

(11) Número de Publicação: **PT 2197456 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 31/728 (2009.01) **A61K 31/715** (2009.01)

A61K 9/08 (2009.01) **A61K 36/48** (2009.01)

A61P 27/02 (2009.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2008.10.02**

(30) Prioridade(s): **2007.10.02 IT RM20070510**

(43) Data de publicação do pedido: **2010.06.23**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.02.23**
095/2011

(73) Titular(es):

**HMFRA HUNGARY KORLÁTOLT FELELÖSSÉGÜ
TÁRSASÁG**

1118 BUDAPEST VILLÁNYI ÚT 47. FSZT 1 HU

(72) Inventor(es):

ANTONIO DEL PRETE IT
MARCO SANSO IT

(74) Mandatário:

LUÍS MANUEL DE ALMADA DA SILVA CARVALHO
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES OFTÁLMICAS BASEADAS EM POLISSACÁRIDO DE SEMENTE DE TAMARINDO E ÁCIDO HIALURÓNICO**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO DIZ RESPEITO A SOLUÇÕES OFTÁLMICAS INDICADAS PARA UTILIZAÇÃO A TÍTULO DE SUBSTITUTOS DE LÁGRIMAS, CONTENDO UMA MISTURA DE ÁCIDO HIALURÓNICO COM UM POLISSACÁRIDO CONHECIDO COMO TSP (POLISSACÁRIDO DE SEMENTE DE TAMARINDUS INDICA) QUE SEJAM CAPAZES, QUANDO ADMINISTRADOS EM CONJUNTO SOB A FORMA DE UMA COMBINAÇÃO, DE ACTUAR SINERGISTICAMENTE NA SIMULAÇÃO DA NORMALIZAÇÃO DA MUCOSA DAS CONJUNTIVAS AFECTADA PELA SÍNDROME DOS OLHOS SECOS, INDUZINDO DESTE MODO UMA MELHORIA NOTÁVEL DO NÚMERO E DA MORFOLOGIA DAS MICROVILOSIDADES DA CONJUNTIVA. AS PREPARAÇÕES OFTÁLMICAS, PROPOSTAS PARA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DA SÍNDROME DOS OLHOS SECOS CONTÊM, EM COMBINAÇÃO, ENTRE 0,05 E 25%, EM PESO, DE POLISSACÁRIDO DE SEMENTE DE TAMARINDO (TSP), E ENTRE 0,05 E 1%, EM PESO, DE ÁCIDO HIALURÓNICO, EM SOLUÇÃO AQUOSA.

RESUMO

**"COMPOSIÇÕES OFTÁLMICAS BASEADAS EM POLISSACÁRIDO DE
SEMENTE DE TAMARINDO E ÁCIDO HIALURÓNICO"**

A invenção diz respeito a soluções oftálmicas indicadas para utilização a título de substitutos de lágrimas, contendo uma mistura de ácido hialurónico com um polissacárido conhecido como TSP (Polissacárido de Semente de *Tamarindus indica*) que sejam capazes, quando administrados em conjunto sob a forma de uma combinação, de actuar sinergisticamente na simulação da normalização da mucosa das conjuntivas afectada pela síndrome dos olhos secos, induzindo deste modo uma melhoria notável do número e da morfologia das microvilosidades da conjuntiva. As preparações oftálmicas, propostas para utilização no tratamento da síndrome dos olhos secos contêm, em combinação, entre 0,05 e 25%, em peso, de polissacárido de semente de tamarindo (TSP), e entre 0,05 e 1%, em peso, de ácido hialurónico, em solução aquosa.

DESCRIÇÃO**"COMPOSIÇÕES OFTÁLMICAS BASEADAS EM POLISSACÁRIDO DE
SEMENTE DE TAMARINDO E ÁCIDO HIALURÓNICO"**

A invenção presente diz respeito a composições oftálmicas baseadas em polissacárido de semente de tamarindo e ácido hialurónico. Mais especificamente, a invenção diz respeito a soluções oftálmicas indicadas para utilização a título de substitutos de lágrimas, contendo uma mistura de ácido hialurónico com um polissacárido conhecido como TSP (Polissacárido de Semente de *Tamarindus indica*) que são capazes, quando administrados em conjunto como uma mistura, de actuar sinergisticamente na estimulação da devolução à normalidade da mucosa da conjuntiva, afectada pela síndrome dos olhos secos, induzindo deste modo uma melhoria notável do número e da morfologia das microvilosidades da conjuntiva.

Tal como se sabe, a superfície dos olhos é mantida constantemente húmida pela presença da película de lágrimas pré-córnea, que é um revestimento da conjuntiva com uma estrutura líquida organizada e a superfície exposta do globo ocular. Tem uma importância fundamental que a estrutura seja quantitativa qualitativamente adequada para se obter uma limpeza e uma protecção adequada. Para além disto, a película de lágrimas contém substâncias com

elevada potência bactericida tal como a lisozima e anticorpos, que protegem os olhos do ataque de muitos抗igénios.

Em condições normais, as lágrimas, que são um resultado de uma série de soluções excretadas por diversas glândulas no saco da conjuntiva, estão dispostas em camadas sobre a córnea e a superfície da conjuntiva, pelos movimentos das pálpebras, constituindo portanto uma estrutura complexa com três camadas, que inclui:

- uma camada interna de mucosidade, constituída por uma mistura de glicoproteínas (mucina) produzida por células especializadas (isto é, as células em taça da conjuntiva) que estão presentes no epitélio da conjuntiva - estando a referida camada adsorvida sobre a córnea, transformando deste modo o epitélio da córnea numa superfície hidrofílica: quando falta mucina, as células epiteliais são hidrofóbicas e não conseguem ser hidratadas pelas lágrimas;
- uma camada intermédia aquosa espessa (segregada pelas glândulas lacrimais principais e acessórias) essencialmente constituída por água, electrólitos, proteínas, enzimas e mucina; esta camada está espalhada sobre a referida superfície hidrofílica, e tem a função de proporcionar oxigénio atmosférico ao epitélio

da córnea, de exercer uma actividade antibacteriana e de retirar por lavagem quaisquer detritos;

- uma camada lipídica externa l (segregada pelas glândulas sebáceas tarsais das pálpebras, ou glândulas de Meibomius), que têm as seguintes funções: retardar a evaporação da camada de água inferior, aumentando a tensão superficial para estabilizar a película evitando que saia para sobre a pele e para lubrificar as pálpebras.

O movimento das pálpebras espreme o muco para fora das células da conjuntiva e introdu-lo nos fórnices, e a partir daqui ele fica uniformemente distribuído sobre o conjunto da superfície da córnea, através dos movimentos envolvidos no piscar dos olhos.

A estrutura em três camadas que se descreveu acima constitui um sistema fisiológico complexo, que tem as funções principais de proteger a superfície dos olhos, mantendo a hidratação, a lubrificação e a clareza da superfície da córnea, e de cooperar na produção de uma visão correcta. O equilíbrio perfeito e a renovação contínua do sistema fisiológico referido são condição necessária para ser capaz de levar a cabo as funções referidas. Para se conseguir levar a cabo o referido equilíbrio e renovação, tem que acontecer uma evaporação de

água constante mas não excessiva, a partir do fluido das lágrimas, de modo a manter a sua osmolaridade ao nível fisiológico de cerca de 300 mOsm/L, e a película de lágrimas tem que ser continuamente redistribuída sobre a superfície da córnea em resultado do piscar de olhos.

Não só é importante a estrutura em camadas das diversas componentes, mas também são importantes os solutos presentes nela. Os lípidos da camada externa estão dispostos numa dupla fase: uma fase polar, adjacente à camada intermediária, e uma fase mais espessa na interface com o ar. A fase aquosa exibe em vez disso concentrações iónicas fixas: são importantes para manter a osmolaridade das lágrimas, o sódio, o potássio, o cálcio, o magnésio, o zinco, o cloreto e o bicarbonato.

A integridade da fase interna de mucina representa um dos elementos essenciais da manutenção da estabilidade da película de lágrimas. Isto porque a mucina aumenta a molhabilidade da superfície da córnea, permite que a película aquosa continue a aderir à superfície exposta de um modo contínuo e homogéneo, salvaguardando deste modo a sua estabilidade, e aumentando a viscosidade do fluido lacrimal, impedindo de fluir para fora rapidamente demais, a partir do saco da conjuntiva. Tal como se afirmou acima, quando está ausente ou é insuficiente a mucina, a córnea torna-se não molhável e, em consequência do desequilíbrio de electrólitos e de glicoproteínas presentes, a película de lágrimas torna-se instável e fica submetida a quebras, de que resulta a formação de áreas secas.

Diversas doenças ou estados anormais dos olhos manifestam-se por descontinuidades da película lacrimal, em resultado, por exemplo, de uma frequência insuficiente do piscar dos olhos, ou da utilização prolongada das lentes de contacto, da administração de alguns fármacos sistémicos ou, mais frequentemente, de uma hipo-secreção senil. Mais frequentemente, a deterioração do sistema lubrificante eficiente que se descreveu acima aparece na "**síndrome de olhos secos**", cuja taxa aumenta muito, nomeadamente atenta a poluição atmosférica e o consequentemente aparecimento de novos tipos de alergias. Hoje em dia, a síndrome de olhos secos é a patologia mais frequente em oftalmologia, atingindo uma taxa de entre 10 e 15% da população em geral. A este respeito, o termo "olhos secos" é habitualmente utilizado para referir os estados oftálmicos resultantes da diminuição ou da instabilidade do filme lacrimal - caracterizada de um ponto de vista subjectivo, através de uma série de sintomas incomodativos incluindo a sensação de queimadura, a sensação de corpos estranhos, a fotofobia e a visão turva, uma sensação de peso ocular, facilidade de irritação ao vento, ao fumo e na presença de poeiras, bem como perturbações da visão - enquanto as alterações típicas da superfície da córnea a ela devidas são em geral referidas através do termo "**queratoconjuntivite seca**".

Nestas situações ocorre uma degeneração das células da conjuntiva, de que resulta uma formação e perda de escamas, a perda das microplacas da superfície da

célula, a quebra das membranas das células epiteliais e a diminuição do número de células em taça produtoras de mucina. As células epiteliais da córnea e da conjuntiva parecem sofrer com o menor número de microvilosidades, até ao seu completo desaparecimento. A diminuição do número de microvilosidades é em boa aproximação proporcional à severidade da afecção e à gravidade da sintomatologia. Esta situação anatómico-patológica é acompanhada, em diversos graus, por uma infiltração de células inflamatórias a nível das células da conjuntiva. (Cennamo G.L., Del Prete A., Forte R., Cafiero G-, Del Prete S., Marasco D.: Impression cytology with scanning electron microscopy: a new method in the study of conjunctival microvilli, Eye (2007), 1-6).

Além disto, na síndrome de olhos secos, a inexistência de um efeito protector por parte da película lacrimal predispõe para outros estados patológicos tais como as queratoconjuntivites actínica, bacteriana, viral e alérgica.

Tal como foi demonstrado em estudos de patologias humanas, todas as alterações que ocorrem num olho seco, e o estudo pré-clínico num modelo de queratoconjuntivite seca num animal ajudou a compreender a causa natural destas alterações. (Gilbard J.P., Rossi S.R., Gray K.L.: A new rabbit model for queratoconjuntivite seca, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **28**(2):225-228, (1987); Gilbard J.P., Rossi S.R., Gray K.L., Hanninen L.A.: Natural history of disease in a rabbit model for queratoconjuntivite seca,

Acta Ophthalmol: (Supl:) **192**:95-101, (1989). Sabe-se hoje em dia que os olhos secos se desenvolvem através de quatro fases distintas:

1. perda de água da película lacrimal com um aumento da osmolaridade da própria película;
2. diminuição da densidade das células em taça e diminuição do glicogénio na córnea (fonte de energia para se curarem possíveis lesões da córnea);
3. aumento da escamação da córnea (devido ao aumento do gradiente osmótico entre a película lacrimal e a superfície ocular, e à diminuição das células em taça, que obtêm água das células epiteliais da conjuntiva);
4. instabilização da interface entre a córnea e a película lacrimal.

De um ponto de vista de diagnóstico, síndrome de olhos secos pode ser detectada e monitorizada não só através da avaliação dos seus sintomas típicos, mas também por intermédio de procedimentos bem estabelecidos, incluindo, na qualidade de ser o mais comum, a avaliação da secreção lacrimal (teste de Schirmer), a avaliação do período de tempo necessário para o filme lacrimal quebrar depois de uma piscadela completa (período de quebra, BUT),

e a avaliação da cor da superfície da córnea depois de contrastada com cor-de-rosa de Bengala ou com fluoresceína.

Outro fenómeno unanimemente considerado como tratando-se de um sinal de uma película lacrimal com uma estrutura irregular é a diminuição da **cristalização do muco**. Sob condições normais, o muco caracteriza-se por cristalizar com um perfil do tipo do de um feto, quando se obriga a evaporar à temperatura ambiente a partir de uma solução aquosa. O fenómeno de cristalização do muco, que se crê provir da interacção dos electrólitos com as glicoproteínas do muco com elevada massa molecular do muco, acontece pouco tempo depois de se obter muco de lágrimas no fórnice inferior da conjuntiva. Determinou-se que as diversas características de padrões da cristalização, demonstradas no teste da cristalização do muco, (isto é, de Tipo I, cristalização uniforme; de Tipo II, uma boa quantidade de cristalização mostrando fetos de tamanho reduzido e espaços vazios; de Tipo III; apenas está parcialmente presente a cristalização, de Tipo IV, ausência de cristalização) se ligam ao estado normal ou patológico do fluido lacrimal. Uma cristalização densa, por exemplo, é considerada ser a expressão de um equilíbrio perfeito entre a mucina e os electrólitos, enquanto a presença parcial ou a ausência de cristalização das lágrimas, que se detecta nos olhos afectados pela queratoconjuntivite seca, denota uma falta quantitativa de muco de lágrimas ou uma alteração qualitativa das glicoproteínas ou da sua vizinhança (isto é, do pH, da hidratação, do equilíbrio electrolítico).

A queratoconjuntivite seca é normalmente tratada com preparações oftálmicas líquidas habitualmente designadas como "lágrimas artificiais", para serem administradas em gotas de modo a substituir ou suplementar a produção natural de lágrimas. No caso mais simples essas preparações têm apenas um efeito de humidificação, uma vez que consistem em soluções de soro salino fisiológico, neutras e isotónicas com a película lacrimal, baseadas apenas em cloreto de sódio ou em misturas equilibradas de diversos electrólitos:

Para se ultrapassar o inconveniente da diminuição da retenção no interior do saco da conjuntiva, típica destas soluções salinas, foram introduzidas as preparações de lágrimas artificiais, cuja viscosidade é assegurada por adição de agentes com elevadas massas moleculares, tais como, em geral, polímeros solúveis em água e com uma origem sintética, semissintética ou natural. No entanto, verificou-se que, para que os referidos agentes de aumento de viscosidade produzissem características vantajosas numa composição que se destinasse a ser utilizada a título de lágrima artificial, não era suficiente que os referidos agentes de aumento da viscosidade se limitassem a aumentar a viscosidade do produto em geral, mas que era também necessário que as dispersões que se formavam tivessem propriedades tão próximas quanto possível das apresentadas pelas dispersões de mucina. Nomeadamente, as dispersões referidas têm que se comportar tanto quanto possível como

substâncias mimetizando o muco. Isto obriga, em primeiro lugar, a um comportamento reológico específico, isto é, não newtoniano (e especificamente pseudoplástico) semelhante ao comportamento reológico de lágrimas naturais. Com efeito, só uma pequena parte dos produtos macromoleculares que se podem utilizar como incrementadores da viscosidade para lágrimas artificiais são de facto capazes de demonstrar este tipo de comportamento.

São exemplos de composições para utilização a título de lágrimas artificiais, tendo um comportamento reológico não newtoniano, as que contêm polímeros carboxivinílicos tais como Carbopol®, as dos ésteres de celulose, tais como a metilcelulose e dos seus derivados alcoólicos, (por exemplo a hidroxipropilcelulose e a hidroxipropilmetylcelulose), bem como de ácido hialurónico. Este último é um polissacárido com origem natural presente em muitos tecidos e fluidos, tanto humanos como animais, e amplamente utilizado em preparações oftálmicas, devido ao comportamento pseudoplástico das suas soluções aquosas, e por causa da sua boa capacidade para se ligar tanto à água como à parede das células epiteliais.

Um polímero polissacárido natural que se pode considerar incluído na categoria citada é o polissacárido obtido das sementes da árvore de tamarindo, a *Tamarindus indica*, uma planta persistente que pode atingir uma envergadura de 15 m e que produz um fruto leguminoso e

existe largamente espalhada na Índia, em África e por todo o Extremo Oriente, aonde é cultivada sobretudo para a produção de alimentos. O fruto contém sementes grandes com uma elevada percentagem de polissacáridos, que têm como função a acumulação e conservação de substâncias energéticas vitais.

A semente, que era considerada sobretudo como um produto secundário, tem vindo a encontrar diversas aplicações, depois de moída a uma forma de pó (conhecido como "goma de tamarindo" ou "pós de núcleo de tamarindo"). As mais importantes destas aplicações são na indústria têxtil e na indústria papeleira, nas quais a goma de tamarindo se emprega respectivamente na qualidade de agente dimensionante, bem como na indústria alimentar, na qual ela é empregue como agente espessante, gelificante, estabilizador e de aglomeração, em quaisquer tipos de produtos, tal como acontece com outros produtos que são polissacáridos, tais como os alginatos, as pectinas, a goma de guar ou a goma-arábica. O pó de núcleo de tamarindo cru, comercialmente disponível como tal, contém entre 65 e 73%, em peso, de polissacárido, entre 15 e 23% de um material proteico, entre 3 e 8% de gorduras e óleo e entre 2 e 4% de cinzas, para além de pequenas quantidades de fibra bruta, taninos e outras impurezas.

No domínio farmacêutico, a fracção de polissacárido da goma de tamarindo (polissacárido de semente de

tamarindo, doravante também referida como TSP) tem vindo a encontrar uma utilização válida na qualidade de componente activa de substitutos de lágrimas e como veículo para fármacos oftálmicos de aplicação tópica e libertação prolongada tal como se encontra descrito, em especial, na Patente Europeia EP 0 892.636 (Farmigea) e na patente US correspondente, Nº. 6.056.950.

De entre as propriedades miméticas do miméticas de muco que a fracção de polissacárido da goma de tamarindo parece ter, deve salientar-se a capacidade 'cristalização em fetos' que se descreveu acima. Portanto, à semelhança do ácido hialurónico, a referida fracção de polissacárido é capaz de dar, por evaporação, produtos cristalinos com uma morfologia bastante semelhante à do muco lacrimal cristalizado.

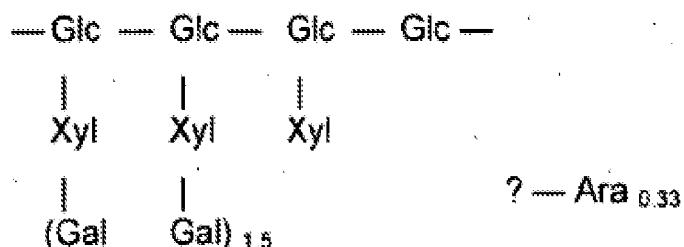
Atento quanto se apresentou acima, um objecto da invenção presente é definir um tratamento farmacológico para uma terapia da síndrome de olhos secos, na qual o substituto de lágrimas seja não só capaz de permanecer durante muito tempo como de se integrar na superfície dos epitélios, exercendo uma função protectora sobre eles, mas seja também capaz de ajudar a restaurar a sua integridade, em especial ajudando a mucosa da conjuntiva volte rapidamente à normalidade, em termos tanto do número como da morfologia das microvilosidades.

No quadro dos estudos que levaram à invenção considerou-se que tanto as soluções oftálmicas conhecidas, baseadas em TSP, como aquelas que são mais conhecidas e se baseiam em ácido hialurónico, demonstravam ser capazes de originar uma melhoria dos sintomas de olhos secos, melhoria essa que se encontra na base do sucesso das suas vendas para o tratamento desta doença, mas que ambas estas soluções originavam benefícios relativamente modestos no que toca à sua eficácia e à rápida recuperação das lesões histológicas que são típicas da patologia em apreço, em especial no que toca à estrutura microscópica superficial do epitélio da conjuntiva.

Com base em quanto se expôs acima verificou-se, de acordo com a invenção presente, que a combinação específica dos ingredientes activos TSP e ácido hialurónico, aplicada sobre a superfície ocular num único produto oftálmico, adquire novas propriedades terapêuticas que ambos os produtos tomados em separado não possuem, em especial ajudando a um mais rápido retorno à normalidade por parte da mucosa da conjuntiva, em particular no que diz respeito ao número e à morfologia das microvilosidades. A recuperação da integridade normal das microvilosidades está associada a um efeito com maior duração, na melhoria dos sinais e sintomas que acompanham a síndrome de olhos secos.

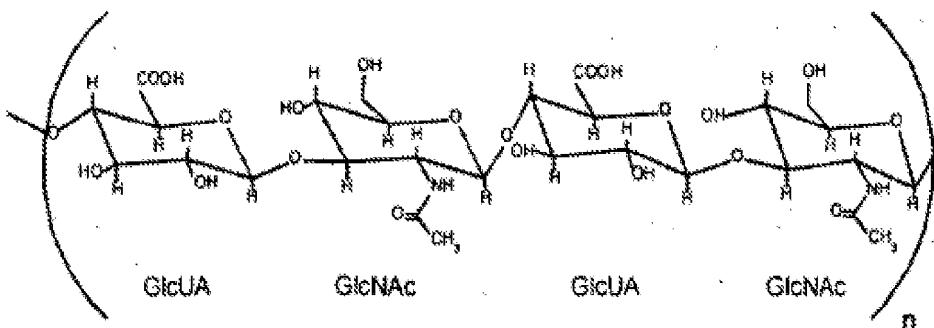
Segundo diversos estudos levados a cabo acerca da estrutura da fracção de polissacárido da goma de tamarindo, verificou-se que o polissacárido da semente de tamarindo é

constituído por uma cadeia principal de unidades glucopiranosilo ligadas umas às outras por intermédio de ligações (1→4), com cadeias laterais curtas constituídas por unidades xilopiranosilo que se ligam à cadeia principal por intermédio de ligações (1→6). As referidas unidades xilopiranosilo são simples, ou podem estar ligadas, por sua vez, a uma única unidade galactopiranosilo, por uma ligação (1→2). Também foi descrita a presença adicional de unidades arabinofuranosilo. Portanto, a estrutura do polissacárido da semente de tamarindo (**TSP**) pode ser representada como se segue



O processo para a extracção, filtração e purificação do polímero a partir da matéria-prima exige uma especialização tecnológica pronunciada, para que se mantenham inalteradas as características funcionais, atenta também a elevada massa molecular, que pode ser, num produto correctamente purificado, de entre 600.000 e 750.000 Da.

O ácido hialurónico pode ser definido do ponto de vista químico como um glicosaminoglicano não ramificado, constituído por unidades alternantes de ácido D-glucurónico (GlcUA) e de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), e cuja estrutura pode ser representada pela fórmula seguinte:



que evidencia uma sequência com duas unidades dissacarídicas distintas, na qual o número n dos pares de unidades que se repetem seja tal que a massa molecular do polissacárido esteja compreendida entre 50.000 e vários milhões de Dalton. A massa molecular média do ácido hialurónico em oftalmologia (sob a forma do seu correspondente sal sódico), para soluções de lágrimas artificiais, está normalmente compreendida entre 700.000 e 1 milhão de Da.

In vivo, todos os grupos carboxilo do ácido hialurónico e da N-acetilglucosamina estão totalmente ionizados, conferindo uma polaridade elevada à molécula de ácido hialurónico e por consequente uma elevada solubilidade em água. Atenta a sua boa capacidade para se ligar tanto com a água como com a parede da célula epitelial, utiliza-se o ácido hialurônico a título de componente principal em muitos substitutos de lágrimas, no tratamento da patologia de olhos secos.

Valente: Establishing the tolerability and performance of tamarind seed polysaccharide (TSP) in treating dry eye syndrome: results of a clinical study), descreve-se uma comparação das actividades do TSP e do ácido hialurónico no tratamento da síndrome de olhos secos num estudo clínico de rótulo aberto, aleatorizado e de um único centro.

No domínio dos estudos ligados à invenção presente, alguns testes laboratoriais baseados na utilização de técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (que serão pormenorizadamente descritos adiante) mostraram que o TSP é capaz de interactuar com o ácido hialurónico (**HA**) em solução, induzindo alterações conformacionais que respeitam sobretudo às unidades internas de glucose e de galactose da TSP, e aos grupos acetilo do HA. Deste facto resulta um efeito sobre a capacidade que a mistura exibe para reter água, a qual, a determinadas razões de concentração, demonstra ser muito superior às capacidades demonstradas por ambos os polímeros quando não se apresentam sob forma não misturada.

Por causa da sua capacidade de retenção de água ser fundamental para as características adesivas e de biocompatibilidade do polímero que se pretende utilizar para o tratamento dos olhos secos, a investigação da mistura TSP-HA foi submetida a uma extensão, recorrendo-se a testes pré-clínicos num modelo de olhos secos induzido no rato com atropina, para se conseguir avaliar a segurança e a tolerabilidade da mistura. Com base nos resultados

obtidos neste modelo (também sinteticamente descritos adiante) é possível confirmar que a mistura de TSP com HA não evidencia interacções negativas entre ambos os produtos e que promove uma melhor recuperação das lesões histofisiológicas subsequentes a uma diminuição aguda da produção de lágrimas.

Um teste clínico subsequente, levado a cabo a título de estudo piloto sobre um número relativamente pequeno de pacientes (descrito adiante) confirmou a eficácia do tratamento proposto, apontando para um efeito de sinergia notável da combinação de TSP com HA.

A invenção presente proporciona portanto especificamente uma preparação oftálmica para utilização a título de substituto de lágrimas, contendo, em combinação, entre 0,05 e 2%, em peso, de polissacárido de semente de tamarindo, e entre 0,05 e 1%, em peso, de ácido hialurónico, numa solução aquosa.

O termo "**polissacárido de semente de tamarindo**" (Polissacárido de semente de *Tamarindus indica* ou TSP, também referido de forma genérica, por vezes, com o termo "**xiloglucano**"), tal como se utiliza neste pedido, significa qualquer fracção enriquecida em polissacárido que se possa obter a partir da goma de tamarindo (isto é, de pós de núcleo de tamarindo), sendo este último o produto em bruto que se encontra hoje em dia disponível no mercado. Pode obter-se uma fracção de polissacárido parcialmente

purificado da goma de tamarindo, por exemplo, junto da Dainippon Pharmaceutical Co. LTD de Osaka, Japão, sob a designação comercial de Glyloid®. Para os efeitos da invenção presente, no entanto, a fracção de polissacárido de interesse é preferivelmente mais purificada para se obter um polissacárido de semente praticamente puro.

O termo "ácido hialurónico", tal como se utiliza no pedido presente, significa o polissacárido anteriormente descrito (em geral também referido como "glicosaminoglicano"), em especial sob a forma de sal habitualmente utilizada na formulação de lágrimas artificiais, isto é, hialuronato de sódio.

Preferivelmente, a preparação oftálmica de acordo com a invenção contém, em combinação em solução aquosa, entre 0,1 e 1%, em peso, de polissacárido de semente de tamarindo e entre 0,1 e 0,5%, em peso, de ácido hialurónico.

Preferivelmente, as concentrações ponderais na preparação oftálmica de acordo com a invenção estão compreendidas entre 0,1 e 1% de polissacárido de semente de tamarindo e entre 0,1 e 0,5%, em peso, de ácido hialurónico. Uma concretização que foi especificamente estudada no trabalho experimental descrito adiante, e que proporciona desempenhos clínicos superiores no que toca à capacidade dos dois agentes activos para cooperarem na reposição da normalidade do epitélio da conjuntiva, contém,

em solução aquosa, 0,2%, em peso, de polissacárido de semente de tamarindo e 0,4%, em peso, de ácido hialurónico.

Preferivelmente, o polissacárido de semente de tamarindo que se utiliza nas preparações da invenção tem uma massa molecular compreendida na gama de entre 450.000 Da e 750.000 Da (preferivelmente 600.000-750.000 Da), e o ácido hialurónico tem uma massa molecular compreendida na gama de entre 600.000 Da e 1.000.000 Da (preferivelmente 700.000-1.000.000 Da).

Nas formulações de lágrimas artificiais de acordo com a invenção, pode adicionar-se um ou mais agentes de ajustamento da tonicidade, de modo a conferir à solução o valor correcto da osmolaridade. Com este objectivo, pode recorrer-se a qualquer um dos produtos empregues hoje em dia na técnica como agentes de tonicidade, tais como, por exemplo, cloreto de sódio, cloreto de potássio, manitol, dextrose, ácido bórico, sorbitol ou propilenoglicol.

Outros ingredientes que se podem incluir na formulação, de acordo com a técnica conhecida, são ácidos ou bases a título de agentes de ajustamento do pH, bem como tampões, tais como, por exemplo, o tampão fosfato (fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico), ou o tampão acetato (sistema acetato - ácido acético). Ouros tampões que também podem ser utilizados são os de borato, citrato, bicarbonato e trizma (tri-hidroximetilaminometano).

A composição também pode conter conservantes e agentes antimicrobianos, tais como cloretos de benzalcónio, mertiolato de sódio ou timerosal, metilparabeno, etilparabeno ou propilparabeno, clorobutanol, nitrato ou acetato de fenilmercúrio, álcool feniletílico, acetato ou gluconato de clorexidina, bem como agentes quelantes tais como os edetatos ou o EDTA. Devido aos problemas da tolerabilidade dos conservantes, prefere-se não incluir ingredientes destes nas formulações para utilização a título de lágrimas artificiais. Isto é claramente possível quando o produto for embalado em contentores de unidade de dose. Em alguns casos, no entanto, e especificamente quando o produto se encontrar em contentores de diversas doses, é necessária a adição de conservantes.

De acordo com mais um seu aspecto, a invenção presente diz respeito à utilização de uma combinação de polissacárido de semente de tamarindo com ácido hialurónico em solução aquosa, para a produção de uma preparação para tratamento da síndrome de olhos secos.

Tal como se afirmou acima, os referidos substitutos de lágrimas ou suas preparações contêm de preferência entre 0,05 e 2%, em peso, de polissacárido de semente de tamarindo e entre 0,05 e 1%, em peso, de ácido hialurónico, contendo preferivelmente entre 0,1 e 1%, em peso, de polissacárido de semente de tamarindo e entre 0,1 e 0,5%, em peso, de ácido hialurónico.

O polissacárido de semente de tamarindo da preparação proposta para a utilização descrita adiante terá adequadamente uma massa molecular compreendida entre 600.000 Da e 750.000 Da, enquanto a massa molecular do ácido hialurónico estará preferivelmente compreendida entre 700.000 Da e 1.000.000 Da.

A invenção presente também é descrita pelos seguintes exemplos não limitativos, de acordo com algumas suas concretizações específicas, que ilustram exemplos de formulações baseadas em xiloglucano e ácido hialurônico empregues como substitutos de lágrimas, possuindo uma actividade protectora e conducente a uma nova epitelialização, se acordo com quanto se determinou experimentalmente e se descreve nas afirmações experimentais que se seguem.

EXEMPLOS DE FORMULAÇÕES ARTIFICIAIS DE LÁGRIMAS**Exemplo 1**

Ingredientes	%, em peso
TSP	0,1
Ácido Hialurônico	0,1
Manitol	2,00
Água desionizada	q.b.p. para 100
Fosfato de sódio monobásico e dibásico	q.b.p. pH 7,0±0,5

Prepara-se o produto através dos seguintes passos:

- Pesam-se TSP e HA num recipiente adequado em vidro;
- Adiciona-se 90% da água disponível com uma ligeira agitação até se completar a dissolução do produto;
- Adiciona-se a quantidade de manitol, mantendo-se a agitação, e deixa-se a mistura sob agitação até dissolução completa do produto;
- Adiciona-se água desionizada até se atingir o peso final (100%);
- adicionam-se fosfato de sódio monobásico e dibásico até se atingir o pH pretendido;
- esteriliza-se a solução que desta forma se obteve numa autoclave ou, em alternativa, esteriliza-se por filtração através de um filtro de 0,22 micron.

Exemplo 2

Ingredientes	% , em peso
TSP	0,1
Ácido Hialurónico	0,4
Manitol	2,00
Água desionizada	q.b.p. 100
Fosfato de sódio monobásico e dibásico	q.b.p. pH 7,0±0,5

Prepara-se o produto do mesmo modo que o do exemplo 1.

Exemplo 3

Ingredientes	% , em peso
TSP	0,2
Ácido Hialurônico	0,1
Manitol	2,00
Água desionizada	q.b.p. 100
Fosfato de sódio monobásico e dibásico	q.b.p. pH 7,0±0,5

Prepara-se o produto do mesmo modo que o do exemplo 1.

Exemplo 4

Ingredientes	% , em peso
TSP	0,2
Ácido Hialurônico	0,2
Manitol	2,00
Água desionizada	q.b.p. 100
Fosfato de sódio monobásico e dibásico	q.b.p. pH 7,0±0,5

Prepara-se o produto do mesmo modo que o do exemplo 1.

Exemplo 5

Ingredientes	% , em peso
TSP	0,2
Ácido Hialurônico	0,4
Manitol	2,00
Água desionizada	q.b.p. 100
Fosfato de sódio monobásico e dibásico	q.b.p. pH 7,0±0,5

Prepara-se o produto do mesmo modo que o do exemplo 1.

Exemplo 6

Ingredientes	% , em peso
TSP	0,4
Ácido Hialurônico	0,1
Manitol	2,00
Água desionizada	q.b.p. 100
Fosfato de sódio monobásico e dibásico	q.b.p. pH 7,0±0,5

Prepara-se o produto do mesmo modo que o do exemplo 1.

Exemplo 7

Ingredientes	% , em peso
TSP	0,4
Ácido Hialurônico	0,2
Manitol	2,00
Água desionizada	q.b.p. 100
Fosfato de sódio monobásico e dibásico	q.b. p pH 7,0±0,5

Prepara-se o produto do mesmo modo que o do exemplo 1.

Exemplo 8

Ingredientes	% , em peso
TSP	1,0
Ácido Hialurônico	0,1
Manitol	2,00
Água desionizada	q.b.p. 100
Fosfato de sódio monobásico e dibásico	q.b. p pH 7,0±0,5

Prepara-se o produto do mesmo modo que o do exemplo 1.

Exemplo 9

Ingredientes	% , em peso
TSP	1,0
Ácido Hialurônico	0,4
Manitol	2,00
Água desionizada	q.b.p. 100
Fosfato de sódio monobásico e dibásico	q.b. p pH 7,0±0,5

Prepara-se o produto do mesmo modo que o do exemplo 1.

São listados adiante alguns resultados experi-

mentais contendo as combinações de polissacáridos de acordo com a invenção e o desempenho de preparações contendo-as, em conjunto com alguns gráficos e fotografias que estão ilustradas nos desenhos anexos, nos quais:

A **Figura 1** mostra, sob a forma de um histograma, os resultados de um estudo piloto sobre a eficácia da composição de acordo com a invenção no tratamento da síndrome de olhos secos, no que toca a avaliação das microvilosidades da conjuntiva, em termos de valores absolutos;

A **Figura 2** mostra os resultados, no mesmo estudo piloto, da avaliação das microvilosidades da conjuntiva, em termos de variação dos valores de base;

A **Figura 3** mostra uma imagem de SEM a 7500 x, do epitélio da conjuntiva de um olho esquerdo de um paciente do sexo feminino do mesmo estudo piloto, pertencendo o paciente referido ao grupo a TSP+HA, antes do tratamento;

A **Figura 4** mostra uma imagem de a 7500 x do epitélio da conjuntiva de um olho esquerdo da mesma paciente do sexo feminino da Figura 3, passados 60 dias do tratamento com TSP+HA;

A **Figura 5** mostra sob a forma de um histograma os resultados do mesmo estudo piloto da

Figura 1, no que toca à avaliação dos efeitos sobre a sintomatologia subjectiva, em termos de valores absolutos;

A **Figura 6** mostra os resultados, no estudo piloto, da avaliação dos efeitos da sintomatologia subjectiva, em termos de valores de base;

A **Figura 7** mostra, sob a forma de um histograma, os resultados do mesmo estudo piloto da Figura 1, no que toca à avaliação dos efeitos da sintomatologia subjectiva, em termos de valores absolutos;

A **Figura 8** mostra os resultados, no mesmo estudo piloto, das avaliações dos efeitos da sintomatologia subjectiva, em termos de valores de base;

A **Figura 9** mostra, sob a forma de um histograma, dos resultados do mesmo estudo piloto da Figura 1, no que toca à avaliação do efeito sobre a citologia, em termos dos valores absolutos;

A **Figura 10** mostra os resultados, no mesmo estudo piloto, sobre a avaliação dos efeitos sobre a citologia, em termos da variação a respeito dos valores de base;

A **Figura 11** mostra, sob a forma de um histograma, os resultados do mesmo estudo piloto da Figura 1, no que toca à classificação total (classificação combinada) da avaliação acima, em termos de valores absolutos; e

A **Figura 12** mostra os resultados, no mesmo estudo piloto, da classificação combinada das avaliações anteriores, em termos de variação a respeito dos valores de base.

Investigação por RMN de misturas de ácido hialurónico (HA) e TSP em solução aquosa

Os hidrogeles de polissacárido têm uma estrutura tridimensional muito complicada, dentro da qual pode estar incorporada água. O conteúdo em água, o tipo de interacção que ocorre entre a água e os materiais poliméricos, bem como a distribuição interna da água pelo próprio polímero, têm uma influência crítica sobre as propriedades mecânicas, a muco-adesividade, estão na base de um alto grau de biocompatibilidade. Em geral distinguem-se três tipos de água no gel de polissacárido: água ligada, água intermediária e água livre.

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) representa uma das técnicas mais úteis para estudar a estrutura, a mobilidade e as propriedades de hidratação do sistema polimérico. Em especial, parece ser muito útil a

medição do período de relaxação spin-spin (T_2), e o período de relaxação spin-rede (T_1) dos núcleos protónico da água. O período de relaxação T_2 representa o período de tempo constante que descreve o decaimento da magnetização transversal ao longo do tempo, enquanto o período de relaxação T_1 descreve o processo de recuperação da magnetização longitudinal.

Quando um polissacárido é dissolvido em água, as moléculas de água formam ligações em ponte de hidrogénio com ele e portanto a sua mobilidade fica diminuída, levando a uma diminuição tanto de T_1 como de T_2 . Em geral, no entanto, não são detectados sinais distintos para a água ligada e para a água livre, mas apenas um sinal que representa a média ponderada das contribuições provenientes dos dois tipos de água. Em consequência, o parâmetro d RMN medido (T_1 e/ou T_2) representa a média ponderada do valor deste parâmetro nos estados livre e ligado, de acordo com a seguinte equação (equação 1):

$$\frac{1}{T_{obs}} = X_b \frac{1}{T_b} + X_f \frac{1}{T_f} \quad (1)$$

na qual $\frac{1}{T_{obs}}$ descreve a taxa de velocidade da relaxação (inverso do período de tempo T_1 ou T_2) medido para a água na solução a que diz respeito, $\frac{1}{T_b}$ é a taxa de velocidade da relaxação para a água ligada e $\frac{1}{T_f}$ é a taxa de

velocidade da relaxação para a água livre, igual à que é medida numa solução isenta de material polimérico. X_b e X_f são, respectivamente, a fracção molar da água ligada e da água livre.

Pode exprimir-se o número de moléculas de água ligada do seguinte modo, na dependência da superfície S do polímero, da espessura K da camada superficial de água e do volume total de água V (equação 2):

$$X_b = K \times \frac{S}{V} \quad (2)$$

Quando a concentração de polímero aumenta, tanto T_1 como T_2 diminuem em consequência do aumento da superfície de polímero e, portanto, do número de moléculas de água ligada, a não ser que ocorram variações de conformações ou fenómenos de auto-regulação, consoante a variação da própria concentração; no entanto, o efeito sobre a velocidade da relaxação transversal ($\frac{1}{T_2}$) é muito menor do que o que se torna aparente relativamente à velocidade de relaxação longitudinal .

Com base nestes factos, levaram-se a cabo as seguintes experiências para a medição da velocidade de relaxação transversal ($\frac{1}{T_2}$) dos protões de água, nas seguintes soluções:

- a) Soluções de TSP com diversas concentrações, de 0,1% (em peso) a 1%;
- b) Soluções de HA com diversas concentrações, de 0,1% (em peso) a 1%,
- c) Misturas contendo diversas concentrações de HA e de TSP, a uma concentração total constante igual a 0,5%, obtidas misturando volumes adequados de soluções de origem com concentração total de 0,5%;
- d) Misturas contendo diversas concentrações em HA e em TSP, a uma concentração total constante igual a 1%, obtidas misturando volumes adequados de soluções de origem com concentração total de 1%.

Para se conseguir informação acerca da natureza da interacção que ocorre entre os dois materiais poliméricos, também se compararam os parâmetros espectrais dos dois polímeros HA e TSP às diversas concentrações e nas suas misturas. Os parâmetros espectrais considerados são os seguintes:

1. desvio químico de ^{23}Na do HA;
2. medições da relaxação spin-rede selectiva para os protões anoméricos de TSP e para os protões dos acetilos do HA;
3. medições de relaxação spin-spin de protões de HA e de TSP;
4. medições DOSY (Espectroscopia Ordenada por

Difusão) para se determinar a difusão da H₂O (determinação da água incorporada no polímero).

As medidas do desvio químico de ²³Na e as levadas a cabo sobre os grupos acetilo do ácido hialurónico destinam-se a determinar se a interacção entre os dois materiais poliméricos envolve os grupos polares ionizados do ácido hialurónico ou o seu grupo acetilo.

As medições levadas a cabo sobre os protões anoméricos destinam-se a determinar quais os tipos de unidades do TSP que se encontram principalmente envolvidas na interacção com o HA.

Preparação de amostras para a análise e os métodos de medição por RMN

Prepararam-se as soluções originais dissolvendo os polímeros sólidos em D₂O nas concentrações pretendidas. Prepararam-se duas séries de soluções, a primeira obtida depois de se agitar à temperatura ambiente durante 12 h e a segunda agitando à temperatura ambiente durante 12 h e agitando sob um aquecimento a 80°C durante cerca de 60 minutos. Os resultados obtidos nas duas séries de soluções eram completamente sobreponíveis; portanto não se faz qualquer distinção entre elas na descrição que se segue.

Os estudos de RMN foram levados a cabo num

espectrómetro de RMN Varian INOVA 600 14T, operando a 600 MHz para o ^1H e a 158,6 MHz para o ^{23}Na , possuindo uma sonda inversas de ressonância tripla de 5 mm e uma sonda de larga gama de comprimentos de onda de 5 mm para o exame directo. O espectrómetro está equipado com um sistema d controlo de temperatura com uma acuidade de $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

Os períodos de relaxação protónica spin-spin T_1 são os obtidos usando a sequência padrão de inversão-recuperação ($180^\circ-\tau-90^\circ$ -aquisição) para a aplicação selectiva de um impulso de inversão com a frequência pretendida.

Mediram-se os períodos de relaxação spin-spin T_2 utilizando a sequência de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) ($90^\circ-\tau-(180^\circ-2T)^n$).

Os mapas de DOSY (Espectroscopia de Difusão Ordenada) foram registados utilizando um período de relaxação de 3 s com um número de transientes igual a 4. Utilizaram-se 30 gradientes e optimizaram-se os parâmetros δ e Δ respectivamente (1 ms e 80 ms) para se obter uma queda de até 10-5% do sinal inicial.

Medição do período de relaxação ($R_2=\frac{1}{T_2}$) da água

Em primeiro lugar, obtiveram-se medições do período de relaxação T_2 da água em soluções contendo os

dois polímero puros, a diversas concentrações desde 0,1% até 1%.

Para o TSP, medem-se valores que aumentam a partir de $0,90\text{ s}^{-1}$ para a solução mais diluída (0,1%, em peso) até $3,08\text{ s}^{-1}$ para a solução com a concentração de 1%. O aumento da velocidade de relaxação spin-spin está de acordo com quanto se espera com base no aumento da fracção molar de água ligada, que varia em paralelo com o da concentração em polímero.

Para o ácido hialurónico puro, observa-se um aumento semelhante do parâmetro de relaxação da água quando se aumenta a concentração em polímero. Não só os valores medidos são notavelmente menores do que os medidos para TSP às mesmas concentrações, mas também a variação total é consideravelmente inferior. Levando-se em conta que as massas moleculares de ambos os polímeros são muito elevadas, pode razoavelmente correlacionar-se a diferença referida com uma diferença na tendência para auto-agregação por parte dos dois polímeros: provavelmente o TSP tem uma tendência maior para se auto-associar a concentrações crescentes em relação ao HA, e em consequência dos fenómenos de auto-agregação ocorre um aumento da fracção de água ligada em relação à água livre.

Em seguida, mediram-se as velocidades de relaxação da água em misturas de TSP-HA com uma concentração total igual a 0,5% (solução c), mas contendo taxas variadas das

duas componentes. Compararam-se os valores obtidos com os que se haviam obtido para os dois polímeros puros à mesma concentração na mistura, ou à concentração total. Os resultados obtidos variando as taxas ponderais entre TSP e HA permitem concluir que com taxas TSP/HA variáveis entre 3:2 e 4:1, a interacção entre os dois materiais poliméricos torna-se francamente cooperativa, levando assim a um súbito aumento da fracção molar de água ligada em relação à que seria típica para os polímeros individuais à concentração máxima.

Nas soluções com uma concentração total igual a 1% (solução d), este comportamento é reproduzido, nomeadamente, para razões TSP/HA compreendidas entre 6:4 e 8:2, a velocidade de relaxação da água na mistura apresenta um aumento súbito para um valor que é maior do que o valor medido quer para TSP, quer para HA, ambos à mesma concentração na qual cada um deles está presente na mistura, ou à concentração correspondente ao valor total (1%). O comportamento cooperativo dos dois polímeros é portanto confirmado; este comportamento parece depender mais criticamente da razão entre os dois polímeros do que da sua concentração total.

Medição da velocidade de relaxação ($R_1 = \frac{1}{T_1}$) do grupo acetilo do ácido hialurónico

Mediu-se a velocidade de relaxação longitudinal R_1

dos protões do acetilo do ácido hialurónico em misturas contendo uma concentração total constante igual a 0,5% e razões variáveis de TSP/HA. O comportamento da velocidade de relaxação R_1 do grupo acetilo é especialmente interessante nas misturas de HA/TSP com uma concentração total de 0,5%, nas quais se observa mais uma vez uma diminuição da velocidade de relaxação R_1 com o aumento da concentração de HA, mas com valores absolutos que ainda são inferiores aos medidos na ausência de TSP, à mesma concentração. A quantidade da diminuição produzida para a velocidade de relaxação do grupo acetilo em consequência da presença de TSP tornava-se maior a razões variáveis de entre 3:2 e 4:1; nesta gama confirma-se o notável efeito de sinergia dos dois polímeros.

Além disto, também a velocidade de relaxação spin-spin R_2 dos protões do acetilo segue o mesmo comportamento, tanto no polímero puro como nas misturas com TSP; nomeadamente quando se aumenta a concentração em HA obtém-se um decréscimo do parâmetro de relaxação, mas as velocidades de relaxação na mistura são inferiores, e a diminuição na mistura em comparação com a componente pura aumenta para valores elevados da razão TSP/HA.

Medição da velocidade de relaxação spin-spin R_2 de protões seleccionados de TSP, na presença e na ausência de ácido hialurónico, à concentração total de 0,5%.

No espectro das misturas, os protões anoméricos de

TSP a 5,06 ppm, 4,85 ppm e 4,45 ppm acontecem não estar sobrepostos aos sinais do ácido hialurónico, e por essa razão, foram utilizados como a base com o objectivo de se obter informação acerca dos protões de TSP envolvidos na interacção com HA.

Em especial, o protão a 4,45 ppm correspondentes às unidades de Glucose e da Galactose comportam-se de um modo completamente dos restantes protões. De facto, o seu valor depende pouco da concentração absoluta da componente pura dissolvida. Modifica-se é de um modo significativo na presença de HA; em especial, e de modo diferente em relação aos outros protões, ele sofre um aumento significativo quando aumenta o conteúdo em HA. Este comportamento tem que ser atribuído a alterações conformacionais induzidas no TSP em consequência da sua interacção com o HA.

Conclusões

Os resultados dos estudos de RMN que se descreveram sinteticamente acima mostram claramente que a interacção entre o TSP e o HA se torna de tipo cooperativo dependendo da razão ponderal entre os dois polímeros. Uma tal interacção leva a variações conformacionais que dizem sobretudo respeito às unidades internas de glucose e de galactose do TSP e aos grupos acetilo do HA. Os grupos carboxilo do HA ele próprio, por outro lado, não parecem ser influenciados. Estes últimos, provavelmente, estando presentes sob a forma iónica, tendem sempre a dispor-se em

frente da fase em vez do TSP com o qual o HA interactua. Esta última conclusão recebe apoio do pequeno efeito sobre o desvio químico do sódio em consequência das variações da concentração total e dos valores da razão entre os dois polímeros.

O efeito da interacção sobre a capacidade dos dois polímeros para se ligarem à água é muito importante: isto é mais notável nas misturas face aos polímeros puros. Os estudos que foram feitos mostram claramente a existência de um intervalo de valores do quociente TSP/HÁ, compreendido entre 3:2 e 4:1, no qual a capacidade das misturas para incorporar água se torna muito grande. Este tipo de propriedade parece ser fundamental para os objectivos de características adesivas e biocompatíveis da mistura de polímeros resultante.

Avaliação da eficácia de misturas de HA e TSP num modelo em animal, em comparação com uma preparação existente no mercado como lágrima artificial

Uma das assunções para a aplicação de lágrimas artificiais é um estado normal da película de lágrimas. Os olhos apresentam cada vez mais amiúde problemas de lacrimação, também devido à utilização de terminais de vídeo, à poluição atmosférica, à alimentação e às alergias ambientais que afectam a qualidade e a quantidade das lágrimas e, consequentemente, a possibilidade de se aplicarem lentes de contacto. A este respeito, deve anotar-

se que uma alteração da película de lágrimas conduz inevitavelmente a uma recusa definitiva da terapia com lágrimas artificiais.

Atenta a administração prolongada de um produto para utilização tópica, tal como lágrimas artificiais, é especialmente importante que existam testes disponíveis que possam garantir a ausência de efeitos colaterais de monta, tais como a opacificação da lente e o sofrimento da rotina.

Na primeira secção dos ensaios pré-clínicos levados a cabo, avaliaram-se a eficácia e os possíveis efeitos colaterais do produto proposto de acordo com a invenção comparando-os com cinco outros produtos que já estão no mercado, num modelo em animais saudáveis; na segunda secção, em vez disto, explora-se um modelo patológico adequado para se investigar em mais pormenor as reais vantagens envolvidas no tratamento com lágrimas artificiais.

Teste de Lacrimação

O **Teste de Schirmer I** envolve a introdução de uma fita de papel *bibula*, de material e dimensão padrão, no fórnice inferior da conjuntiva, na direcção do canto externo do olho. Deixa-se a fita *in situ* durante um período de tempo previamente determinado (3 minutos) e depois desse período mede-se a parte encharcada, excluindo a porção dobrada. O período que o fluido lacrimal levou para

ascender e o comprimento em mm da porção do papel encharcada pelas lágrimas proporcionam a intensidade da secreção de lágrimas.

Na prática diária, é possível levar-se a cabo o teste durante um período de tempo de 1 minuto, multiplicando-se por 3 o valor obtido. Em seguida compara-se o resultado - que está menos afectado pela lacrimação reflexa - com os valores definidos por Schrimmer. Considera-se patológica uma porção encharcada de menos do que 5 mm (em 5 minutos).

A **avaliação do pH**, que se leva a cabo utilizando um papel indicador adequado, é um teste importante para revelar quaisquer alterações patológicas do epitélio. Os valores normais do pH das lágrimas humanas são de entre 6,8 e 7,4, enquanto no rato esses valores são algo superiores (entre 7 e 8). No entanto, num estado patológico, o fluido lacrimal torna-se básico.

O **Teste de Cristalização em fetos** foi descrito na secção introdutória, de um modo geral.

O **exame da córnea** inclui a **marcação com fluoresceína sódica**, depois da qual se examina a superfície da córnea com o microscópio de fluorescência. Uma marcação macular revela a presença de zonas secas na superfície ocular, sintoma de secura da córnea. A **marcação com verde de Lissamina**, em vez disto, permite revelar a presença de zonas ulceradas ou necróticas na superfície ocular.

Execução das experiências

A experimentação incluiu a preparação dos seguintes grupos experimentais, cada um dos quais constituído por 3 ratos albinos (= 6 olhos).

1. grupo de controlo
2. composição de acordo com a invenção (0,4% de ácido hialurónico + 0,2% de TSP): (**TSP+HA**)
3. mistura de glicóis com hidroxipropil-guar (frasco multidose Systane, Alcon): **Goma de Guar**)
4. ácido hialurónico a 0,15% (monodose Blu Yal, Sooft): (**HA 0,15%**)
5. ácido hialurónico a 0,4% (monodose Dropstar; Farmigea): (**HA 0,4%**)
6. galactoxiloglucano (monodose de TSP a 0,2%, Farmigea): (**TSP 0,2%**)
7. carboximetilcelulose sódica a 0,5% (monodose Celluvisc, Allergan): (**CMC 0,5%**)
8. ácido hialurónico a 0,2% (Hyalistil 0.%, Sifi): (**HA 0,2%**)

Fase 1

Durante a primeira fase experimental, avaliou-se a qualidade dos produtos num a modelo em animais saudáveis; trataram-se os animais com as soluções respectivas 3 vezes

ao dia durante 5 dias. Levaram-se a cabo testes das seguintes modalidades.

Levou-se a cabo o **Teste de Schirmer I** passados 2, 3, 4, e 5 dias, depois da administração de atropina, em ambos os olhos de todos os animais, mantendo-se durante 3 minutos as fitas de papel bibula no terço externo do fórnice da conjuntiva. A **medição do pH** foi levada a cabo no dia 0 e no dia 5 utilizando o papel indicador adequado. O **Teste de Ferring** (cristalização em fetos) foi levado a cabo em amostras de película de lágrimas dos animais tratados com as diversas formulações no dia 5, misturando-se 10 µL de cada formulação com 2 µL de lágrimas artificiais. Examinou-se a mistura com um microscópio, à temperatura ambiente ($20 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Examinou-se a córnea passados 3, 4 e 5 dias, depois da administração de atropina. Depois de se marcar com fluoresceína e Verde de Lissamina, observou-se a superfície da córnea utilizando uma lâmpada e filtros apropriados.

Os resultados do teste de Schrimer não mostravam quaisquer diferenças quantitativas de volume de lágrimas após o tratamento dos animais com a composição da invenção e com os outros produtos que já estão disponíveis no mercado. Além disto, as avaliações do pH das lágrimas não mostraram quaisquer variações patológicas, nem para o produto de acordo com a invenção, nem para nenhum dos outros produtos que se estavam a examinar. Nem o exame da córnea depois de uma marcação com fluoresceína e com Verde de Lissamina mostrou quaisquer alterações patológicas da

córnea depois do tratamento com o produto de acordo com a invenção, nem analogamente depois dos tratamentos com as outras substâncias já disponíveis no mercado. Os testes de cristalização em fetos proporcionaram imagens das lágrimas cristalizadas, que não mostram diferenças essenciais entre os diversos tratamentos que se estavam a comparar.

Os testes da Fase 1 demonstraram portanto a ausência de interacções negativas entre a composição proposta e o estado fisiológico da conjuntiva e da córnea, do mesmo modo que acontecia para as outras formulações já disponíveis no mercado.

Fase 2

Nesta fase experimental avaliaram-se diferentes modelos em animais possíveis, e montou-se um modelo de olhos secos no rato albino, o qual envolve a utilização de três ciclos de 2,5 h, constituídos do seguinte modo:

T0 (0 minutos): injecção intraperitoneal de 4 mg/kg de atropina e aplicação tópica de atropina a 1%

T1 (40 minutos): Anestesia com hidrato de clorálio a 8,5% e exposição a um caudal contínuo e constante de ar seco durante 1 h.

T2 (100 minutos): Final do caudal de ar.

T3 (130 minutos): Atropina a 1% tópica

T4 (150 minutos): Final do ciclo.

Os animais tratados com as lágrimas em estudo receberam uma administração tópica das formulações passados 30 minutos entre T0 e T2.

A avaliação pelo teste de Schirmer mostra uma hiper-lacrimação no final dos três ciclos, a título de resposta, sobretudo do tipo lacrimatória-exsudativa. Mesmo que tenha sido impossível detectar diferenças significativas por causa da elevada variabilidade que se encontrou entre os animais, era evidente uma tendência diminuída devido à composição (TSP+HA) de acordo com a invenção e ao TSP a 0,5%. Esta tendência aponta para uma melhor protecção contra os estímulos nocivos. A avaliação do pH das lágrimas não demonstrou nenhuma alterações patológicas ao fim dos três ciclos, para nenhum dos grupos experimentais.

No que toca ao teste de cristalização, embora não fossem aparentes nenhuma diferenças significativas entre os grupos em teste, é possível confirmar a presença das propriedades protectoras para alguns dos produtos, incluindo a composição da invenção, em comparação com o grupo de controlo.

O resultado do **teste da córnea** com fluoresceína com Verde de Lissamina, avaliado como uma percentagem da superfície da córnea afectada por uma lesão ulcerosa ou necrótica, mostrou uma protecção semelhante nas diversas formulações face às lesões induzidas ao executar os três ciclos descritos acima.

Em conclusão, os testes descritos acima demonstraram não só a ausência de interacções negativas entre a composição de acordo com a invenção e o estado fisiológico da conjuntiva e da córnea (Fase 1), como também uma melhor recuperação das lesões histo-fisiológicas a seguir a uma forte diminuição da lacrimação. Os testes referidos permitem estabelecer que a combinação proposta demonstra as características adequadas para a sua utilização válida a título de lágrimas artificiais e no tratamento da síndrome de olhos secos.

Estudo clínico piloto sobre a eficácia de misturas
ou uma a combinação de TSP a 0,2% HÁ a 0,4% HÁ, no
tratamento da síndrome de olhos secos

Para se avaliar a eficácia de uma combinação de TSP com HA no tratamento da síndrome de olhos secos, levou-se a cabo um ensaio clínico preliminar sobre vinte e um sujeitos (21) de ambos os sexos (42 olhos). Os critérios para inclusão na experiência eram a ausência de infecções oculares, a ausência de patologias oculares diferentes da de olhos secos (com a excepção de alterações da refracção) e a ausência de utilização de lentes de contacto.

O teste consistiu num teste aleatorizado com rótulo aberto em três grupos em paralelo, com avaliação às cegas, sem o passo de lavagem final, em que os produtos administrados a título de lágrimas artificiais foram os seguintes:

- Grupo em estudo: Mistura de duas porções com igual massa, de solução oftálmica de TSP (TSP a 0,2%) e solução oftálmica de HA (HA a 0,4%), referida adiante como "**TSP+HA**";
- 1º grupo de controlo: solução oftálmica de TSP a 0,2% TSP (TSP, Farmigea), referida adiante como "**TSP**";
- 2º grupo de controlo: solução oftálmica de HA a 0,4% (Dropstar, Farmigea), referida adiante como "**HA**".

Na altura da distribuição aleatória, o técnico ocular instruiu os pacientes a instilarem eles próprios duas gotas, duas vezes ao dia, directamente sobre o saco da conjuntiva, de qualquer um dos três produtos que estavam a ser comparados.

A título de **ponto final primário do teste**, determinou-se a variação da classificação do números de microvilosidades da conjuntiva, do princípio para o fim do tratamento. A título de **pontos finais secundários**, utilizaram-se e determinaram-se a variação de classificação da sintomatologia subjectiva, da sintomatologia objectiva, do perfil citológico da conjuntiva (esfregaço), da classificação composta (tal como se define adiante) e da tolerabilidade e da segurança do produto.

As avaliações da sintomatologia subjectiva, da sintomatologia objectiva, da tolerabilidade e da segurança

foram levadas a cabo em aberto, enquanto a avaliação da citologia da conjuntiva e a das microvilosidades foram levadas a cabo às cegas, por um observador que ignorava qual o tratamento associado a cada sujeito.

A duração total do tratamento foi de 60 dias (\pm 8 dias) para todos os grupos de pacientes.

Avaliações

Avaliação das microvilosidades - Os efeitos do tratamento sobre as microvilosidades foram avaliados por microscopia electrónica de varrimento (SEM). Para cada olho examinado forma determinados pontos de referência utilizando uma rede vascular, para se levarem a cabo as colheitas de amostras de base e final na mesma área. Obteve-se uma amostra de epitélio, em separado para cada olho, a partir da conjuntiva bulbar superior temporal, utilizando a técnica de "citologia de impressão".

A colheita foi efectuada entre no mínimo de 48 horas e o máximo de 7 dias após o exame oftalmoscópico. Na mesma sessão em que se obteve a amostra para o estudo das microvilosidades, uns minutos antes, foi feito um esfregão da conjuntiva para a avaliação citológica.

Trataram-se então as amostras e fixaram-se para um exame por SEM, medindo-se utilizando uma escala de 4 pontos (de 1 a 4).

Sintomatologia subjectiva - Este foi o primeiro dos parâmetros avaliado durante cada visita (de base ou final), quando ao paciente era solicitado que referisse o grau subjectivo de incômodo sofrido durante a última semana, relativamente aos seguintes sintomas oculares durante a semana anterior: comichão, sensação de queimadura, irritação, lacrimação. Com base na informação directa proporcionada pelo paciente, o médico ligado à experimentação converteu a intensidade total do desconforto ocular usando uma escala analógica de 4 pontos (de 1 a 4), em que o grau 1 representava a ausência de sintomas, o grau 2 uma sintomatologia leve, o grau 3 uma sintomatologia moderada e o grau 4 representava a sintomatologia mais severa.

Sintomatologia objectiva - Determinou-se o sofrimento epitelial e a possível extensão das lesões querato-conjuntivais depois da avaliação subjectiva. A avaliação foi feita pelo oculista, depois da determinação da sintomatologia subjectiva, com uma lâmpada de ranhura e com fluoresceína, medindo-se com uma escala analógica de 4 pontos (de 1 a 4) baseados nos seguintes critérios: grau 1, sofrimento epitelial ausente ou limitado a um único quadrante; grau 2, sofrimento epitelial limitado a dois quadrantes; grau 3, sofrimento epitelial que afectasse claramente dois quadrantes existindo sinais adicionais de sofrimento nos outros quadrantes; grau 4, o sofrimento epitelial estendia-se a toda a superfície ocular.

Citologia da conjuntiva - a componente inflamatória celular foi obtida da conjuntiva por esfregaço e sem anestesia, fixada com solução de May-Grunwald (eosinato de azul de metileno) disponível no mercado.

Obteve-se o esfregaço entre 2 e 7 dias depois do exame oftalmoscópico, durante a mesma sessão em que se levou a cabo a obtenção da amostra para o estudo das microvilosidades.

Corou-se o *slide* no laboratório e observou-se com um microscópio ótico. A avaliação foi levada a cabo às cegas com base numa escala de 4 pontos: 1 = só células epiteliais e/ou linfócitos (+); 2 = linfócitos (+), neutrófilos (+); 3 = linfócitos (++), neutrófilos (++); 4 = linfócitos (++), neutrófilos (++) e/ou eosinófilos (+).

Classificação composta - representa a soma dos quatro parâmetros descritos acima e foi avaliada como sendo um índice sucedâneo de uma eficácia global.

Segurança e tolerabilidade - Determinaram-se segurança e tolerabilidade dos produtos objecto do estudo a partir de questões directamente postas pelo médico ao paciente.

Efeitos sobre as microvilosidades

Tal como se afirmou, os efeitos do tratamento sobre as microvilosidades fotografadas com microscopia de

varrimento electrónico, foram determinados avaliando-os com uma escala de 4 pontos. Antes da distribuição aleatória, os três grupos eram bastante homogéneos, tendo o grupo "TSP" uma classificação média de 3,0, e os grupos "TSP+HA" e "HA", uma classificação média de 3,3. Além disto a dispersão dos dados parecia ser moderada, o coeficiente de variação sendo de 26% vs 22% vs 22%, respectivamente para TSP, TSP+HA, HA.

TABELA 1

Microvilosidades - Comparação anterior e posterior dos valores médios						
	TSP		TSP+HA		HA	
	Basal	Dia 60	Basal	Dia 60	Basal	Dia 60
N	14	14	14	14	14	14
Min	2	1	2	1	2	2
Max	4	4	4	3	4	4
Média	3,0	2,7	3,3	1,4	3,3	3,0
Desv. Padr.	0,8	0,9	0,7	0,6	0,7	0,8
Coef. Var.	0,26	0,34	0,22	0,45	0,22	0,26
p (Wilcoxon)	0,602		<0,0001		0,219	

Tal como se ilustra na Tabela 1 e nos histogramas das Figuras 1 e 2, passados 60 dias de tratamento no grupo TSP, observou-se uma ligeira melhoria do número das microvilosidades da conjuntiva (-0,3 pontos), igual a -9,5% no que toca ao valor basal (NS no teste de Wilcoxon). De forma semelhante, o comportamento no grupo tratado com HA no qual, passados 60 dias, se observou uma melhoria de 0,3

pontos, igual a -8,7% no que toca ao valor basal (NS no teste de Wilcoxon).

No grupo tratado com TSP+HA observou-se, ao invés, uma melhoria média mais do que 5 vezes maior, com uma classificação que se aproximava da de normalidade de 1,9 pontos, igual a uma melhoria percentual de 56,5% em relação ao valor basal ($p<0,0001$ no teste de Wilcoxon).

Tal como se mostra na Tabela 2 que se segue, à diferença de quanto ocorria nos olhos tratados apenas com TSP ou apenas com HA, todos os 14 olhos tratados com TSP+HA apresentavam, passados 60 dias, uma melhoria de classificação (de entre 1 e 3 pontos).

TABELA 2

	TSP a 0,2%		TSP a 0,2%/HA a 0,4%		HA a 0,4%	
3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
2	1	7,1%	0	0,0%	0	0,0%
1	2	14,3%	0	0,0%	1	7,1%
0	5	35,7%	0	0,0%	8	57,1%
-1	4	28,6%	6	42,9%	5	35,7%
-2	2	14,3%	4	28,6%	0	0,0%
-3	0	0,0%	4	28,6%	0	0,0%

Para a análise estatística, o teste de significância de Kruskal-Wallis foi aplicado aos valores absolutos das diferenças entre as observações, basal e final. Embora o número de amostras examinadas tenha sido

relativamente limitado, a análise mostrou uma diferença muito significativa do ponto de vista estatístico, entre os grupos em tratamento ($p<0,0001$).

Vejam-se as **Figuras 3 e 4** apenas que mostram, utilizando um microscópio electrónico de varrimento, o desenvolvimento da presença de microvilosidades no epitélio da conjuntiva num paciente do sexo feminino com 64 anos de idade, tratado durante 60 dias com TSP+HA. A **Figura 3** permite avaliar uma superfície epitelial glabra devido à quase completa ausência de microvilosidades; com base nos critérios descritos acima, este quadro histológico foi atribuída uma classificação de 4 (diminuição máxima da presença de microvilosidades). No mesmo paciente, na mesma zona da conjuntiva do mesmo olho, a **Figura 4** mostra uma vegetação rica em microvilosidades, o que permite atribuir a este quadro uma classificação de 1, substancialmente típica de um estado normal.

Tal como se assinalou na Tabela 2, no grupo tratado com TSP+HA, **4 olhos** (28,6%), em 3 sujeitos, demonstravam uma melhoria na classificação das microvilosidades igual a 3, enquanto o mesmo número de olhos mostrava uma melhoria de classificação de 2 pontos. Seis olhos (42,9%) mostravam uma melhoria de classificação igual a 1 ponto.

Efeitos sobre a sintomatologia subjectiva

A intensidade da sintomatologia subjectiva foi determinada com uma escala analógica de 4 pontos, sob a

forma de intensidade do incômodo ocular, tal como se descreveu acima. No valor basal, os três grupos apresentavam uma homogeneidade relativa, tanto do ponto de vista dos valores absolutos das classificações (com um desvio médio máximo de 0,3 pontos), como nos valores da dispersão, medidos sob a forma do coeficiente de variação (33% vs 12% vs 29%, respectivamente para TSP, TSP+HA e HA).

TABELA 3

Sintomatologia subjectiva - Comparaçao dos valores médios antes e depois						
	TSP		TSP+HA		HA	
	Basal	Dia 60	Basal	Dia 60	Basal	Dia 60
N	114	114	114	114	114	114
Min	1	1	2	1	1	2
Max	4	4	3	4	4	4
Média	2,6	2,6	2,9	1,9	2,8	2,6
Desv. Padr.	0,9	0,9	0,4	1,1	0,8	0,6
Coef. var.	0,33	0,33	0,13	0,59	0,29	0,25
p (Wilcoxon)	1,000		0,014		0,375	

Passados 60 dias de tratamento, tal como se ilustra nos histogramas das **Figuras 5 e 6**, não se observou qualquer variação da sintomatologia subjectiva no grupo a TSP, permanecendo a classificação com o valor de 2,6, enquanto o grupo tratado com HA demonstrou uma pequena melhoria, não relevante estatisticamente, igual a -0,2 pontos na classificação média (-7,7%).

A melhoria do grupo tratado com TSP+HÁ foi sensivelmente mais evidente, e estatisticamente relevante no teste de Wilcoxon, demonstrando uma diminuição da classificação média de 1,0 ponto, igual a 35,0% do valor basal.

Tal como se mostra na Tabela 4 adiante, só dois olhos dos 14 em tratamento com TSP+HA mostraram uma classificação pior da sintomatologia subjectiva e um permaneceu igual, enquanto 6 e 5 olhos registaram melhorias de, respectivamente, 1 e 2 pontos.

TABELA 4

	TSP a 0,2%		TSP a 0,2%/HA a 0,4%		HA a 0,4%	
3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
2	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
1	3	21,4%	2	14,3%	1	7,1%
0	8	57,1%	1	7,1%	9	64,3%
-1	3	21,4%	6	42,9%	4	28,6%
-2	0	0,0%	5	35,7%	0	0,0%
-3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

A análise estatística foi levada a cabo aplicando o teste de Kruskal-Wallis aos valores absolutos das diferenças entre as observações, basal e final, e mostrava uma diferença estatisticamente significativa entre os três grupos ($p=0,005$).

Efeitos sobre a sintomatologia objectiva

Mediu-se a sintomatologia objectiva numa escala de 4 pontos avaliando o grau de afecção de 4 sectores da córnea e conjuntiva utilizando uma lâmpada com ranhura, tal como se descreveu acima. Nos valores basais, os três grupos apresentavam um pequeno grau de não homogeneidade, estatisticamente não relevante, sendo que a do grupo a TSP+HA com uma classificação média de 2,8, era superior em 0,3 ponto à classificação do grupo a TSP e em 0,1 ponto à do grupo a HA. Os resultados da dispersão de dados eram relativamente elevados para todos os três grupos, com coeficientes de variação de, respectivamente, 41% vs 29% vs 34%, para os grupos a TSP, TSP+HA, e HA.

TABELA 5

Sintomatologia objectiva - Comparação dos valores médios antes e depois						
	TSP		TSP+HA		HA	
	Basal	Dia 60	Basal	Dia 60	Basal	Dia 60
N	14	14	14	14	14	14
Min	1	1	1	1	1	1
Max	4	4	4	3	4	4
Média	2,5	2,2	2,8	1,9	2,7	2,6
Desv. Padr.	1,0	1,0	0,8	0,8	0,9	0,8
Coef. Var.	0,41	0,44	0,29	0,41	0,34	0,29
p (Wilcoxon)	0,125		0,006		0,347	

Tal como se vê melhor nos histogramas das **Figuras 7 e 8**, bem como na Tabela 5, passados 60 dias de tratamento, observou-se uma pequena melhoria da sintomatologia objectiva (-0,3 pontos), igual a 11,4%, no que toca ao valor basal do grupo TSP. O progresso no grupo tratado com HA foi inferior, mostrando este grupo após 60 dias, uma diminuição da classificação total de -0,1 ponto (-5,3%). Em ambos os casos, as diferenças não eram estatisticamente relevantes no teste de Wilcoxon.

No grupo tratado com TSP+HA, em vez disto, passados 60 dias de tratamento, observou-se a classificação média mínima, de 1,9, embora o ponto de partida fosse um valor basal ligeiramente maior. Isto é equivalente a uma melhoria de -0,9 pontos, estatisticamente relevante, que representava uma variação de 33,3% relativamente ao valor basal.

Tal como se mostra na Tabela 6 seguinte, só um dos 14 olhos tratados com TSP+HA mostrou piorar na sua classificação da sintomatologia objectiva, um permaneceu sem variação e 12 mostravam melhoria.

TABELA 6

	TSP a 0,2%		TSP a 0,2%/HA a 0,4%		HA a 0,4%	
3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
2	0	0,0%	0	0,0%	1	7,1%

(continuação)

	TSP a 0,2%		TSP a 0,2%/HA a 0,4%		HA a 0,4%	
1	0	0,0%	1	7,1%	0	0,0%
0	10	71,4%	1	7,1%	9	64,3%
-1	4	28,6%	10	71,4%	4	28,6%
-2	0	0,0%	2	14,3%	0	0,0%
-3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

A análise estatística foi levada a cabo aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis aos valores absolutos das diferenças entre as observações, basal e final. No que toca à sintomatologia objectiva é possível confirmar que as diferenças observadas nos três grupos de pacientes são estatisticamente relevantes ($p=0,02$).

Efeitos sobre a citologia

A presença de células inflamatórias foi avaliada com uma escala de 4 pontos, de acordo com quanto se descreveu acima. Nos valores basais, antes da distribuição aleatória, os três grupos eram muito não homogéneos, embora não de uma forma estatisticamente relevante. De facto, no grupo a HA, que era o menos grave, determinou-se uma classificação média de 1,9, no grupo a TSP a classificação era de 2,1, e no grupo a TSP+HA, o mais grave, detectou-se uma classificação média de 2,7, com uma variação entre extremos de 0,9. Os dados de dispersão também aparentavam ser sensíveis, com um coeficiente de variação de 44% vs 37%

vs 55%, respectivamente para os grupos a TSP, a TSP+HA, e a HA.

TABELA 7

Citologia - Comparação dos valores médios antes e depois						
	TSP		TSP+HA		HA	
	Basal	Dia 60	Basal	Dia 60	Basal	Dia 60
N	14	14	14	14	14	14
Min	1	1	1	1	1	1
Max	4	3	4	3	4	3
Média	2,1	2,3	2,7	1,9	1,9	2,0
Desv. Padr.	0,9	0,9	1,0	0,8	1,0	0,6
Coef. Var.	0,44	0,40	0,37	0,43	0,55	0,28
P (Wilcoxon)	0,688		0,094		1,000	

A Tabela 7e as **Figuras 9 e 10** apensas mostram que, passados 60 dias de tratamento, tanto no grupo a TSP como no grupo a HA, se observava uma ligeira degradação do perfil citológico. Ao invés disso, no grupo tratado com TSP+HA, era aparente uma melhoria notável do perfil citológico, mesmo que não fosse estatisticamente relevante, passando a classificação média de 2,7 para um valor de 1,9, com uma percentagem de melhoria de 28,9% em relação ao valor basal.

Tal como se mostra na Tabela 8 adiante, 7 dos 14 olhos tratados com TSP+HA melhoraram de classificação,

passados 60 dias, enquanto 6 permaneceram inalterados, e um havia piorado.

TABELA 8

	TSP a 0,2%	TSP a 0,2%/HA a 0,4%	HA a 0,4%
3	0	0,0%	0
2	0	0,0%	0
1	4	28,6%	1
0	8	57,1%	6
-1	2	14,3%	4
-2	0	0,0%	1
-3	0	0,0%	2
			14,3%
			0
			0,0%

De uma forma análoga à dos outros parâmetros, para a análise estatística, a significância do teste de Kruskal-Wallis foi aplicada aos valores absolutos das diferenças entre as observações dos valores, basal e final. Esta análise mostrou uma diferença estatisticamente relevante entre os grupos ($p=0,031$).

Classificação Composta

Tal como se afirmou, a classificação composta representa a soma dos quatro parâmetros descritos acima (microvilosidades, sintomatologia subjectiva, sintomatologia objectiva, citologia) e é um índice dependente da eficácia global. O seu valor teórico máximo é de 16. Apesar da fonte de um possível desequilíbrio entre os grupos,

devido sobretudo à citologia, após a distribuição aleatória, ao valor basal, os dois grupos eram suficientemente homogéneos, tal como resulta da Tabela que se segue.

TABELA 9

Classificação total - Comparaçao entre os valores médios antes e depois						
	TSP		TSP+HA		HA	
	Basal	Dia 60	Basal	Dia 60	Basal	Dia 60
N	14	14	14	14	14	14
Min	6	4	8	4	5	6
Max	16	13	14	11	15	14
Média	10,2	9,8	11,6	7,1	10,6	10,1
Desv. Padr.	2,8	2,8	2,0	2,3	2,7	2,2
Coef. Var.	0,27	0,29	0,17	0,32	0,26	0,21
P (Wilcoxon)	0,555		<0,0001		0,197	

Passados 60 dias de tratamento, tal como se mostra nas **Figuras 11** e **12**, no grupo a TSP, não se detectaram variações substanciais em relação aos valores basais. Verificou-se um comportamento análogo no grupo tratado com HA, no qual, passados 60 dias, ocorreu uma melhoria de 0,5 pontos, igual a -4,7% em comparação com o valor basal NS).

A melhoria observada no grupo tratado com TSP+HA foi cerca de 10 vezes superior e estatisticamente era

altamente relevante, com -4,5 pontos, igual a 39,3% face ao valor basal. A melhoria revelou ser altamente relevante no teste de Wilcoxon.

Também em quanto diz respeito à classificação composta, para a análise estatística aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis sobre os valores absolutos das diferenças entre as observações, basal e final, de que resultou uma significância elevada ($p<0,0001$).

Segurança e tolerabilidade

Em nenhum dos tratamentos utilizados neste estudo piloto foi descrito qualquer problema ligado à tolerabilidade nem à segurança local ou sistémica, com excepção de uma informação transmitida acerca de uma visão turva transitória associada à instilação dos produtos, que normalmente durava uns poucos minutos. Este tipo de efeitos, também conhecidos a respeito de outros substitutos de lágrimas, não revelava qualquer diferença entre os três grupos.

Conclusões

Com base nos resultados do estudo, é possível concluir que existe uma quantidade suficiente de dados clínicos, também suportados por avaliações levadas a cabo por microscopia electrónica de varrimento, de que a combinação de TSP com ácido hialurónico no mesmo produto

oftálmico origina um efeito de sinergia, obtendo-se resultados que não se podem obter quando ambos os produtos são administrados individualmente.

Estes dados microscópicos indicam que com base no efeito de sinergia existe uma melhoria rápida do estado do epitélio da conjuntiva que, exposto à combinação de HA e, resulta numa regeneração de microvilosidades. Por seu turno, os efeitos sobre o epitélio da conjuntiva produzem uma melhoria dos sintomas subjectivos e objectivos que caracterizam a síndrome de olhos secos.

A invenção presente foi descrita fazendo-se uma referência específica a algumas suas concretizações específicas, mas deve entender-se que um especialista poderá fazer modificações e alterações sem se desviar do âmbito da invenção, tal como é definido nas reivindicações apensas:

Lisboa, 11 de Maio de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Uma preparação oftálmica para utilização a título de substituto de lágrimas contendo, em combinação, entre 0,05 e 2%, em peso, de polissacárido de semente de tamarindo e entre 0,05 e 1%, em peso, de ácido hialurónico, em solução aquosa.

2. Uma preparação oftálmica de acordo com a reivindicação 1, que inclua entre 0,1 e 1%, em peso, de polissacárido de semente de tamarindo e entre 0,1 e 0,5%, em peso, de ácido hialurónico.

3. Uma preparação oftálmica de acordo com as reivindicações 1 ou 2, na qual o referido polissacárido de semente de tamarindo tenha uma massa molecular compreendida na gama de entre 450.000 Da e 750.000 Da.

4. Uma preparação oftálmica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, na qual o ácido hialurónico referido tenha uma massa molecular compreendida na gama de entre 600.000 Da e 1.000.000 Da.

5. Uma preparação oftálmica de acordo com a reivindicação 1, que inclua numa solução aquosa, 0,2%, em peso, de polissacárido de semente de tamarindo e 0,4%, em peso, de ácido hialurónico.

6. Uma preparação oftálmica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, incluindo também um ou mais agentes reguladores do tônus.

7. Uma preparação oftálmica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6, incluindo também um ou mais ácidos ou bases aceitáveis do ponto de vista oftálmico, a título de correctores do pH.

8. Uma preparação oftálmica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7, incluindo também um ou mais tampões.

9. Uma preparação oftálmica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, incluindo também um ou mais agentes conservantes.

10. Uma preparação oftálmica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-9, incluindo também um ou mais agentes quelantes.

11. A utilização de uma combinação de polissacárido de semente de tamarindo com ácido hialurónico, para a produção de um medicamento para substituir lágrimas.

12. A utilização de uma combinação de polissacárido de semente de tamarindo com ácido hialurónico numa solução aquosa, para a produção de um medicamento para o tratamento da síndrome de olhos secos.

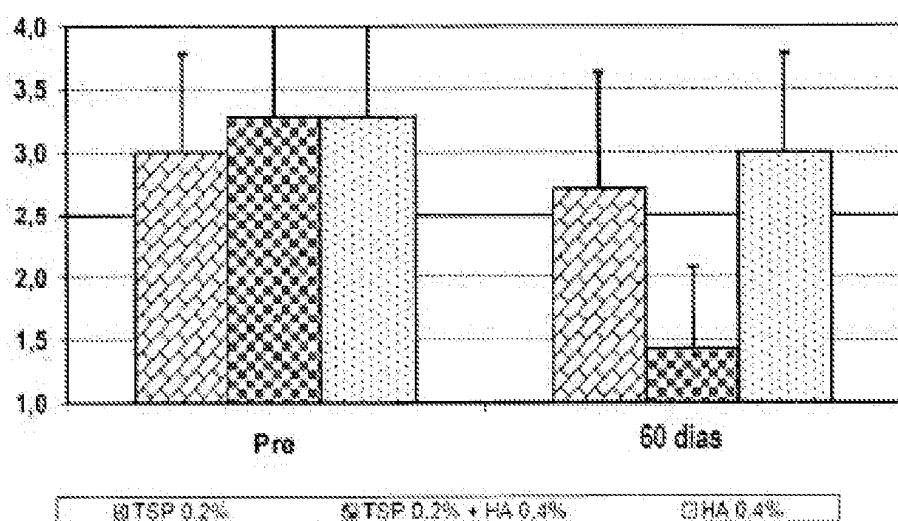
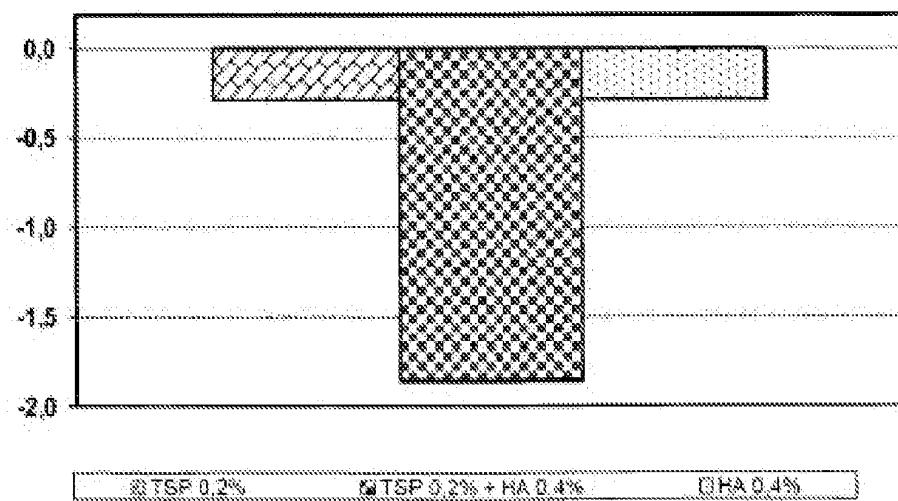
13. A utilização de acordo com as reivindicações 11 ou 12, em que o produto referido inclua 0,05 a 2%, em peso, de polissacárido de semente de tamarindo e entre 0,05 e 1%, em peso, de ácido hialurónico.

14. A utilização de acordo com a reivindicação 13, em que o produto referido contenha 0,1 a 1%, em peso, de polissacárido de semente de tamarindo e entre 0,1 e 0,5%, em peso, de ácido hialurónico.

15. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 11-14, na qual o referido polissacárido de semente de tamarindo tenha uma massa molecular compreendida na gama de entre 450.000 Da e 750.000 Da.

16. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 11-15, na qual o ácido hialurónico referido tenha uma massa molecular compreendida na gama de entre 600.000 Da e 1.000.000 Da.

Lisboa, 11 de Maio de 2011

Microvelosidades – Valores Absolutos**FIG. 1****Microvelosidades – Delta Absoluto (bas vs 60)****FIG. 2**

PE2197456

2/6

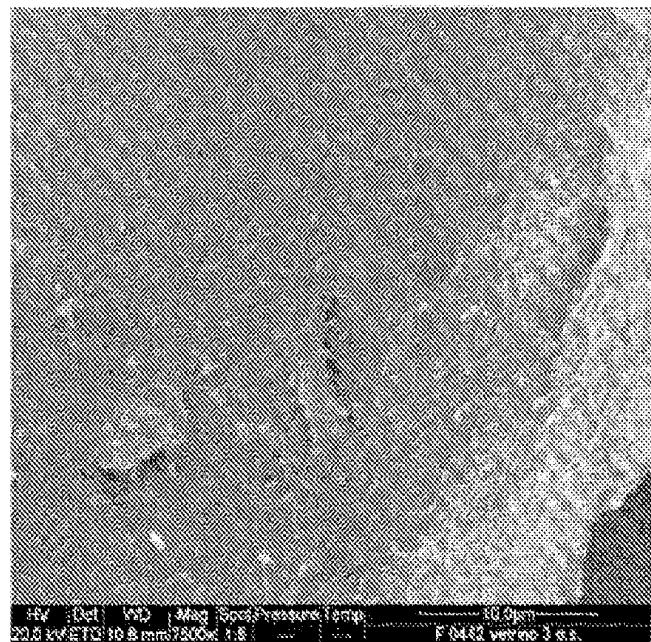


FIG. 3

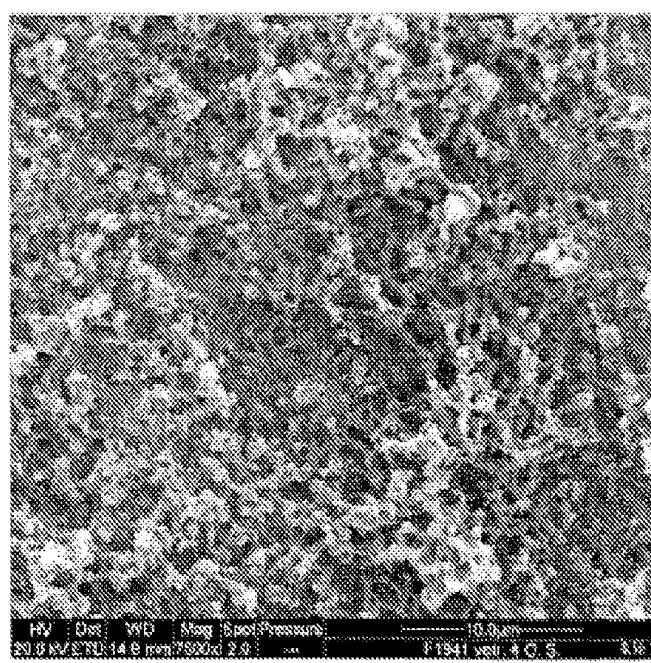
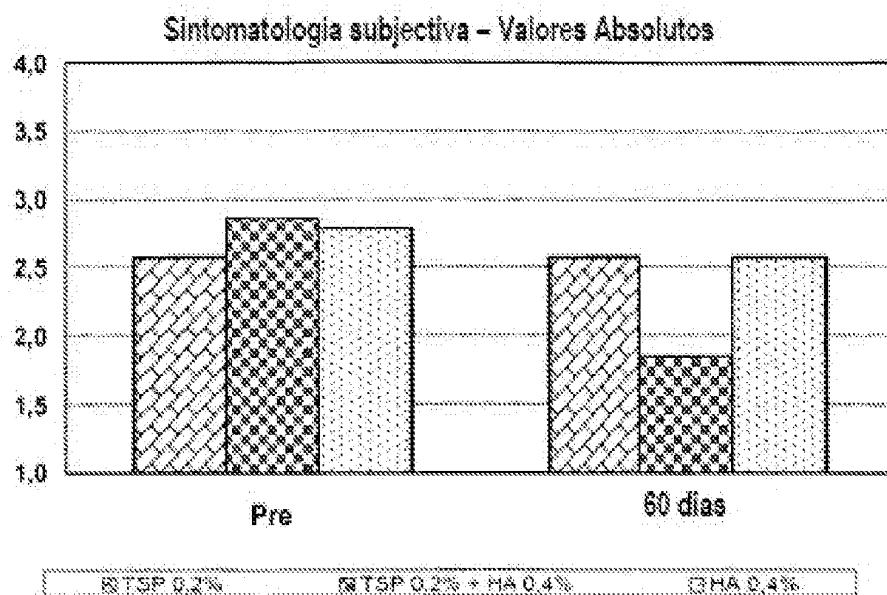
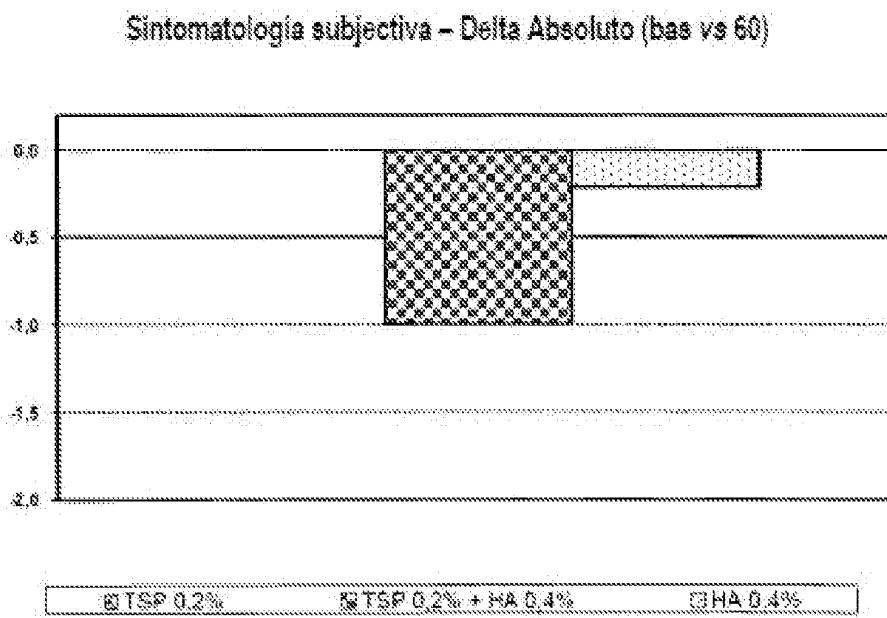


FIG. 4

**FIG. 5****FIG. 6**

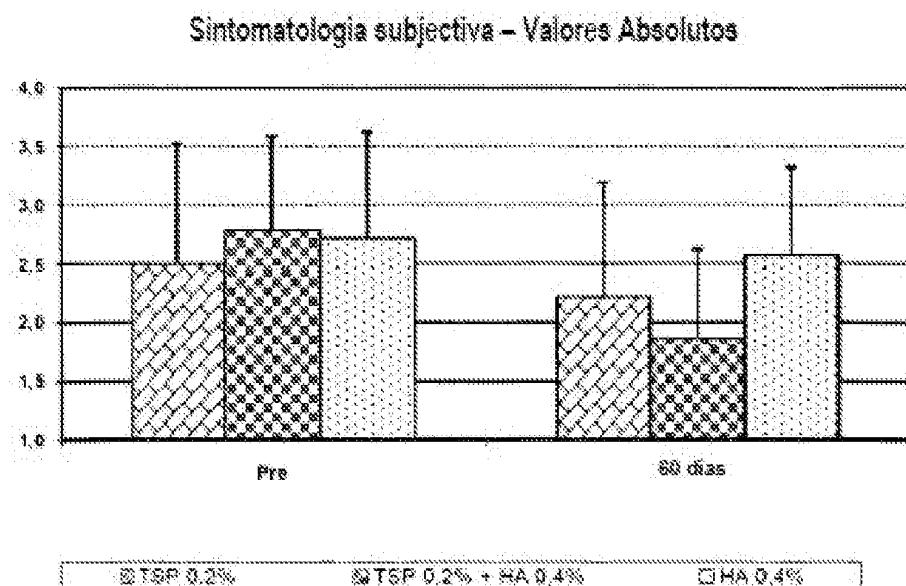


FIG. 7

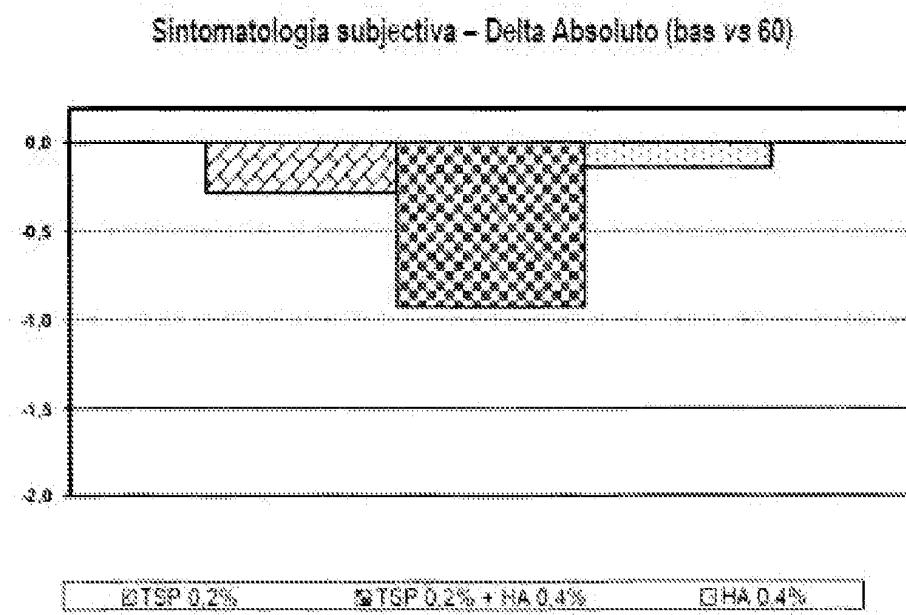
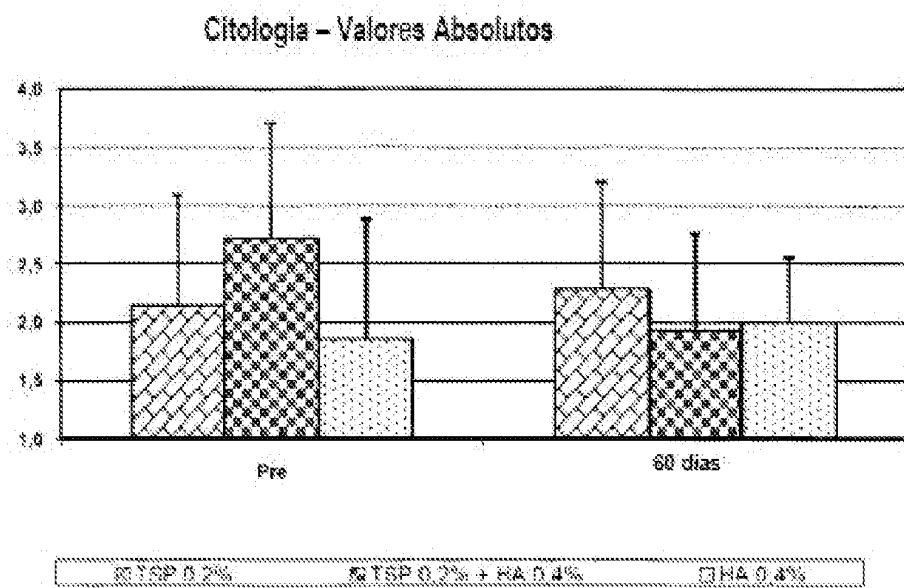
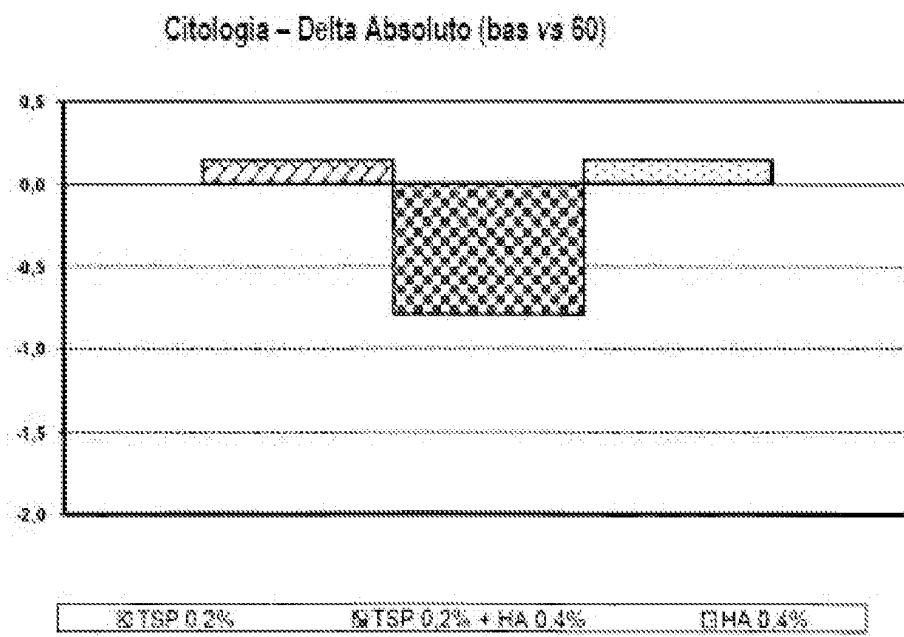


FIG. 8

**FIG. 9****FIG. 10**

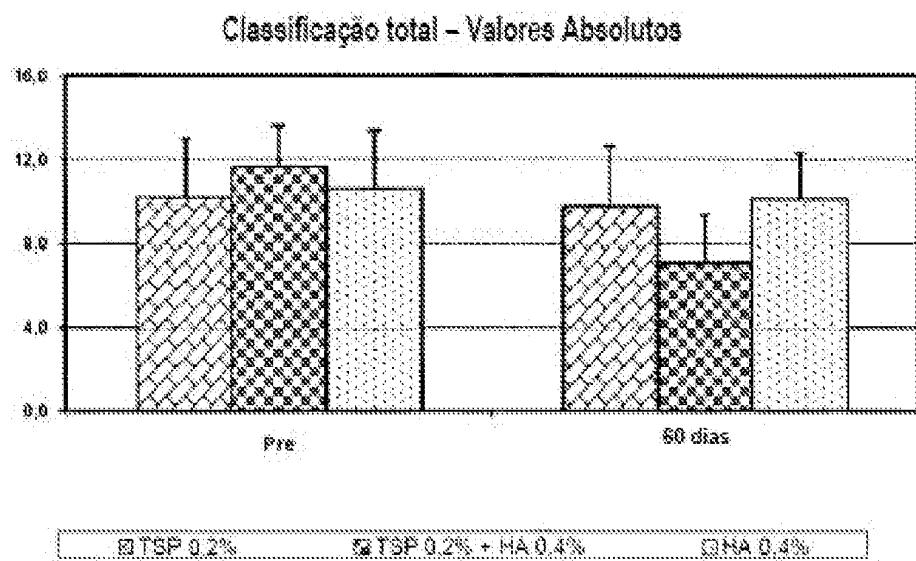


FIG. 11

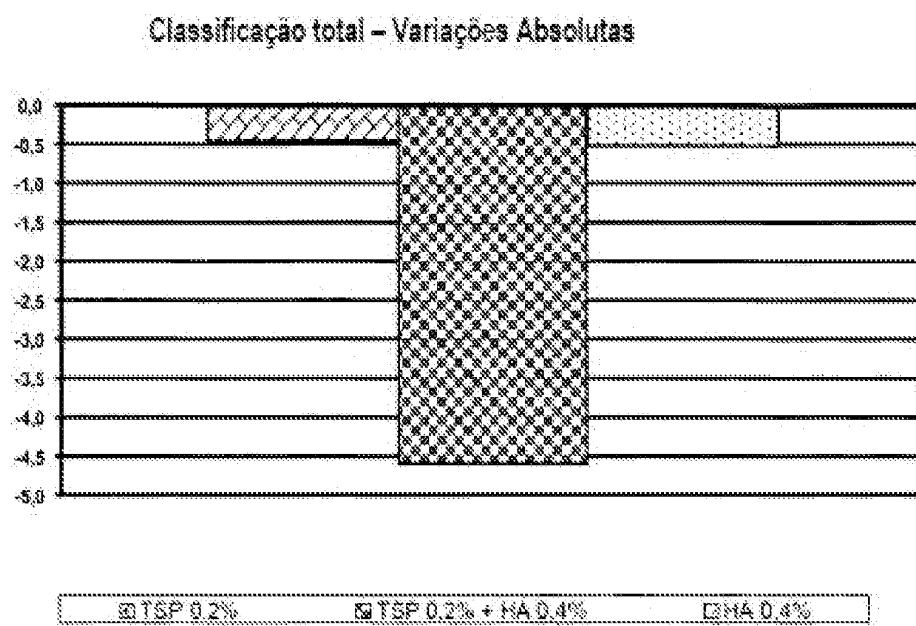


FIG. 12

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- EP 0893636 A
- US 6056850 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- Comnmo G.L.; Del Prete A.; Forte R.; Caffero G.; Del Prete S.; Marasco D. Impression cytology with scanning electron microscopy: a new method in the study of conjunctival microvilli. *Eyes*, 2007, 1-6
- Gilbard J.P.; Rossi S.R.; Gray K.L. A new rabbit model for keratoconjunctivitis sicca. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1987, vol. 28 (2), 225-228
- Gilbard J.P.; Rossi S.R.; Gray K.L.; Hanninen L.A. Natural history of disease in a rabbit model for keratoconjunctivitis sicca. *Acta Ophthalmol.*, 1988, vol. 166, 95-101
- M. Rolando ; C. Valente. Establishing the tolerability and performance of tamarind seed polysaccharide (TSP) in treating dry eye syndrome: results of a clinical study. *BMC Ophthalmology*, 2007, vol. 7, 5