification using spectral-domain OCT. **Eye**, v. 32, n. 1, p. 113-119, 2018.
- CAPITENA YOUNG, Cara E.; KAHOOK, Malik Y.; SEIBOLD, Leonard K. Novel drug delivery systems for the treatment of glaucoma. **Current Ophthalmology Reports**, v. 7, p. 143-149, 2019.
- CARRETTI, Emiliano et al. Nanostructured fluids confined into Highly Viscous Polymeric Dispersions as cleaning tools for artifacts: A rheological, SAXS, DSC and TOF-SIMS study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 646, p. 128968, 2022.
- CEGIELSKA, Olga; SAJKIEWICZ, Paweł. Targeted drug delivery systems for the treatment of glaucoma: Most advanced systems review. **Polymers**, v. 11, n. 11, p. 1742, 2019.

CESAR, Aina Liz A. et al. New antiglaucomatous agent for the treatment of open angle glaucoma: Polymeric inserts for drug release and in vitro and in vivo study. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 109, n. 3, p. 336-345, 2021.

CESAR, Aina Liz Alves et al. Desenvolvimento, caracterização e avaliação de atividade in vivo de sistemas de liberação de ativo antiglaucomatoso a partir de insertes de quitosana e condroitina. 2019.

CHARTERS, Lynda. Sustained-release Delivery Systems on Horizon of Glaucoma Care. **Ophthalmology Times** 44.1, 2019.

CHOLKAR, Kishore et al. Eye: anatomy, physiology and barriers to drug delivery. In: **Ocular transporters and receptors**. Woodhead publishing, 2013. p. 1-36.

COLLADO-GONZÁLEZ, Mar; GONZÁLEZ ESPINOSA, Yadira; GOYCOOLEA, Francisco M. Interaction between chitosan and mucin: Fundamentals and applications. **Biomimetics**, v. 4, n. 2, p. 32, 2019.

CONITEC. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Glaucoma. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde. Ministério da Saúde. Nº 333, 2018.

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

DEDAVID, Berenice Anina; GOMES, Carmem Isse; MACHADO, Giovanna. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. **EdiPUCRS**, 2007.

DESAI, Ankita R. et al. Multiple drug delivery from the drug-implants-laden silicone contact lens: Addressing the issue of burst drug release. **Materials Science and Engineering: C**, v. 112, p. 110885, 2020.

DINIZ, Evandro Ribeiro *et al.* Perfil clínico epidemiológico de pacientes com glaucoma atendidos em um serviço de referência em oftalmologia do estado de Minas Gerais. **Revista Médica de Minas Gerais**. v. 31: e-31103, p. 1-6, 2021.

DINIZ FILHO, Alberto; SCHIMITI, Rui Barroso. AVALIAÇÃO DO CAMPO VISUAL NO GLAUCOMA. **Sociedade Brasileira de Glaucoma**, 2022.

ESPORCATTE, Bruno LB; DA SILVA, Nikias Alves. Glaucoma: seguimento clínico e exames complementares. **Sociedade Brasileira de Glaucoma**, 2022.

FOUREAUX, Giselle et al. Ocular inserts for sustained release of the angiotensin-converting enzyme 2 activator, diminazene aceturate, to treat glaucoma in rats. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0133149, 2015.

FRANCA, Jucara Ribeiro et al. Bimatoprost-loaded ocular inserts as sustained release drug delivery systems for glaucoma treatment: in vitro and in vivo evaluation. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95461, 2014.

FRANCA, Jucara Ribeiro et al. Use of chitosan as pharmaceutical excipient in ocular drug delivery systems: Sterilization and pharmacokinetics. **J Biomed Mater Res**. p.1–11. 2020.

FRANCA, Jucara Ribeiro et al. Chitosan/hydroxyethyl cellulose inserts for sustained-release of dorzolamide for glaucoma treatment: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 570, p. 118662, 2019.

GOLDSTEIN, Joseph I. et al. **Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis**. Springer, 2017.

GUIDELINE, ICH Harmonised Tripartite. Validation of analytical procedures Q2 (R1). In: **International Conference of Harmonization. Geneva, Switzerland**. 2022.

GUPTA, Bharti et al. Cellulosic polymers for enhancing drug bioavailability in ocular drug delivery systems. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 11, p. 1201, 2021.

HERMANS, Kris et al. Development and characterization of mucoadhesive chitosan films for ophthalmic delivery of cyclosporine A. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 472, n. 1-2, p. 10-19, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Documento orientativo DOQ-CGCRE-008. 2020.

IRIMIA, Teodora et al. Chitosan-based in situ gels for ocular delivery of therapeutics: a state-of-the-art review. **Marine drugs**, v. 16, n. 10, p. 373, 2018.

KARKI, Sandeep et al. Thin films as an emerging platform for drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 5, p. 559-574, 2016.

KATZ, L. Jay et al. Twelve-month, randomized, controlled trial of bimatoprost 0.01%, 0.0125%, and 0.03% in patients with glaucoma or ocular hypertension. **American Journal of Ophthalmology**, v. 149, n. 4, p. 661-671. e1, 2010.

KESAV, Natasha P. et al. Sustained-release drug delivery systems for the treatment of glaucoma. **International Journal of Ophthalmology**, v. 14, n. 1, p. 148, 2021.

KIM, Seong Jae; CHO, Kyong Jin; OH, Sejong. Development of machine learning models for diagnosis of glaucoma. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0177726, 2017.

KONSTAS, Anastasios GP et al. Comparison of 24-hour intraocular pressure reduction with two dosing regimens of latanoprost and timolol maleate in patients with primary open-angle glaucoma. **American Journal of Ophthalmology**, v. 128, n. 1, p. 15-20, 1999.

KUMAR, S. Suresh et al. Development and validation of RP-HPLC method for estimation of bimatoprost in pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 10, p. 3733, 2011.

LARANJEIRA, Mauro; FÁVERE, Valfredo T. de. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, p. 672-678, 2009.

LEWIS, Richard A. *et al.* Bimatoprost sustained-release implants for glaucoma therapy: 6-month results from a phase I/II clinical trial. **American journal of ophthalmology**, v. 175, p. 137-147, 2017.

MACOON, R.; CHAUHAN, A. Ophthalmic delivery of hydrophilic drugs through drug-loaded oleogels. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 158 p. 105634, 2021.

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

MARQUES, Margareth RC et al. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. **Dissolution Technol**, v. 18, n. 3, p. 15-28, 2011.

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

NAKANO, T. et al. Fixed combination of travoprost and timolol maleate reduces intraocular pressure in Japanese patients with primary open-angle glaucoma or ocular

hypertension: analysis by prostaglandin analogue, **Clinical Ophthalmology**, v. 11, p. 55-61, 2017.

NEUFELD, Lena; BIANCO-PELED, Havazelet. Pectin–chitosan physical hydrogels as potential drug delivery vehicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 852-861, 2017.

ONER, Levent *et al.* Chitosan Formulations for Steroid Delivery: Effect of Formulation Variables on In Vitro Characteristics. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. 33:265–271, 2007.

PATEL, Kapil D. et al. Recent advances in drug delivery systems for glaucoma treatment. **Materials Today Nano**, p. 100178, 2022.

RAMOS, Carolina Chaves; DA SILVA, Denise Aparecida. Prevalência da politerapia a partir da avaliação. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 1, n. 1, p. 1, 2010.

RIBEIRO, Luciana dos Mares Guia et al. Clinical and epidemiological study in patients with primary open-angle glaucoma. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 77, n. 1, p. 9-13, 2018.

RUBIÃO, Francine et al. Topical Bimatoprost Insert for Primary Open-Angle Glaucoma and Ocular Hypertension Treatment-A Phase II Controlled Study. **Current Drug Delivery**, v. 18, n. 7, p. 1022-1026, 2021.

SAH, Abhishek K, and Preeti K Suresh. "Medical Management of Glaucoma: Focus on Ophthalmologic Drug Delivery Systems of Timolol Maleate." **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology** 45.3 (2017): 448-59. Web.

SEAL, Jennifer R. et al. Intracameral sustained-release bimatoprost implant delivers bimatoprost to target tissues with reduced drug exposure to off-target tissues. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, n. 1, p. 50-57, 2019.

SHI, Shuai et al. Chitosan grafted methoxy poly (ethylene glycol)-poly (ϵ -caprolactone) nanosuspension for ocular delivery of hydrophobic diclofenac. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2015.

SILVA, Jadson Lucas Marques da et al. Estudo das propriedades mecânicas de membranas modificadas de quitosana. 2018.

SINGH, Rohan B. et al. Promising therapeutic drug delivery systems for glaucoma: a comprehensive review. **Therapeutic advances in ophthalmology**, v. 12, p. 2515841420905740, 2020.

UMEZURIKE, Benedict C. et al. Primary Open Angle Glaucoma: The Pathophysiology, Mechanisms, Future Diagnostic and Therapeutic Directions. **Ophthalmology Research: An International Journal**. Local, v. 10, n. 3, p. 1-17, jun. 2019. V.10, n. 3, p. 1-17, 2019.

UNITED STATES OF AMERICA. United States Pharmacopeia. 43.ed. *The National Formulary*. 38.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2021.

UNITED STATES OF AMERICA. United States Pharmacopeia. 44.ed. *The National Formulary*. 38.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2022.

VOLOD'KO, Aleksandra V. et al. Comparative Analysis of the Functional Properties of Films Based on Carrageenans, Chitosan, and Their Polyelectrolyte Complexes. **Marine Drugs**, v. 19, n. 12, p. 704, 2021.

WADHWA, Anubhav et al. Bimatoprost: Promising novel drug delivery systems in treatment of glaucoma. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 103156, 2022.

WEINREB, Robert N. et al. Latanoprostene bunod 0.024% versus timolol maleate 0.5% in subjects with open-angle glaucoma or ocular hypertension: the APOLLO study. **Ophthalmology**, v. 123, n. 5, p. 965-973, 2016.

WOOD BR, Quinn MQ et al. A FTIR spectroscopic study to identify potential confounding variables and cell types in screening for cervical malignancies. **Biospectroscopy** 4: 75-91,1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Governments commit to accelerate action to improve access to eye care services. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. World report on vision. 2019.

YADAV, Khushwant S. et al. Glaucoma: Current treatment and impact of advanced drug delivery systems. **Life sciences**, v. 221, p. 362-376, 2019.

ZHAO, Ruobing et al. Development of timolol-loaded galactosylated chitosan nanoparticles and evaluation of their potential for ocular drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 4, p. 997-1008, 2017.