

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

RUMMENIGGE OLIVEIRA SILVA

**NANOPARTÍCULA DE CRISTAL LÍQUIDO CONTENDO  
PIRFENIDONA PARA TRATAMENTO DE LESÕES DA CÓRNEA:  
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN  
VIVO***

BELO HORIZONTE-MG

2019

RUMMENIGGE OLIVEIRA SILVA

**NANOPARTÍCULA DE CRISTAL LÍQUIDO CONTENDO  
PIRFENIDONA PARA TRATAMENTO DE LESÕES DA CÓRNEA:  
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN*  
*VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior, UFMG.

BELO HORIZONTE-MG

2019

S586n Silva, Rummenigge Oliveira.  
Nanopartícula de cristal líquido contendo pirfenidona para tratamento de lesões da córnea: desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vivo* / Rummenigge Oliveira Silva. – 2019.  
89 f. : il.

Orientador: Armando da Silva Cunha Júnior.

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

1. Nanopartículas – Teses. 2. Córnea – Teses. 3. Cicatrização de feridas – Teses. 4. Tecnologia farmacêutica – Teses. 5. Medicamentos – Biodisponibilidade. 6. Nanotecnologia – Teses. I. Cunha Júnior, Armando da Silva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 615.4

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



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



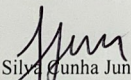
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

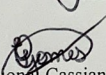
**NANOPARTÍCULA DE CRISTAL LÍQUIDO CONTENDO PIRFENIDONA PARA TRATAMENTO DE LESÕES DA CÓRNEA: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO IN VIVO**


**RUMMENIGGE OLIVEIRA SILVA**

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

Aprovada em 28 de fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Armando da Silva Cunha Junior - Orientador  
UFMG

  
Prof(a). Elvira Cassiana de Lima Gomes  
UFMG

  
Prof(a). Thais Maria da Mata Martins  
UFMG

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2019.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço á Deus por ser presença viva em todos os momentos da minha vida.

Ao professor Armando por todos os ensinamentos, confiança e por ser exemplo de amor a profissão, meu muito obrigado!

À minha mãe Mária de Lurdes por ser meu maior exemplo de altruísmo e simplicidade. Você me inspira a ser uma pessoa melhor todos os dias.

À meus irmãos, Fabíola, Maiko e em especial a José Rodrigo que me acompanhou de perto por todo esse período e me ensinou sempre a dar o melhor de mim, vocês são meu porto seguro. Obrigado a meu sobrinho Lucas por ser a luz na vida da nossa família.

Às amigas Bruna e Flávia por toda parceria e amizade nesses dois anos de mestrado que agora levo para a vida.

À Silvia por disponibilizar o laboratório de farmacotécnica da FUNED.

À Elaine, Ângelo e Carol pela ajuda nas análise de SAXS.

À todos os professors, técnicos e alunos do LTF, especialmente Mayara, Nayara, Raquel, Lays, Keren, Pedro, Carol, Grazi, Marcela, Vinicius, Cibele, Ana Luísa, Eduardo e Marjorie por todos os momentos de alegria, ensinamentos e companheirismo.

À Fernanda Boratto e Marcus pela amizade construída desde a graduação até a pós graduação.

À Nayara e Mário por serem irmãos de vida e profissão, obrigado por me fazerem enxegar a vida de forma mais leve.

As famílias Soares e Monteiro por serem minha segunda casa, obrigado por todo amor e preocupação.

Aos amigos do CSF por serem presença viva na minha vida apesar de toda distância física.

Aos amigos de longa data, Nádia, Jéssica e Camila por toda alegria e carinho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo e ao programa de Pós-Graduação, pela oportunidade.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Devido à baixa biodisponibilidade de fármacos administrados por meio de colírios (apenas 1 a 5% do fármaco é absorvida), sistemas de liberação que possibilitam uma maior permeação e tempo de permanência no local de aplicação são cada vez mais utilizados. Nesse contexto, os cristais líquidos utilizando monoleína são sistemas que controlam a liberação dos fármacos e promovem ação de bioadesão. Alguns estudos recentes demonstraram que a pirfenidona (PFD), uma droga usada para tratamento da fibrose pulmonar idiopática, apresentou resultados favoráveis no processo de cicatrização da córnea. Entretanto, a PFD exibe meia-vida curta após aplicação tópica e nesse contexto o objetivo do trabalho foi desenvolver nanopartículas de cristal líquido contendo pirfenidona (NPCLs-PFD) para tratamento de queimadura da córnea buscando aumentar a biodisponibilidade desse fármaco. As NPCLs-PFD foram preparadas usando monoleína/ácido oleico/poloxamer 107/água por um método *top-down*. As nanopartículas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de força atômica, difração de raios X de baixo ângulo (SAXS) e microscopia de luz polarizada. As NPCLs-PFD apresentaram tamanho de partícula e potencial zeta de  $247,3 \pm 0,59$  nm e  $-33,60 \pm 1,06$  mV (quando armazenadas à 4°C), respectivamente. Quando foram armazenadas à 25°C, apresentaram tamanho de partícula e potencial zeta de  $257,5 \pm 5,57$  nm e  $-46,00 \pm 2,45$  mV, respectivamente. O pH da formulação foi de  $6,9 \pm 0,01$  e a taxa de encapsulação foi de  $35,9 \pm 2,09\%$ . A formulação, quando armazenada à 4°C apresentou estabilidade durante 30 dias, de acordo com a variação do perfil de retroespalhamento, pH, tamanho e potencial zeta. Os perfis de liberação *in vitro* indicaram que as NPCLs carregadas com PFD mantiveram a liberação por mais de 6h. O estudo *in vitro* da irritação ocular usando o teste de ovos de galinha (Hen's egg chorioallantoic membrane test, HET-CAM) concluiu que os componentes de NPCLs-PFD são não irritantes e bem tolerados para administração ocular. O tempo de reepitelização da córnea após a queima química foi significativamente reduzido em coelhos tratados com NPCLs-PFD (1mg / mL) quando comparados aos controles. Além disso, a ação anti-

inflamatória da PFD foi observada pela redução da atividade de mieloperoxidase (MPO) e células inflamatórias nos tecidos de animais tratados com NPCLs-PFD. Isso sugere que as NPCLs-PFD constituem um sistema promissor visando o tratamento de lesões na córnea.

**Palavras-chave:** Pirfenidona. Nanopartículas de cristal líquido. Lesões da córnea. Cicatrização. Sistemas de liberação de fármacos.

## ABSTRACT

Due to the low bioavailability of drugs given via eye drops (only 1 to 5% of the drug is absorbed), release systems that allow for increased permeation and drug retention time are increasingly being used. In this context, liquid crystals using monolein are systems that control the release of drugs and promote bioadhesion action. Some recent studies have shown that pirfenidone (PFD), a drug used to treat idiopathic pulmonary fibrosis, has favorable results in the healing process of the cornea. However, PFD exhibits short half-life after topical application and in this context a liquid crystal nanoparticle system containing pirfenidone (PFD-LCNPs) was developed. PFD-LCNPs were prepared using monolein / oleic acid / poloxamer 107 / water by a top-down method. The nanoparticles were characterized by transmission electron microscopy, atomic force microscopy, low angle X-ray diffraction (SAXS) and polarized light microscopy. The PFD-LCNPs showed particle size and zeta potential of  $247.3 \pm 0.59$  nm and  $-33.60 \pm 1.06$  mV (when stored at  $4^\circ\text{C}$ ), respectively. When stored at  $25^\circ\text{C}$ , they had particle size and zeta potential of  $257.5 \pm 5.57$  nm and  $-46.00 \pm 2.45$  mV, respectively. The pH of the formulation was  $6.9 \pm 0.01$  and the encapsulation rate was  $35.9 \pm 2.09\%$ . The formulation when stored at  $4^\circ\text{C}$  showed stability for 30 days, according to the variation of backscattering profile, pH, particle size and zeta potential evaluated 30 days after preparation. *In vitro* release profiles indicated that PFD-LCNPs maintained the release for more than 6 h. The study of ocular irritation using the Hen's egg chorioallantoic membrane test (HET-CAM) concluded that the components of NPCLs-PFD are non-irritating and well tolerated for ocular administration. The corneal reepithelialization time after chemical burning was significantly reduced in rabbits treated with NPCLs-PFD (1mg/mL) when compared to controls. In addition, the anti-inflammatory action of pirfenidone was observed by the reduction of myeloperoxidase activity (MPO) and inflammatory cells in the histology of animals treated with PFD-LCNPs. This suggests that the PFD-LCNPs constitute a promising system for the treatment of corneal lesions.

**Key words:** Pirfenidone. Liquid crystal nanoparticles. Corneal lesions. Healing. Drug delivery systems.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Desenho esquemático dos segmentos anatômicos do olho.....	19
<b>Figura 2.</b> Desenho esquemático da estrutura anatômica e histológica da córnea.....	20
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da pirfenidona .....	27
<b>Figura 4.</b> Estrutura química da monoleína.....	31
<b>Figura 5.</b> Desenho esquemático do preparo das NPCLs-PFD.....	38
<b>Figura 6.</b> Formulação desenvolvida das NPCLs-PFD.....	38
<b>Figura 7.</b> Desenho esquemático do procedimento para determinação da eficiência de encapsulamento.....	42
<b>Figura 8.</b> A) Distribuição de tamanho de partícula das NPCLs-PFD armazenadas a 4 °C e 25 °C durante 30 dias. (B) Distribuição do potencial zeta de NPCLs-PFD armazenadas a 4 °C e 25 °C durante 30 dias. (C) pH das nanopartículas armazenadas a 4 °C e 25 °C durante 30 dias. A distribuição do tamanho de partícula e o potencial zeta foram determinados a 25 °C. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas. As análises estatísticas foram realizadas: * indica $p < 0,05$ quando comparado ao dia 0.....	46
<b>Figura 9.</b> Micrografias das NPCLs-PFD realizadas por microscópio de força atômica (A) e microscópio eletrônico de transmissão (B).....	48
<b>Figura 10.</b> Fotomicrografia das NPCLs-PFD e NPCLs-placebo em uma possível forma hexagonal usando microscopia de luz polarizada .....	49
<b>Figura 11.</b> Difratoograma de raio-X (SAXS) das NPCLs-PFD carregados com pirfenidona a 1 mg / mL e NPCLs-placebo.....	50
<b>Figura 12.</b> Perfis de liberação in vitro da pirfenidona em solução e do sistema NPCLs-PFD (n = 3).....	52
<b>Figura 13.</b> Perfis de retroespalhamento a 25 °C de formulações de NPCLs-PFD analisadas pelo equipamento Turbiscan Lab®. (A) NPCLs-PFD armazenadas a	

4 °C e analisadas dentro de um período de até 28 dias após a preparação. (B) NPCLs-PFD armazenadas a 25 °C e analisadas dentro de um período de até 29 dias após a preparação.....54

**Figura 14.** Sequência de fotografias ilustrando o efeito de 100µL de NaOH 0,1 M (controle positivo), NaCl a 0,9% + CMC a 0,5% (controle negativo), NPCLs-placebo (veículo), PFD solução á 1 mg/mL e NPCLs-PFD a 1 mg/mL na membrana ao longo de um período de 5 min.....63

**Figura 15.** Efeito das NPCLs-PFD a 1mg/mL na cicatrização da córnea após queimadura química: (A) Figuras representativas das córneas tratadas com NPCLs-placebo, solução de PFD a 1 mg/mL e NPCLs-PFD a 1 mg/mL durante 84h. (B) O tempo de reepitelização da córnea foi reduzido quando administrada as NPCLs-PFD a 1mg/mL comparado ao grupo tratado com as NPCLs-placebo após 72 h (\*p <0.05) e 84 h (\*\*p <0,01). Os dados são expressos como média ± SEM, n = 5. Foi usado análise de variância unidirecional (ANOVA), seguido pelo teste de comparação Bonferroni e considerado estatisticamente significativo quando p <0,05.....66

**Figura 16.** Corte histológico da córnea de coelho excisada mostrando epitélio (EP) e estroma, corados com hematoxilina-eosina após 84 h de lesão. Os grupos (A) foram tratados apenas com veículo (NPCLs-placebo), (B) PFD solução à 1 mg/mL, (C) NPCLs-PFD a 1mg/mL e (D) córnea normal. Seta indica células inflamatórias próximas ao epitélio da córnea. Estrela indica multicamadas de células epiteliais.....69

**Figura 17** Representação gráfica da quantificação das enzimas MPO e NAG da córneas de coelhos tratados com NPCLs-placebo, solução de PFD a 1 mg/mL e NPCLs-PFD a 1 mg/mL durante 84h. (A) Análise de mieloperoxidase (MPO) após 82 horas mostrou uma redução dos níveis dessa enzima nos coelhos tratados com NPCLs-PFD a 1 mg/mL. (B) A atividade da N-acetilglucosaminidase (NAG) na córneas de coelhos após 84 horas de tratamento não mostrou diferença entre os grupos avaliados. Foi usado análise

de variância unidirecional (ANOVA), seguido pelo teste de comparação Bonferroni e considerado estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$ .....71



## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1.</b> Pontuações do Índice de Irritação Ocular (IIO).....	63
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Grau celsius
%	Porcentagem
MFA	Microscópio de força atômica
ANOVA	Análise de variância
BS	<i>Backscattering</i>
CMC	Carboximetilcelulose
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CL	Cristais Líquidos
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência
EGF	Fatores de crescimento epidérmico
EE%	Eficiência de encapsulamento
EUA	Estados Unidos da América
FC	Fatores de crescimento
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator de crescimento do fibroblasto
FCTC	Factor de Crescimento do Tecido Conjuntivo
g	Grama
h	Horas
HET-CAM	Teste de ovo de galinha-teste da membrana corioalantóica
IGF	Fatores de crescimento semelhantes à insulina
IL-6	Interleucina 6
IIO	Índice de irritação ocular
IPD	Índice de polidispersão

Kg	Quilograma
min	Minuto
mg	Miligrama
µg	Micrograma
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mm	Milímetro
MO	Monoleína
MPO	Mieloperoxidase
NAG	N-acetilglucosaminidase
NPCLs	Nanopartículas de cristal líquido
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDGF	Fatores de Crescimento Derivados de Plaquetas
PFD	Pirfenidona
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
PBS	Phosphate Buffered Saline
SAXS	Dispersão de raios-X em baixo ângulo
SCB	Sistema de classificação biofarmacêutica
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TGF- $\beta$	Fator de Necrose Tumoral Beta
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Anatomia e fisiologia da córnea.....	19
2.2 Cicatrização da córnea.....	23
2.3 Pirfenidona.....	26
2.4 Sistemas de liberação de fármacos de uso tópico.....	28
3 JUSTIFICATIVA .....	33
4 OBJETIVOS .....	35
4.1 Objetivo Geral.....	35
4.2 Objetivos Específicos.....	35
PARTE I – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE CRISTAL LÍQUIDO CONTENDO PIRFENIDONA	
1 Materiais e métodos.....	37
1.1 Materiais.....	37
1.2 Métodos.....	37
1.2.1 Preparação das NPCLs-PFD.....	37
1.2.2 Caracterizações das NPCLs desenvolvidas.....	39
1.2.2.1 Distribuição tamanho de particular, índice de polisperção e potencial zeta.....	39
1.2.2.2 Morfologia.....	39
1.2.2.3 Medida de pH.....	40
1.2.2.4 Microscopia de luz polarizada.....	40
1.2.2.5 Medida de espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS).....	40
1.2.2.6 Eficiência de encapsulação .....	41
1.2.2.7 Estudo de liberação <i>in vitro</i> .....	42
1.2.2.8 Estudo de estabilidade.....	43

1.3 Análise estatística.....	44
2 Resultados e discussão.....	45
2.1 Distribuição do tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH.....	45
2.2 Morfologia.....	47
2.3 Microscopia de luz polarizada.....	48
2.4 Medida de espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS).....	49
2.5 Eficiência de encapsulação .....	51
2.6 Estudo de liberação <i>in vitro</i> .....	51
2.7 Estudo de estabilidade.....	52
3 Conclusão.....	55
PARTE II: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E AÇÃO BIOLÓGICA DAS NANOPARTÍCULAS DE CRISTAL LÍQUIDO CONTENDO PIRFENIDONA	
1 Materiais e métodos.....	57
1.1 Materiais.....	57
1.2 Animais.....	57
1.3 Métodos.....	57
1.3.1 Teste de biocompatibilidade e tolerância ocular.....	57
1.3.2 Avaliação de tempo de reepitelização da córnea.....	59
1.3.3 Histologia.....	60
1.3.4 Análise de infiltrado celular por quantificação das enzimas MPO e NAG.....	60
1.4 Análise estatística.....	62
2 Resultados e discussão.....	63
2.1 Teste de biocompatibilidade e tolerância ocular.....	63
2.2 Avaliação de tempo de reepitelização da córnea.....	65
2.3 Histologia.....	68

2.4 Análise de infiltrado celular por quantificação das enzimas MPO e NAG.....	69
3 Conclusão.....	71
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

## 1 INTRODUÇÃO

As lesões da córnea podem sofrer cicatrização excessiva manifestada pela formação de tecido cicatricial (Braga-Mele, Chang et al. 2014). Isto é atribuído ao aumento da produção de componentes da matriz extracelular, tais como o colágeno pelas células fibroblásticas (Kenchegowda and Bazan 2010).

Na prática clínica, o segmento anterior do olho pode ser tratado com a administração de colírios, que é a forma farmacêutica mais utilizada no tratamento de doenças da córnea (Urtti 2006). Entretanto, apenas cerca de 1-5% do fármaco aplicado por meio de colírio atinge eventualmente o tecido alvo devido às perdas rápidas e extensas (Patel, Cholkar et al. 2013). Assim, as melhorias da biodisponibilidade ocular dos fármacos devem superar as restrições pré-corneais via aumento da penetração e/ou prolongamento da permanência do fármaco na córnea (Kaur and Smitha 2002).

A Pirfenidona (PFD) demonstrou atividades anti-fibróticas e anti-inflamatórias substanciais tanto *in vitro* como *in vivo* em modelos experimentais de doença em vários órgãos como pulmão, coração, fígado e rins (Antoniou 2006, Lin, Yu et al. 2009). A principal ação anti-fibrótica da PFD pode ser atribuída à inibição da sobre-expressão induzida pelo TGF- $\beta$ 1 do colágeno tipo I, que é um fator chave no desenvolvimento da fibrose pulmonar (Hisatomi, Mukae et al. 2012). Quando a PFD é administrada na forma de solução oftálmica, a mesma exibe meia-vida curta após aplicação tópica, desse modo, necessita de um sistema de liberação que prolongue a sua ação (Sun, Lin et al. 2011).

As nanopartículas de cristal líquido são dispersões compostas de bicamadas lipídicas que se dividem em contorções bicontínuas de domínios hidrófilos e hidrofóbicos interconectantes (Yang, Armitage et al. 2004). Um estudo, realizado por Gan e colaboradores (2010), demonstrou o potencial destes sistemas na área oftálmica. Os resultados preliminares obtidos pelos autores mostraram uma melhor absorção ocular e uma melhor tolerância da dexametasona e do ibuprofeno por nanopartículas de cristal líquido de

monoleína (MO)/ poloxamer 407 (Gan, Han et al. 2010).

Neste contexto, o projeto proposto tem como objetivo desenvolver e caracterizar uma nanodispersão de cristal líquido contendo pirfenidona para aplicação ocular tópica, e avaliar a eficácia do sistema e sua utilização no tratamento de lesões na córnea causadas por queimadura química.

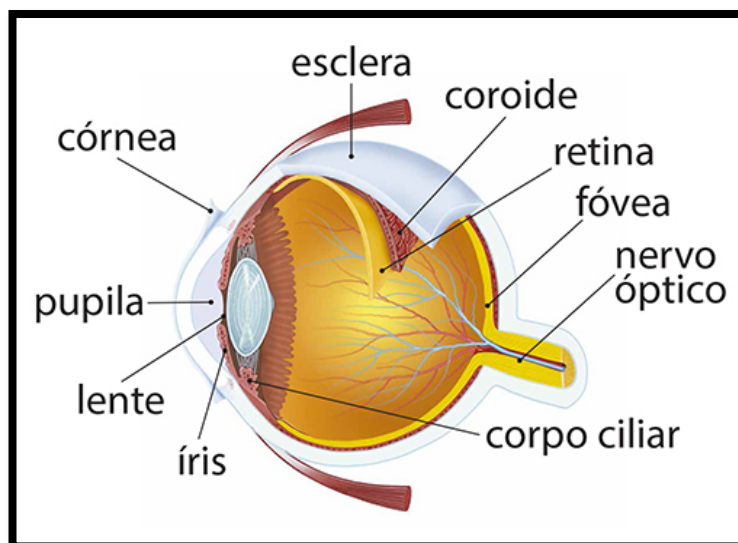


## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Anatomia e fisiologia da Córnea

O olho é um órgão delicado e complexo, com dois segmentos anatômicos principais: o segmento anterior e o segmento posterior (Figura 1). O segmento anterior é uma parte do bulbo ocular que é anterior à lente e consiste principalmente da córnea, conjuntiva, íris, lente, corpo ciliar e a porção anterior da esclera (Mas-Aixala, Gispets et al. 2016). O segmento posterior é composto por porção posterior da esclera, coróide, retina, humor vítreo, nervo óptico e retina (Nayak and Misra 2018).

**Figura 1.** Desenho esquemático dos segmentos anatômicos do olho



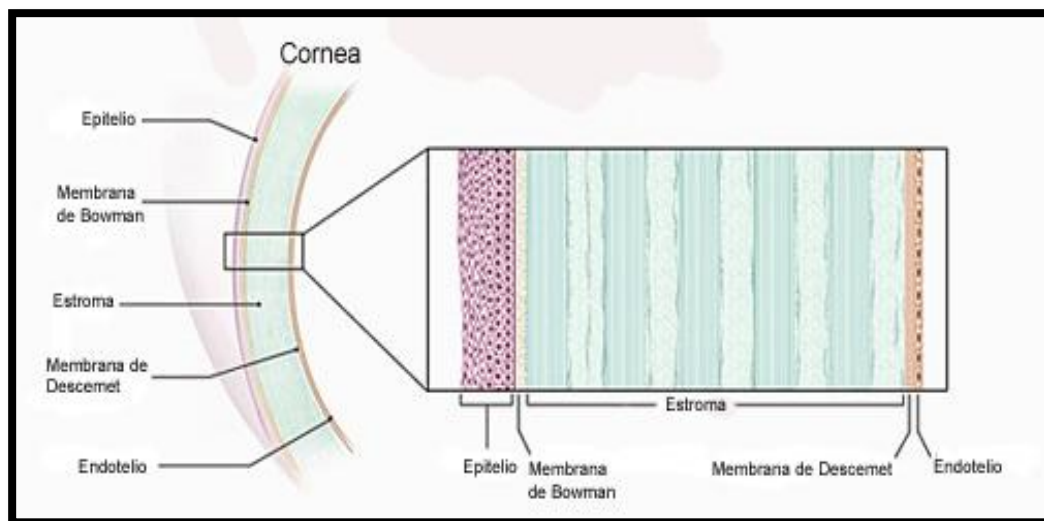
Fonte: adaptado de Nayak e Misra 2018

As doenças/distúrbios que comumente acometem o segmento anterior incluem catarata, olho seco, doenças inflamatórias, doenças infecciosas, doenças hereditárias e doenças degenerativas, glaucoma, tumores, lesões, traumas e manifestações oculares de doenças (Gan, Han et al. 2010, Bragamele, Chang et al. 2014)

A córnea, juntamente com a conjuntiva, faz parte da superfície externa do

olho. Este tecido único e transparente, em combinação com a lente, funciona para focar a luz que entra na superfície da retina. Além disso, protege o conteúdo intraocular do olho por meio da força do tecido conjuntivo e mantém o alinhamento da via óptica. A córnea humana consiste em 5 camadas reconhecidas (**Figura 2**), 3 nas quais são celulares (epitélio, estroma, endotélio) e 2 interfaces (camada de Bowman, membrana Descemet).

**Figura 2.** Desenho esquemático da estrutura anatômica e histológica da córnea



Fonte: Adaptado de <http://www.nei.nih.gov/health/cornealdisease/>

A superfície epitelial da córnea cria a primeira barreira para o ambiente externo e é parte integrante da interface filme lacrimal-córnea no qual é crítica para o poder de refração do olho. O epitélio da córnea e o filme lacrimal têm uma relação simbiótica tanto anatômica quanto fisiológica. O filme lacrimal é o principal protetor da superfície da córnea da invasão microbiana, bem como de danos químicos, tóxicos e de corpo estranho. O filme lacrimal também fornece fatores imunológicos e de crescimento que são críticos para a saúde epitelial, proliferação e reparo (Willmann and Melanson 2019).

As células epiteliais da córnea mais superficiais formam uma média de 2 a 3 camadas de células poligonais planas que possuem microvilosidades e

microplacas apicais extensas. As projeções de membrana apical dessa camada aumentam a área de contato e a aderência entre a camada mucinosa do filme lacrimal e a membrana celular. Estas células superficiais possuem junções intercelulares entre células vizinhas que impedem a entrada de substâncias estranhas. Essa barreira impede que toxinas e microorganismos entrem nas camadas mais profundas da córnea (Ehlers, Heegaard et al. 2010).

Abaixo da camada celular superficial e logo antes da camada basal mais profunda do epitélio estão as células suprabasais ou alares. Esta camada tem 2 a 3 células de profundidade e consiste de células que são menos planas do que as superficiais sobrejacentes, mas possuem junções intercelulares laterais semelhantes (DelMonte and Kim 2011).

A camada celular mais profunda do epitélio da córnea é a camada basal, que compreende uma única camada de epitélio colunar de aproximadamente 20 µm de altura. Além das células-tronco e das células amplificadoras transitórias, as células basais são as únicas células epiteliais da córnea capazes de mitose (Wiley, SundarRaj et al. 1991). Elas são a fonte das células superficiais e laterais e possuem junções intercelulares laterais caracterizadas por junções comunicantes e zônulas aderentes. As células basais estão ligadas à membrana basal subjacente por um sistema hemidesmosomal. Essas células estão aderidas à membrana basal por complexos de adesão compostos de colágeno, laminina, proteoglicanos e filamentos de queratina. As células-tronco epiteliais, que servem como uma importante fonte de novo epitélio corneano, foram localizadas no epitélio basal limbo. À medida que as células migram para a córnea central, elas se diferenciam em células amplificadoras transitórias e basais (Li, Hayashida et al. 2007).

Na córnea humana, a membrana basal está em contato com a camada de Bowman e é composta por uma região condensada de fibrilas de colágeno unidas ao estroma (DelMonte and Kim 2011).

A subjacente à camada de Bowman está localizado o estroma, o qual é composto de fibras colágenas, proteoglicanos e glicoproteínas, e representa

90% da espessura total da córnea. Embora não seja metabolicamente muito ativa, essa camada contém células chamadas de queratócitos, que são células planas e alongadas com núcleos grandes e que estão dispersas entre as fibras do estroma. As células secretam componentes do estroma e são dispostas em arranjos regulares, mantendo a transparência corneana. Os queratócitos possuem a capacidade de sofrer transformação para um fenótipo de fibroblasto em resposta a lesão da córnea ou edema (Michelacci 2003).

Imediatamente anterior à camada achatada das células endoteliais há uma camada acelular homogênea descontínua, que é chamada de membrana Descemet. A membrana Descemet é secretada pelas células endoteliais continuamente e pode apresentar uma espessura de até 10 µm (Watsky, McDermott et al. 1989).

O endotélio, é uma monocamada de células poligonais cuja função é manter a transparência da córnea bombeando continuamente a água para fora do tecido corneano. A transparência da córnea depende do alinhamento paralelo das lamelas e do espaçamento uniforme entre elas. Distribuídos entre as lamelas de colágeno estão os queratócitos, uma população de células mesenquimais, quiescentes, com morfologia dendrítica compacta (Hahnel, Somodi et al. 2000). Um aspecto incomum das células endoteliais da córnea é a sua capacidade limitada para dividir. Quando ocorre perda celular, as células restantes rapidamente se alongam para cobrir a área danificada (Minkowski, Bartels et al. 1984, Yee, Geroski et al. 1985).

A esclera é uma camada fibrosa externa, que fornece estabilidade mecânica para proteger o olho e o aparato óptico (inserções musculares extraoculares). A esclera é formada principalmente por colágeno e fibra elástica, e a irregularidade desses componentes gera a sua aparência opaca. A túnica vascular, é a camada vascular média que compreende o corpo ciliar, íris e coróide. Cada componente deste conjunto tem uma função específica. Por exemplo, a íris atua com uma abertura variável para controlar a luz que entra no olho, o corpo ciliar secreta humor aquoso e a coróide fornece nutrientes para a

retina (Gallar, Garcia de la Rubia et al. 1995, Miller, Clave et al. 2013).

A íris surge da face anterior do corpo ciliar e é uma extensão avançada da coróide. A abertura central na íris é chamada de pupila e seu diâmetro é controlado pela íris para regular a quantidade de luz que entra no olho. A íris é composta de 2 tipos de músculos, dilatador e músculos do esfíncter. O sistema nervoso simpático inerva os músculos dilatadores e o sistema nervoso parassimpático inerva os músculos esfínterianos (Cher 2012).

O corpo ciliar consiste em músculo liso, que é innervado pelo sistema nervoso parassimpático. Quando o músculo ciliar se contrai, a lente torna-se mais convexa para acomodar a visão. A outra função essencial do corpo ciliar é a produção de humor aquoso, que fornece nutrientes para o cristalino e córnea e também está envolvido na drenagem de resíduos dessas áreas (Cankaya and Ozates 2017).

A retina é a camada mais interna do olho, é considerada uma estrutura complexa que compreende várias camadas de neurônios interconectados por sinapses. As células fotorreceptoras são neurônios sensíveis à luz e compreendem bastonetes e cones (Del Amo, Rimpela et al. 2017).

## **2.2 Cicatrização da Córnea**

As queimaduras químicas oculares são responsáveis por 11,5% a 22,1% das lesões oculares em uma emergência oftálmica (Wagoner 1997). Estima-se que a taxa mundial de incidência de lesão ocular química represente mais de 350.000 novos casos de lesões por ano (Shanbhag, Saeed et al. 2018). Tais lesões são mais prevalentes entre jovens do sexo masculino com idade entre 20 e 40 anos, podendo resultar em complicações e incapacidade visual permanente. A lesão ocular química é comum e quando grave pode levar à cegueira, no qual possui um impacto significativo na qualidade de vida relacionada à visão e gera gastos substanciais para os sistemas locais de saúde (Wagoner 1997, Le, Chen et al. 2011, Haring, Sheffield et al. 2016).

Lesões oculares decorrentes de queimaduras químicas e podem ocorrer em qualquer uma das seguintes rotas: espirrando acidentalmente a substância nos olhos ou esfregando os olhos após o manuseio dos produtos químicos. Irritação do olho, vermelhidão, inchaço, dor, ardor, sensação de queimação, visão turva e perda da visão são algumas complicações da lesão ocular (Agbenorku, Akpaloo et al. 2015).

A fisiopatologia das lesões oculares causadas por queimadura química começa com uma mudança repentina do pH do tecido, seguida de alteração permanente do pH fisiológico do local. Até recentemente, a principal característica considerada para determinação da quantidade e tipo de dano tecidual era o pH do elemento causador da lesão. No entanto, foi demonstrado que outros fatores como temperatura, quantidade, concentração, coeficiente de dissociação (por exemplo, osmolaridade), potencial redox e reatividade específica com os tecidos oculares (valores de pK) podem influenciar grandemente a cascata fisiopatológica do dano químico tecidual (Pfister 1983, Schrage, Langefeld et al. 2000).

As substâncias básicas são geralmente lipofílicas e penetram nos olhos mais rapidamente em comparação com substâncias ácidas. O íon hidroxila causa saponificação de ácidos graxos nas membranas celulares, o que resulta em ruptura celular (Wagoner 1997). Uma vez que o epitélio encontra-se comprometido, a substância permeia rapidamente para os tecidos subjacentes, destruindo estruturas à base de proteoglicano e a matriz de colágeno. Devido à rapidez deste processo, os pacientes podem sofrer danos intraoculares irreversíveis em um intervalo de 5 a 15 minutos (Fish and Davidson 2010).

Já as substâncias ácidas tendem a ser menos graves e comumente causam coagulação de proteínas no epitélio e esse processo acaba limitando a penetração da substância nas camadas mais profundas do olho (McCulley 1990, Schrage, Langefeld et al. 2000). A inflamação conjuntival e a perda de células caliciformes podem deixar a superfície ocular mais propensa à secura e com dificuldade de cicatrização. Deve-se enfatizar que, embora os agentes

ácidos não penetrem tão rapidamente quanto os agentes alcalinos, eles são capazes de causar graves danos à superfície ocular (Spector and Fernandez 2008, Lin, Patel et al. 2011).

Devido à sua localização no olho, a córnea é vulnerável a lesões, agentes tóxicos e infecção. Em alguns casos, como após uma queimadura química ou infecção por herpes, a reepitelização nunca é completa (Berman, Manseau et al. 1983). A cicatrização de lesões na córnea é um processo dinâmico e complexo envolvendo proliferação, diferenciação, migração celular e a elaboração de uma nova matriz extracelular (Zieske, Guimaraes et al. 2001). Esse fenômeno envolve quatro fases: uma ação inicial de remoção de tecido danificado, seguido por uma fase proliferativa ou migratória pela qual as células invadem o local da ferida, logo após uma reparação e substituição do tecido lesado, e finalmente alguns mecanismos são ativados para encerrar o processo de cicatrização da lesão (Baldwin and Marshall 2002).

Quando se cria uma ruptura na barreira epitelial, as células na borda da abrasão começam a cobrir a lesão em poucos minutos por uma combinação de migração celular e disseminação celular. Este processo é precedido por mudanças celulares quase imediatas e preparatórias de natureza anatômica, fisiológica e bioquímica, incluindo a criação de extensões de membrana celular e o desaparecimento de aderências hemidesmossômicas das células. Essa fase inicial da cobertura da lesão não mitótica pode prosseguir na taxa notável de 60 a 80 mm por hora (Matsuda, Ubels et al. 1985). Por 24 a 30 horas após a lesão, a mitose começa a restaurar a população de células epiteliais. Apenas as células basais, células amplificadoras transitórias, e as células-tronco límbicas participam dessa mitose reconstitutiva (Wiley, SundarRaj et al. 1991).

Fatores de crescimento e citocinas são importantes reguladores que estimulam o crescimento, proliferação, migração, diferenciação, adesão, deposição de matriz extracelular e regulação de proteinase de células envolvidas na cicatrização de lesões. As células da córnea expressam muitos fatores de crescimento e citocinas que têm efeitos específicos sobre as células

epiteliais e ceratócitos, como fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformadores (TGF-  $\alpha$  e  $\beta$ ), fator de crescimento ácido do fibroblasto (FGF-1) fator de crescimento básico do fibroblasto (FGF-2), fator de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I), interleucinas (IL-1, 6 e 10) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Muitos desses fatores são ativados ou silenciados durante o processo de cicatrização e em doenças da córnea (Lu, Reinach et al. 2001, Yu, Yin et al. 2010, Saghizadeh, Soleymani et al. 2011).

Em alguns casos, as células ativadas desenvolvem-se em tecido cicatricial permanecendo em estado hiperativado ou produzindo uma matriz desorganizada, comprometendo assim a transparência e em última instância, prejudicando a visão (Zieske, Guimaraes et al. 2001, Karamichos, Guo et al. 2010). A geração excessiva de miofibroblastos e sua persistência após o processo de cicatrização da lesão estão associadas à opacidade corneana permanente (Singh, Agrawal et al. 2012, Torricelli, Singh et al. 2013).

O tratamento convencional concentra-se na redução da inflamação, promove a reepitelização, reduz o colapso epitelial ao estromal, além de prevenir infecções e complicações na cicatrização da lesões (Hamill, Bozorg et al. 2013, Al Arfaj 2015, Baradaran-Rafii, Eslani et al. 2017). Agentes biológicos que são fontes ricas de fatores de crescimento têm sido usados topicamente no tratamento de queimaduras oculares, pois possuem propriedades anti-inflamatórias e anti-fibróticas que promovem a restauração de uma superfície ocular estável (Liang, Li et al. 2009, Semeraro, Forbice et al. 2014, Sharma, Singh et al. 2016).

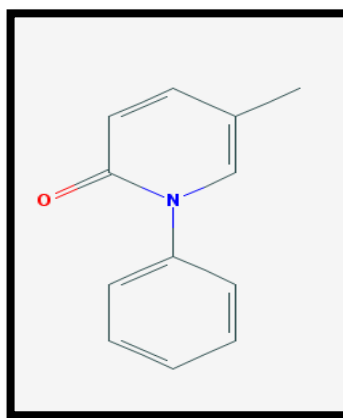
### **2.3 Pirfenidona**

Pirfenidona (PFD) é um derivado da piridina aprovado pelo FDA para o tratamento da fibrose pulmonar idiopática (Maher 2010). A molécula também foi estudada pela sua eficácia no tratamento da cardiomiopatia hipertrófica, fibrose hepática e renal (Furuya, Sakamoto et al. 2017, Seniutkin, Furuya et al. 2018). A



PFD é quimicamente descrita como 5-metil-1-fenil-2-(1H)-piridona (**Figura 3**). É um pó branco a amarelo claro, solúvel em água (19 mg/mL) a 25°C e não higroscópico. Também apresenta-se muito solúvel em metanol, livremente solúvel em álcool etílico, acetona e clorofórmio. Sua fórmula empírica é  $C_{12}H_{11}NO$ , com massa molecular de 185,22 g/mol e ponto de fusão de aproximadamente 109 °C (Macias-Barragan, Sandoval-Rodriguez et al. 2010). A fórmula estrutural da pirfenidona é apresentada a seguir:

**Figura 3.** Estrutura química da pirfenidona



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/fl.html?cid=40632>

Em recentes estudos clínicos de fase III, a PFD demonstrou ter efeitos benéficos para pacientes com vários estágios de fibrose pulmonar idiopática (Swigris and Fairclough 2010, Chowdhury, Guha et al. 2013, Fink, Giuliano et al. 2015). Modelos animais experimentais de fibrose pulmonar mostraram que a PFD exerce seus efeitos reduzindo os níveis de citocinas como: TNF- $\alpha$ , proteína quimiotática de monócitos-1, interleucina-1 $\beta$  e interleucina-6, regulando negativamente a transcrição de fatores de crescimento profibróticos, incluindo TGF- $\beta$  e reduzindo a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo (Zhong, Sun et al. 2011).

A PFD é altamente solúvel em soluções aquosas e é capaz de se mover através das membranas celulares sem exigir um receptor. Quando administrado

por via oral, a PFD é facilmente absorvido no trato gastrointestinal, atingindo a maioria dos tecidos e atravessando a barreira hematoencefálica. Após administração oral, a PFD atinge seu nível máximo no sangue após 1 a 2 horas e é excretada na urina. Em relação a sua segurança, a maioria dos estudos não relataram toxicidade significativa atribuível ao fármaco em doses de aproximadamente 2.500 mg/dia (Shi, Wu et al. 2007, Macias-Barragan, Sandoval-Rodriguez et al. 2010).

Embora a eficácia e a segurança da PFD oral tenham sido estabelecidas na fibrose pulmonar idiopática, as informações sobre sua ação em neovascularização e inflamação após queimaduras químicas na córnea ainda são limitadas. A PFD foi associada à melhora da sobrevivência de coelhos submetidos a cirurgia de glaucoma (Zhong, Sun et al. 2011). Além disso, a PFD demonstrou inibir a expressão dos inibidores teciduais das metaloproteinases-1 e apresentam efeitos antifibróticos nos fibroblastos orbitais de pacientes com oftalmopatia associada à tireoide (Kim, Choi et al. 2010). A PFD levou a diminuição da síntese de colágeno, previne a formação de miofibroblastos, melhora a cicatrização de lesões da córnea e previniu a fibrose após queimadura alcalina (Chowdhury, Guha et al. 2013). A PFD inibe, de forma segura e eficaz, a fibrose da córnea equina induzida pelo TGF $\beta$ 1 *in vitro* (Fink, Giuliano et al. 2015). Em geral, foi identificado que a supressão do TGF- $\beta$  resultaria em diminuição do tecido de granulação, redução da fibrose e melhoraria a epitelização do local da lesão (Burghardt, Tritschler et al. 2007, Hisatomi, Mukae et al. 2012). Já sua ação anti-inflamatória seria por meio de diferentes vias, sendo a mais notável a inibição de espécies reativas de oxigênio e a inibição da via da IL-6 e TNF $\alpha$  (Macias-Barragan, Sandoval-Rodriguez et al. 2010). Esses achados sugerem os potenciais efeitos terapêuticos da PFD para doenças oculares. No entanto, quando foi investigada a farmacocinética da pirfenidona a 0,5% como solução tópica administrada em olhos de coelhos, a mesma exibiu uma meia vida curta no tecido da córnea (menos de 19 min) (Sun, Lin et al. 2011).

## 2.4 Sistemas de liberação de fármacos de uso tópico

A sensibilidade dos tecidos oculares e a presença de várias barreiras físico-químicas e biológicas são desafios atribuídos na administração ocular de drogas. A biodisponibilidade de fármacos de uso ocular é um dos problemas mais desafiadores enfrentados pelos pesquisadores devido à anatomia única, fisiologia e bioquímica do olho. Devido à facilidade de acesso e à adesão do paciente, a administração tópica é uma via amplamente aceita e preferida na terapia (Souza, Dias et al. 2014). Para manter os níveis ideais da droga nos tecidos oculares, várias estratégias como o prolongamento do tempo de permanência do fármaco no filme lacrimal e aumento da quantidade de fármaco que atinge o tecido ocular alvo por meio da utilização de pró-fármacos estão sendo cada vez mais utilizados (Ludwig 2005, Ruponen and Urtti 2015). É relatado que, efetivamente, 5% ou mesmo menos da dose administrada alcança os tecidos intraoculares (Barar, Javadzadeh et al. 2008, Gaudana, Ananthula et al. 2010).

As vias menos invasivas para a administração de fármacos oculares são formulações tópicas (por exemplo, colírios) e sistêmicas (por exemplo, comprimidos). Uma vantagem da administração local por meio de colírios é contornar o efeito de primeira passagem realizado pelo fígado, evitando assim a necessidade de maiores doses sistêmicas necessárias com a via oral.

Entretanto, a maioria dos fármacos administrados na superfície ocular a partir de formas farmacêuticas líquidas são rapidamente drenados por diferentes mecanismos (Nagarwal, Kant et al. 2009). O filme lacrimal é o primeiro obstáculo enfrentado por drogas administradas topicamente e consiste em três camadas: uma camada lipídica mais externa, uma camada média aquosa mais espessa e camada mais interna de mucina. O filme lacrimal é criado por lágrimas que são compostas de água, eletrólitos e muitas proteínas diferentes que juntas promovem a cura e combater infecção (Gaudana, Ananthula et al. 2010).

A córnea é a segunda barreira ocular que limita a penetração de

substâncias exógenas no olho. As camadas que formam barreiras substanciais à penetração de drogas são o epitélio, estroma e o endotélio. O epitélio da córnea é composto por múltiplas camadas de células epiteliais escamosas, não-queratinizado e estratificado. A permeação de drogas hidrofílicas é limitada devido à hidrofobicidade do epitélio e à presença de proteínas de junções entre as células epiteliais da córnea. Por outro lado, o estroma é composto de glicosaminoglicanos e fibras de colágeno em estruturas lamelares, e propicia um ambiente hidrofílico restringindo desse modo a penetração de drogas lipofílicas (Agrahari, Mandal et al. 2016, Djebli, Khier et al. 2017).

Para melhorar a biodisponibilidade ocular, foram propostos vários sistemas oftálmicos de administração de fármacos tais como: emulsões, nanopartículas e lipossomas (Yamaguchi, Yasueda et al. 2005, Johannesson, Stefansson et al. 2016, Bhattacharjee, Das et al. 2018). Estes sistemas podem potencializar a biodisponibilidade dos fármacos facilitando a penetração transcorneal/transconjuntival (Liu, Lan et al. 2017).

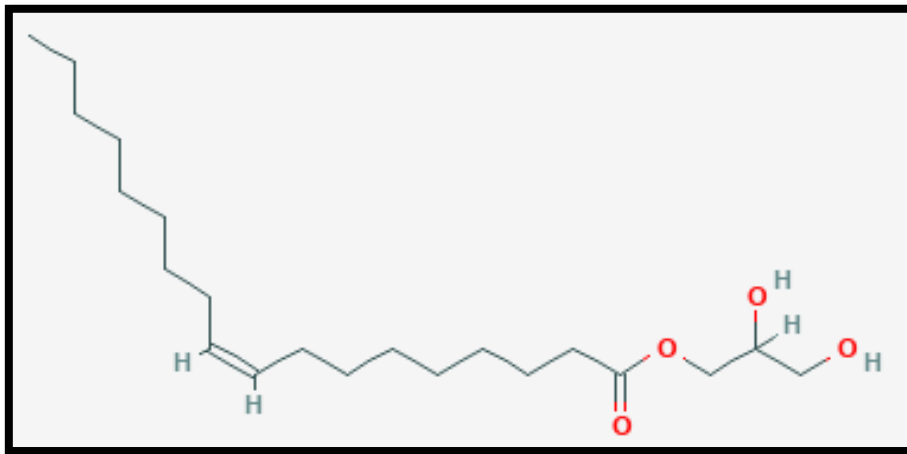
As vantagens das nanopartículas incluem: melhoraria na permeabilidade do fármaco, prolongamento do tempo de contato entre formulação e os tecidos oculares, maior especificidade na liberação do fármaco a um tecido e de maneira controlada, proteção da droga contra degradação e metabolismo (Bucolo, Drago et al. 2012, Djebli, Khier et al. 2017).

Com base na região que deve ser alvo da terapia, os sistemas de liberação de fármacos podem ser subdivididos em duas categorias, os que irão melhorar a biodisponibilidade dos fármacos nos tecidos extra-oculares para aliviar os sinais e sintomas causados por distúrbios inflamatórios da superfície ocular da córnea e os que melhorariam a biodisponibilidade das drogas nos tecidos intraoculares para tratar infecções e doenças complexas, que ameaçam a visão, como glaucoma ou inflamação intraocular (uveíte) (Cholkar, Patel et al. 2013, Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani 2018).

A Monoleína (MO) é um lipídeo anfifílico não tóxico, biodegradável e biocompatível, que ao entrar em contato com a água forma, espontaneamente,

fases cristalinas líquidas bem ordenadas (**Figura 4**). As fases do cristal líquido mais comuns são, a fase lamelar (L), a fase hexagonal invertida ( $H_2$ ) e a fase cúbica ( $V_2$ ) (de Campo, Yaghmur et al. 2004, Shilpi, Jain et al. 2007, Yaghmur and Glatter 2009).

**Figura 4.** Estrutura química da monoleína



Fonte <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/fl.html?cid=5283468>

Os sistemas de cristais líquidos, formulados a partir de moléculas anfífilas e solventes, podem ser classificados em lamelar, hexagonal, cúbico, nemático, gel e intermediário. Nos últimos anos, os sistemas de cristais líquidos têm recebido atenção considerável devido ao seu excelente potencial como veículos de drogas (Clogston and Caffrey 2005).

Em particular, os sistemas de cristais líquidos baseados em fases não lamelares, como as fases cúbica e hexagonal, têm sido o foco de grande interesse e estudo nas últimas duas décadas, pois também têm sido cada vez mais reconhecidos como importantes sistemas de liberação (Pomorski, Nylander et al. 2014). Essas estruturas não lamelares, geralmente têm uma área superficial muito maior por volume do que as estruturas micelares e lamelares e podem solubilizar moléculas hidrofóbicas, hidrofílicas e também anfífilas (Yang, Armitage et al. 2004, Angelova, Angelov et al. 2011). As fases não lamelares podem ser utilizadas para aplicação tópica na pele, injeção

subcutânea/intravenosa e mucoadesão (Astolfi, Giorgini et al. 2017).

Três parâmetros são cruciais para a formação das fases apresentadas acima: as moléculas anfífilas, o solvente apropriado (água para aplicações biológicas) e a temperatura. Entretanto, outros fatores externos como pressão, pH ou concentrações de eletrólitos podem modificar as propriedades das mesofases (Fong, Le et al. 2012).

As mesofases em dispersões aquosas de maior interesse são as fases cúbicas (cubossomos) e a fase hexagonal inversa (hexossomos). Os cubossomos compreendem uma bicamada lipídica contorcida, ordenada de forma única, que separa dois canais aquosos contínuos sem interseção (Rizwan, Hanley et al. 2009, Rizwan, Boyd et al. 2010). Os hexossomos são compostos de micelas inversas de formato cilíndrico, agrupadas em um padrão hexagonal onde, ao contrário da fase cúbica bicontínua, os canais de água são fechados. A nanoestrutura única das dispersões cubossômicas e hexossômicas oferece grande flexibilidade para incorporar uma variedade de moléculas hóspedes com várias propriedades físico-químicas (Boyd, Rizwan et al. 2007).

As mesofases do cristal líquido de MO apresentam propriedades interessantes para um sistema de administração tópica, uma vez que são bioadesivos, proporcionam a capacidade de incorporar compostos independentemente da sua solubilidade, protegendo-os da degradação física, enzimática e controlando a sua liberação (Lee and Kellaway 2000, Shah, Sadhale et al. 2001, Nolan, Corish et al. 2007).

As nanopartículas de cristal líquido (NPCLs) podem ser administradas facilmente numa forma líquida e parecem ter uma difusividade elevada através do epitélio corneano (Gan, Han et al. 2010, Li, Wu et al. 2013). Além disso, a liberação prolongada de fármacos, a bioadesão, a biocompatibilidade e a biodegradabilidade tornam estes sistemas de administração de fármacos interessantes como novas ferramentas terapêuticas na administração ocular (Qiu and Caffrey 2000, Dian, Yang et al. 2013).

### 3 JUSTIFICATIVA

Embora tenha havido muito progresso na compreensão do processo de cicatrização da córnea, as terapias farmacológicas atuais que aceleram e/ou promovem a cicatrização/regeneração epitelial permanecem limitadas. Os clínicos ainda visam principalmente proporcionar ao paciente um ambiente propício à cura e confiam na capacidade de reparação inata do olho. Lesões corneanas rotineiras, como abrasões, erosões recorrentes ou mesmo doenças inflamatórias, exigem que oftalmologistas recorram ao uso de fármacos que possam promover rapidamente a cicatrização corneana e adequadamente modular a resposta inflamatória (Sosne, Szliter et al. 2002, Sosne, Siddiqi et al. 2004).

O reparo do defeito epitelial corneano envolve apoptose, migração, proliferação e diferenciação de múltiplas células em uma cascata mediada por citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas (Suzuki, Saito et al. 2003).

A PFD foi o primeiro fármaco aprovado para o tratamento da fibrose pulmonar idiopática, inicialmente na União Européia e logo depois nos EUA, após ser demonstrado que a PFD retardou a progressão da doença (Noble, Albera et al. 2011, King, Bradford et al. 2014). A PFD é conhecida por inibir uma variedade de citocinas no processo de cicatrização de feridas. Estas incluem TGF- $\beta$ , factor de crescimento do tecido conjuntivo (FCTC), PDGF E TNF- $\alpha$  (Hewitson, Kelynack et al. 2001, Nakazato, Oku et al. 2002, Yang, Man et al. 2017). Entretanto, em estudos realizados por SUN e colaboradores, a PFD administrada em tecidos oculares de coelhos exibiu meia-vida terminal curta (18 a 72 min) (Sun, Lin et al. 2011).

As NPCLs ganharam interesse científico significativo recentemente. Estes sistemas são fases cristalinas líquidas bicontínuas auto-montadas compreendendo canais de água envolvendo bicamadas lipídicas que proporcionam uma região hidrofílica e hidrofóbica para encapsulação de fármacos com solubilidade variável (SIEKMANN *et al.*, 2002).

Para aumentar o tempo de permanência ocular na córnea e prolongar a

atividade farmacológica do fármaco, no presente trabalho foi desenvolvida uma formulação com cristal líquido contendo o fármaco PFD. O desenvolvimento e a caracterização de nanopartículas de cristal líquido contendo pirfenidona (NPCLs-PFD), assim como a investigação da atividade deste sistema de liberação em modelo animal para cicatrização da córnea, poderá levar a um melhor entendimento das ações do fármaco e pode se tornar uma nova alternativa no tratamento de lesões da córnea causado por queimadura química.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar nanopartículas de cristal líquido, á base de monoleína, contendo o fármaco pirfenidona, bem como avaliar o potencial de cicatrização da córnea após queimadura química e tratamento com as NPLCs-PFD em modelo experimental de reepitelização em coelhos.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver nanopartículas de cristal líquido constituídos de monoleína contendo pirfenidona;
- Caracterizar as formulações de nanopartículas por meio de análises de morfologia, tamanho, potencial zeta, pH, eficiência de encapsulação, espalhamento múltiplo de luz, difração de raios X de baixo ângulo (SAXS) e liberação *in vitro*.
- Avaliar a toxicidade ocular da formulação desenvolvida em modelo de membrana corioalantóica (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane HET- CAM) de embrião de galinha.
- Avaliar, *in vivo*, a reepitelização das córneas de coelhos lesadas por queima química e tratados com as NPLCs-PFD por meio da microscopia de lâmpada de fenda, bem como a análise histológica do tecido.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do sistema obtido por meio da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG).

**PARTE I - DESENVOLVIMENTO E  
CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE  
CRISTAL LÍQUIDO CONTENDO PIRFENIDONA**

## 1 MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.1 Materiais

A monoleína (MO), pirfenidona, poloxamer 407 (F127) e ácido oleico foram adquiridos pela Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO). A água ultrapura foi produzida por um sistema Milli-Q (Millipore, Massachusetts, EUA). Todos os outros produtos químicos e reagentes utilizados no estudo eram de grau analítico ou farmacêutico.

### 1.2 Métodos

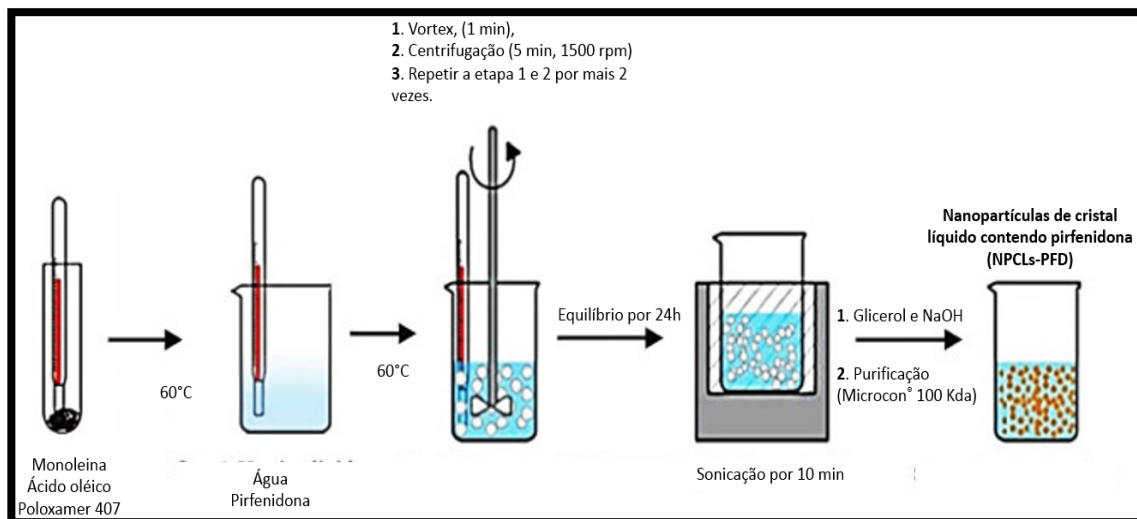
#### 1.2.1 Preparação das NPCLs-PFD

As NPCLs-PFD foram preparadas por meio do método *top-down* (Guo, Wang et al. 2010). Assim, MO (4,4%p/p), o ácido oléico (0,1% p/p) e poloxamer 407 (0,5% p/p) foram primeiramente aquecidos a 60 °C, e então a solução de pirfenidona em concentração apropriada (0,5% p/p) foi adicionada a MO fundida/ácido oléico/poloxamer 407 e solubilizados antes da adição da fase aquosa (95% p/p). A mistura foi aquecida a 60 °C, agitada em vórtex durante 1 min (Wizard Vortex Mixer, UK), centrifugada a 1500 g (Thermo Scientific, USA) e repetido este ciclo três vezes. Posteriormente, a amostra foi mantida à temperatura ambiente até que seu estado homogêneo fosse alcançado.

Após o equilíbrio de 24 h, a redução no tamanho foi alcançada tratando a mistura por 10 min por sonicação em sonda (500 Watt Ultrasonic Processors - Série VCX, EUA) a uma entrada de energia de 9W à 25 °C. Em seguida, o glicerol foi utilizado para adequar a pressão osmótica da formulação às condições fisiológicas (0,9% p/p) e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 0,1M (**Figura 5**). Finalmente, a droga livre foi removida por dispositivos de filtração centrífuga Microcon® 100 Kda (Millipore, Billerica, MA, EUA). Em seguida, a concentração final de pirfenidona foi ajustada para 1 mg/mL. A formulação foi armazenada a duas temperaturas diferentes (4 °C e 25 °C) e protegida da luz. Nanopartículas em branco foram preparadas pelo mesmo processo sem

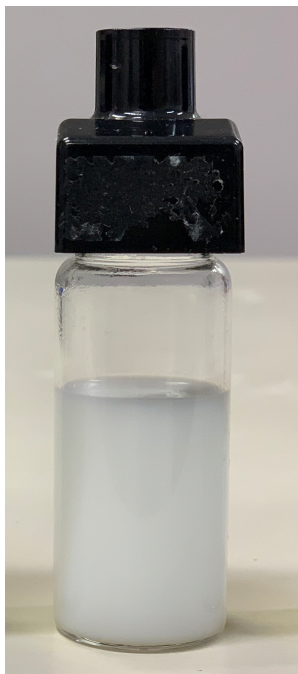
adicionar o fármaco na etapa inicial.

**Figura 5.** Desenho esquemático do preparo das NPCLs-PFD



Fonte: adaptado de Reis, Neufeld et al. 2006

**Figura 6.** Formulação desenvolvida das NPCLs-PFD



## **1.2.2 Caracterizações das NPCLs desenvolvidas**

### **1.2.2.1 Distribuição do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta**

O tamanho de partícula e índice de polidispersão das NPCLs-PFD foram determinados por dispersão de luz dinâmica (Zetasizer® Nanoseries ZEN3600, Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra) após diluição adequada (1: 100, v/v). Para a análise, utilizou-se uma célula de poliestireno com 1 cm de largura a um ângulo fixo de 90°. As medidas do potencial zeta (Zetasizer® Nanoseries ZEN3600, Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra) foram realizadas a 25 °C de acordo com o princípio da mobilidade eletroforética após diluição (1: 100, v / v). Todos os conjuntos de dados foram expressos em termos da média ( $\pm$ ) erro padrão da média de pelo menos três formulações diferentes. A determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações desenvolvidas foi realizada 0, 15 e 30 dias após a preparação.

### **1.2.2.2 Morfologia**

A morfologia da superfície das NPCLs foram determinadas por microscopia de força atômica (MFA) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para as análise de MFA as amostras foram diluídas em água ultrapura (1: 100, v/v) e colocadas em uma folha de mica, deixadas em dessecador por 24 horas e em seguida fotografadas usando um Cypher ES AFM (Asylum Research, EUA). Para as análises de MET, as amostras foram preparadas adicionando uma gota de 5  $\mu$ L das formulações em uma grade de cobre revestido de carbono de malha 300, e então o excesso de fluido foi removido por um papel absorvente. Estas grelhas foram mantidas em dessecador durante 24 horas antes da análise por MET e as amostras foram observadas utilizando um FEI Tecnai G2-20 FEI SuperTwin 200 kV. As análises foram realizados no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo

Horizonte, MG, Brasil. O autor gostaria de agradecer ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (<http://www.microscopia.ufmg.br>) pelo fornecimento de equipamentos e suporte técnico para os experimentos envolvendo microscopia eletrônica.

### **1.2.2.3 Medida de pH**

As medidas de pH foram determinadas nas formulações de NPCLs-PFD não diluídas utilizando um potenciômetro calibrado (mPA-210 - Tecnopon, São Paulo, Brasil).

### **1.2.2.4 Microscopia de Luz Polarizada**

A investigação do comportamento de fase de formulações placebo e contendo pirfenidona foi realizada usando um microscópio óptico (Zeiss®, Modelo Axio Imager M2) equipado com filtro polarizador. Para identificação, uma pequena quantidade da formulação foi colocada em uma lâmina de vidro e coberta com uma lamínula, e analisada à temperatura ambiente. As partículas de cristal líquido foram fabricadas como descrito anteriormente, e as imagens foram adquiridas após percorrido o tempo necessário para equilíbrio dos sistema de 24 horas (sem o passo de redução de tamanho).

### **1.2.2.5 Medição de espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS)**

A informação estrutural foi obtida através da análise por SAXS. Os experimentos foram realizados na linha de luz SAXS-1 do Síncrotron Brasileiro (LNLS, Campinas, Brasil). Nanopartículas de cristal líquido (placebo e contendo pirfenidona) foram depositadas em anéis de metal, que foram seladas por um filme de poliimida (Kapton®) e impingidas com uma energia de feixe de raios-X de 8,3 keV ( $\lambda = 0,1488$  nm). Um detector Pilatus 300k foi posicionado a 1,0 m da amostra, fornecendo um intervalo de vetor de espaço recíproco (Q) de  $0.15 \text{ nm}^{-1}$  a  $2.6 \text{ nm}^{-1}$ . Para todos os dados de SAXS, as imagens 2D obtidas foram

normalizadas pela intensidade do feixe de entrada e absorção da amostra e as contribuições de fundo de dispersão da câmara de amostra (mica) foram subtraídas e convertidas em perfis de intensidade  $I(Q)$  em função do vetor de espalhamento  $Q$  usando o software Fit2D.

#### 1.2.2.6 Eficiência de encapsulação

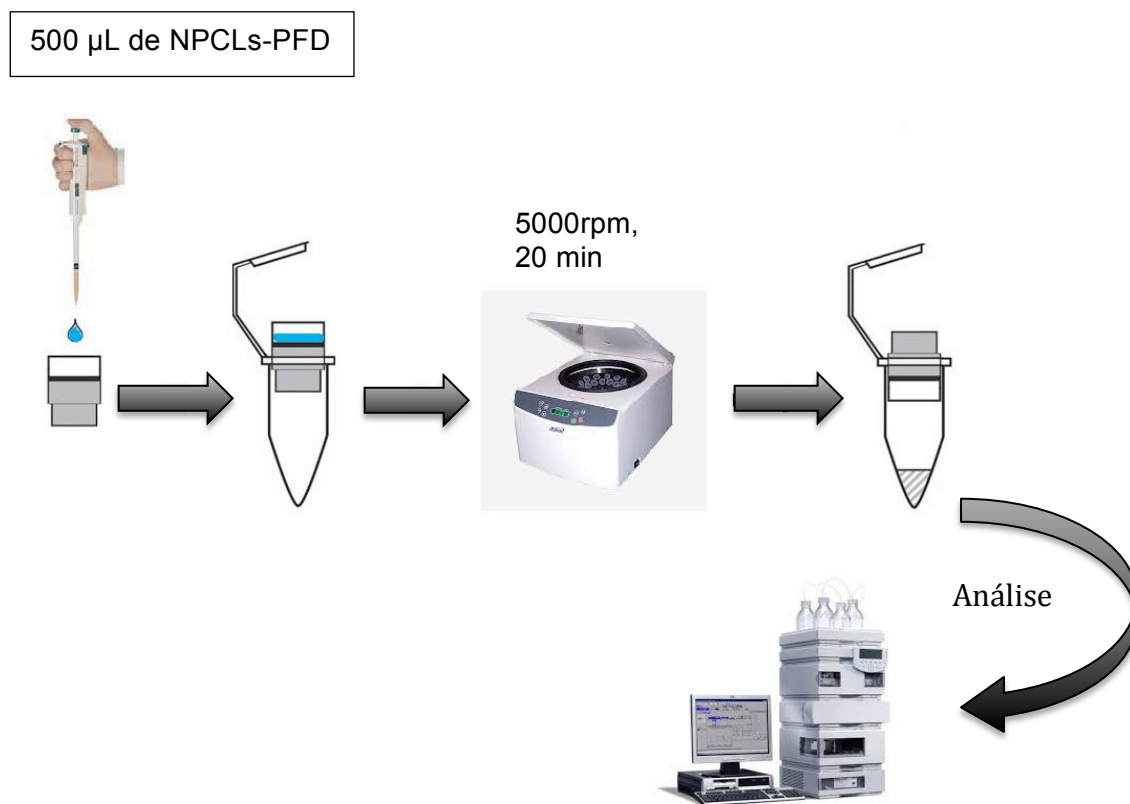
A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada por cromatografia líquida de alta performance com detecção ultravioleta (CLAE-UV). O sistema de CLAE (Modelo 1260 Infinity Series, Agilent®, EUA) consistia de uma bomba (modelo G1311B), injetor automático (modelo G1329B), detector DAD (modelo G4212B) e software Agilent® (Modelo EZChrom Elite, EUA). Utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro e com partículas de 5  $\mu\text{m}$  (modelo LiChrospher® 100 RP-18 encapsada, Merck, Alemanha). Amostra (20  $\mu\text{L}$ ) foi injetada na coluna com a fase móvel consistindo de acetonitrila-água (35:65, v / v) com um fluxo isocrático de 1 mL / min e o detector de absorbância de UV operou a 311 nm. O tempo de retenção para a pirfenidona foi de 1,5 min.

A EE% foi determinada usando dispositivos de filtração centrífuga Microcon® 100 Kda (Millipore, Billerica, MA, EUA). Amostras de 0,5 mL de NPCLs-PFD foram transferidas para a porção superior do tubo de centrifuga com um corte de massa molecular de 100 kDa seguido de centrifugação à 5000 rpm durante 20 min. O método de centrifugação por ultrafiltração permite a separação do fármaco não encapsulado, que por sua vez foi capaz de passar através do filtro durante a centrifugação (**Figura 7**). A concentração de pirfenidona do filtrado e a preparação da amostra original (antes da filtração) foram determinadas usando cromatografia líquida de alta performance (CLAE). O intervalo de linearidade da curva de calibração foi de 1 e 500  $\mu\text{g/mL}$  com um coeficiente de correlação de 0,9998. A eficiência de encapsulação do fármaco foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$EE\% = \frac{F_{\text{total}} - F_{\text{livre}}}{F_{\text{total}}} \times 100$$

Onde, EE% é a eficiência de encapsulação da droga;  $F_{\text{total}}$  é a quantidade total do fármaco na NPCL;  $F_{\text{livre}}$  é a quantidade de droga no filtrado. Os dados relatados foram expressos como a média ( $\pm$ ) erro padrão da média de pelo menos três diferentes medidas de formulação.

**Figura 7.** Desenho esquemático do procedimento para determinação da eficiência de encapsulamento



Fonte: adaptado de Castro, B. F. M. 2016

### 1.2.2.7 Estudo de liberação *in vitro*

A liberação *in vitro* das NPCLs-PFD foram avaliadas usando o método de diálise dinâmica. 1mL de NPCLs-PFD (1 mg/mL) foram colocadas em uma bolsa de diálise de 14 KDa (Sigma, EUA). A bolsa de diálise foi então imersa em 52 ml de meio de liberação de fluido lacrimal simulado (FLS, NaCl 0,67%, NaHCO<sub>3</sub>



0,2%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,008%) a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  com agitação a 100 rpm. Em intervalos de tempo pre determinados (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas) alíquotas de 1 mL foram retiradas e imediatamente substituídas por um volume igual de FLS a fim de manter o volume constante e garantir a condição sink. O teor de PFD no meio de libertação foi quantificado com o método de CLAE semelhante ao da determinação da eficiência de encapsulação.

#### **1.2.2.8 Estudos de estabilidade**

A estabilidade é outro aspecto importante que deve ser considerado durante o desenvolvimento farmacêutico de sistemas de liberação de drogas nanoparticulados para garantir a segurança, eficácia e qualidade dos produtos. Atualmente, existem poucos estudos sobre a estabilidade de nanopartículas para aplicações oculares (Wu, Zhang et al. 2011). A tendência à instabilidade física das formulações foi estudada por meio do espalhamento múltiplo de luz para avaliação de um possível mecanismo de instabilidade física por meio de coalescência, sedimentação, creming ou floculação (Turbiscan Lab®, Formulaction, L'Union, France). A medição permite a quantificação de vários parâmetros, como valores de retroespalhamento (backscattering, BS) e transmitância, os quais estão associados ao diâmetro médio e fração de volume das partículas. Turbiscan analisa dispersões de baixa e alta concentração dispersão de luz múltipla no modo transmissão (T) e retroespalhamento (BS).

As medições foram realizadas durante 28 dias (dia 0, dia 15 e dia 28) para as formulações armazenadas à  $4^\circ\text{C}$  e 29 dias (dia 0, dia 13 e dia 29) para as formulações armazenadas à  $25^\circ\text{C}$  com o objetivo de avaliar a influência da temperatura na estabilidade das NPCLs e determinar o mecanismo predominante de desestabilização. A análise foi realizada com amostras não diluídas por 1 h (uma varredura a cada 5 min) com o equipamento operando em  $25^\circ\text{C}$ . A variação de backscattering foi o parâmetro avaliado, uma vez que o perfil de transmissão foi próximo a 0% para todas as amostras. O perfil BS em  $T = 0$  foi usado como linha de referência e foi subtraído dos perfis obtidos nas

medidas subsequentes. Os dados foram analisados utilizando-se o software Turbisoft® para avaliar fenômenos de instabilidade como migração e variação de tamanho de partículas nesses sistemas.

### **1.3 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por meio da análise de variância simples de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Adotou-se um nível de significância de 5%. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 6.0 (San Diego, Califórnia, EUA).

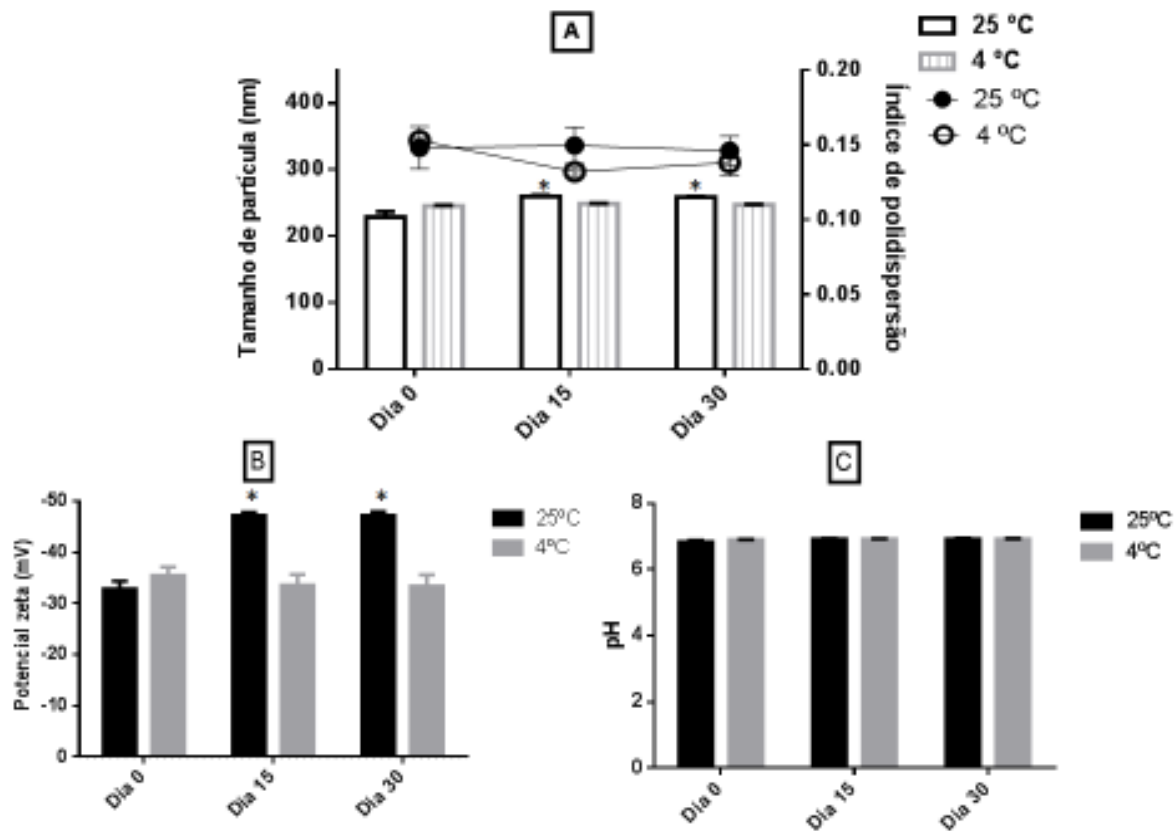
## 2 Resultados e Discussão

### 2.1 Distribuição do tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH.

O tamanho das partículas é um fator importante na avaliação da estabilidade físico-química e biodisponibilidade de sistemas de liberação (Rezvani, Hesari et al. 2018). Durante o período avaliado, para formulações armazenadas a 4 °C, o diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão (IP) foram de  $247,3 \pm 0,599$  nm e  $0,1200 \pm 0,006$ , respectivamente (**Figura 8A**). Não houve alterações em ambos os parâmetros avaliados. Entretanto, quando as formulações armazenadas a 25 °C foram avaliadas, o diâmetro hidrodinâmico médio medido e o IP foram  $257,5 \pm 5,568$  nm e  $0,1620 \pm 0,009$ , respectivamente. Houve variações no tamanho das partículas após 15 e 30 dias, o que pode ser atribuído aos fenômenos de agregação de partículas ao longo dos 30 dias avaliados. O valor de IP em todas as medidas foi menor que 0,2 o que sugere distribuição unimodal e homogênea das partículas (Danaei, Dehghankhold et al. 2018). O IP não sofreu grandes alterações ao longo dos 30 dias, isto indica que, embora o tamanho médio seja variável para as formulações armazenadas a 25 °C, a homogeneidade da formulação permanece estável.

Os valores do potencial zeta medidos após a preparação, 15 e 30 dias de todas as formulações estão apresentados na **figura 8B**. Quando avaliadas as formulações armazenadas a 4 °C, o potencial zeta foi de  $-33,60 \pm 1,06$  mV e não houve variação no valor desse parâmetro no período avaliado. No entanto, para as formulações armazenadas a 25 °C, o potencial zeta foi de  $-46,00 \pm 2,45$  mV e houve variação estatística após 15 e 30 dias da preparação com redução do potencial zeta. As NPCLs-PFD que foram formuladas e armazenadas nas duas diferentes temperaturas mostraram um potencial zeta negativo, o que poderia ser esperado devido à presença de grupos carboxílicos expostos do ácido oléico e adsorção de grupos hidroxilas livres provenientes da monoleína na superfície de NPCLs-PFD (Abdelaziz, Elzoghby et al. 2019).

**Figura 8.** (A) Distribuição de tamanho de partícula das NPCLs-PFD armazenadas a 4 °C e 25 °C durante 30 dias. (B) Distribuição do potencial zeta de NPCLs-PFD armazenadas a 4 °C e 25 °C durante 30 dias. (C) pH das nanopartículas armazenadas a 4 °C e 25 °C durante 30 dias. A distribuição do tamanho de partícula e o potencial zeta foram determinados a 25 °C. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas. As análises estatísticas foram realizadas: \* indica  $p < 0,05$  quando comparado ao dia 0.



O potencial zeta é um importante parâmetro físico-químico que influencia a estabilidade das formulações. Como regra geral, valores absolutos do potencial zeta acima de 30 mV fornecem boa estabilidade e, por outro lado, valores no intervalo de -5 mV a +5 mV indicam agregação rápida (Patel and Agrawal 2011). Forças repulsivas grandes sendo positivas ou negativas tendem a evitar a agregação devido a colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (Bhattacharjee 2016). Juntos, esses parâmetros indicam que a temperatura de 4

°C preserva melhor as NPCLs, que foram menos agregadas como evidenciado nos parâmetros analisados.

Há um delicado equilíbrio para se encontrar um pH apropriado para a boa permeabilidade de um fármaco na córnea e o pH fisiológico (7,4), o que resultará em um menor lacrimejamento. A faixa de pH para que formulações oftálmicas administrada topicamente tenha conforto é bastante estreita, variando de 6,5 a 7,8 (Pahuja, Arora et al. 2012, Awwad, Mohamed Ahmed et al. 2017). O valor do pH da formulação das NPCLs-PFD a temperaturas de 4 °C e 25 °C foi de  $6,910 \pm 0,01944$  e  $6,920 \pm 0,00789$ , respectivamente. Assim, o pH foi considerado adequado para o uso proposto, pois está próximo do pH do líquido lacrimal, permitindo o conforto necessário de uma formulação para uso ocular tópico. Não houve alterações estatisticamente significativas nos valores de pH ao longo do período avaliado (**Figura 8C**).

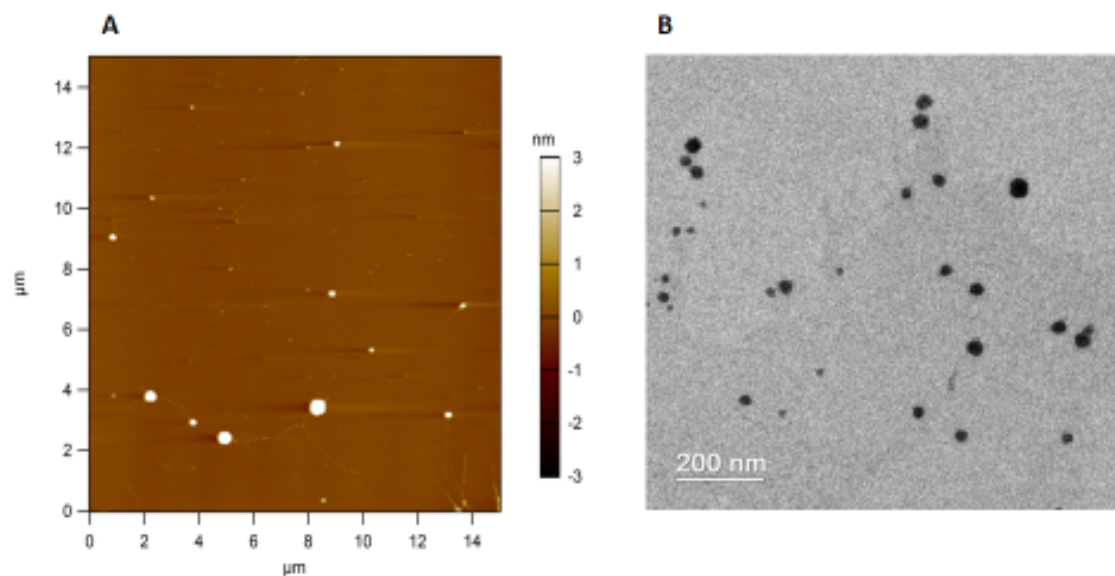
As NPCLs que foram armazenadas a uma temperatura de 25 °C mostraram uma diminuição no potencial zeta ao longo do tempo, além do aumento no tamanho. Por se trata de uma temperatura de armazenamento mais alta (quando comparada a 4 °C), acredita se que ocorre uma desestabilização termoquímica das partículas pode levando a um maior deslocamento de grupos hidroxila e carboxílicos do ácido oléico para a superfície das NPCLs. Como resultado, o potencial zeta diminui com o tempo, apesar do aumento da agregação das nanopartículas quando armazenado a 25 °C.

## 2.2 Morfologia

As imagens obtidas tanto por MFA e geradas por MET mostram NPCLs-PFD esféricas e separadas uma das outras, sugerindo possível estabilização das nanopartículas devido a carga de superfície negativa (**Figura 9**). Estes resultados indicaram a formação bem sucedida de NPCLs. A MFA e a MET são ferramentas indispensáveis para o uso em muitos campos de pesquisa e desenvolvimento de nanotecnologia, incluindo a investigação de nanocarreadores de fármacos que permitem a detecção de alterações na

morfologia das nanopartículas (Manaia, Abucafy et al. 2017). Ambas microscopias mostraram partículas com tamanhos menores quando comparadas com a análise do diâmetro hidrodinâmico. A explicação é que diferentes técnicas analíticas fornecem diferentes medidas de tamanho de partícula, já que elas são baseadas em princípios diferentes (Domingos, Baalousha et al. 2009, Baalousha and Lead 2012).

**Figura 9.** Micrografias das NPCLs-PFD obtidas por microscópio de força atômica (A) e microscópio eletrônico de transmissão (B).

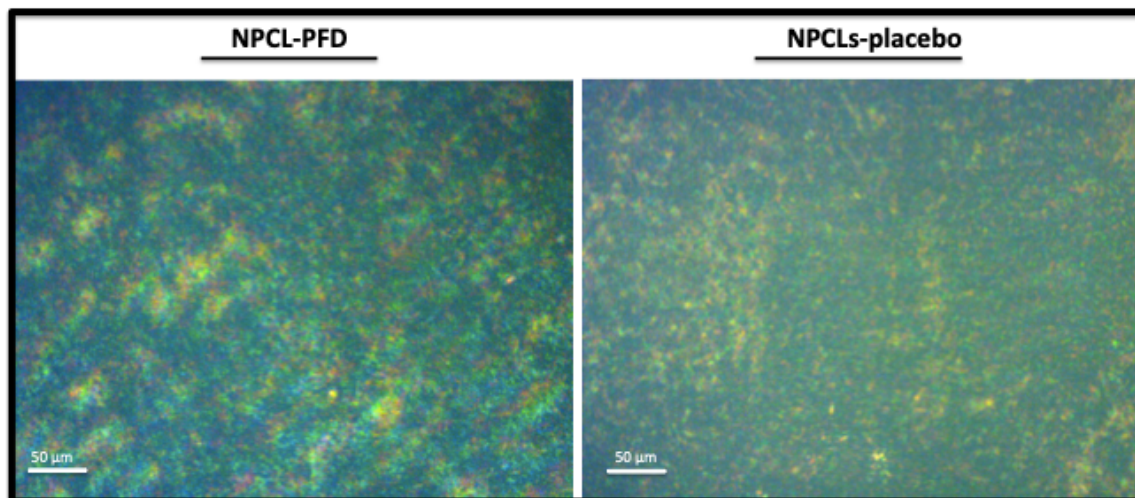


### 2.3 Microscopia de Luz Polarizada

Sistemas anisotrópicos causam um desvio no plano da luz polarizada (birrefringência, semelhante aos cristais reais), resultando em imagens típicas em preto e branco, ou texturas coloridas (Manaia, Abucafy et al. 2017). A **Figura 10** mostra a micrografia de NPCLs-PFD e NPCLs-placebo sob microscópio de luz polarizada. A aparência deste padrão é semelhante à textura em forma de leque, típica da estrutura cristalina líquida hexagonal (Rodrigues, Kyriakos et al. 2016). As NPCLs hexagonais apresentam cinética de adsorção mais rápida e maior ganho de energia livre após a adsorção da partícula em uma superfície. Isso significa que as nanopartículas nessa fase espalham-se mais facilmente

do que as partículas na fase cúbica por exemplo, o que leva a uma maior cobertura na área aplicada (Landau and Rosenbusch 1996).

**Figura 10:** Fotomicrografia das NPCLs-PFD e NPCLs-placebo em uma possível forma hexagonal usando microscopia de luz polarizada.

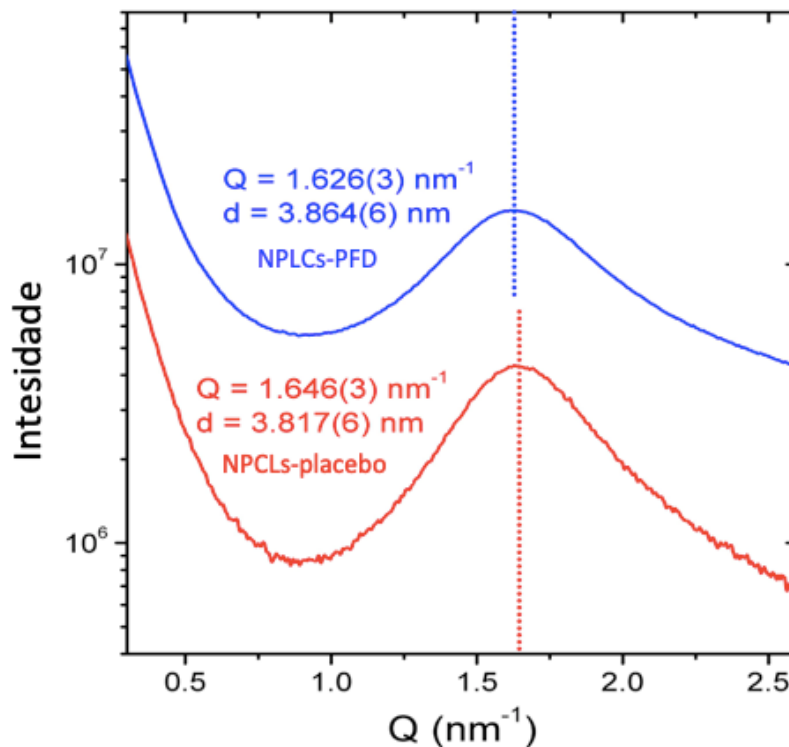


#### 2.4 Medição de espalhamento de raios-X em baixo ângulo (SAXS)

É importante melhorar a compreensão de como as propriedades químicas e estruturais das nanopartículas afetam as interações e as funcionalidades dos sistemas biológicos pois tais informações impactam diretamente na concepção dos sistemas de liberação de fármacos (Vandoolaeghe, Barauskas et al. 2009). A **figura 11** mostra os difratogramas do SAXS para as amostras de NPCLs-PFD e NPCLs-placebo. Nota-se a ausência de um fator de forma para valores baixos de  $Q$ , com uma diminuição monotônica da intensidade medida. Observa-se claramente uma elevação ampla de intensidade perto de  $q = 1,6 \text{ nm}^{-1}$ , seguida por um decaimento suave. A colisão observada em cada curva está relacionada ao pico vizinho mais próximo (pico de primeira ordem) do empacotamento molecular de ambos os sistemas, que assume valores de  $Q$  mais baixos para a amostra de NPCLs-PFD (pico em  $Q = 1,626 \text{ nm}^{-1}$ ), em relação ao sistema NPCLs-placebo (pico a  $Q = 1,646 \text{ nm}^{-1}$ ). As distâncias correspondentes entre as moléculas vizinhas mais próximas estão no espaço real de  $d = 3,817 \text{ nm}$  e  $d =$

3,864 nm para o NPCLs-placebo e o NPCLs-PFD, respectivamente. Isso indica que a inclusão da pirfenidona leva a uma expansão de 1,2% no empacotamento molecular no sistema NPCLs-PFD.

**Figura 11.** Difratoograma de raio-X (SAXS) das NPCLs-PFD a 1 mg/mL e NPCLs-placebo.



A presença de PFD pode estar interferindo no ordenamento da molécula de monoleína tanto para a cauda (porção lipofílica) quanto para os grupos de cabeça (incluindo os grupos hidroxila e carbonila). Acredita-se que, devido a sua estrutura molecular (com alta permeabilidade e alta solubilidade, log D: 1,37), a PFD pode gerar um desequilíbrio entre as cadeias hidrofóbicas e o grupo polar (cabeça) (Mishraki, Ottaviani et al. 2011). A adição do fármaco pode induzir um efeito considerável na distribuição do ângulo de inclinação axial. Desse modo, o fármaco pode contribuir com a desestabilização do empacotamento mais apertado da porção hidrofóbica (cauda) quando comparado com o NPCLs-



placebo, induzindo a expansão observada de 1,2% do empacotamento molecular.

## 2.5 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação das nanopartículas foi de  $35,9 \pm 2,09\%$ . Esta eficiência de encapsulação pode estar associada a uma diluição do fármaco devido à grande proporção de água na formulação. Outro motivo pode estar associado à utilização de alta energia na etapa de redução do tamanho das partículas (sonicação) no qual leva à saída do fármaco do sistema (Li, Wu et al. 2013).

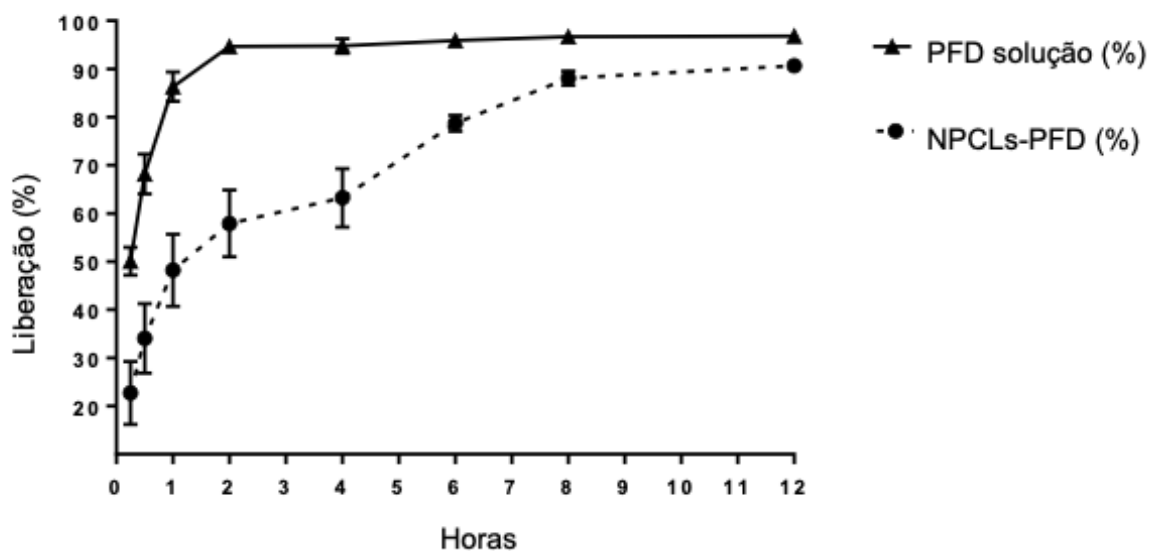
## 2.6 Estudo de liberação *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* para sistemas de liberação de fármacos tem como objetivo prever seu comportamento *in vivo* e verificar se possui uma liberação controlada. No presente trabalho, estudos de liberação *in vitro* foram conduzidos em pH 7,4 para simular o fluido lacrimal. Como apresentado na **figura 12**, a PFD em solução aquosa foi quase completamente liberada em 2 horas (94% de liberação do fármaco) enquanto, durante o mesmo tempo avaliado, as NPCLs-PFD exibiu 58% de liberação indicando que o sistema apresentou maior controle na liberação do fármaco. Observou-se que 50% da PFD em solução aquosa foi liberada após 15 min e quase 90% após 1 hora, sugerindo que o fármaco poderia se difundir livremente através da membrana de diálise.

Os perfis de solubilidade e permeabilidade sugerem que a PFD é uma droga Classe 1 (Log D de  $1,37 \pm 0,05$ ) no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) possuindo dessa forma alta permeabilidade e alta solubilidade (Trivedi, Redente et al. 2012). Assim, a PFD é um fármaco hidrofílico que difunde-se facilmente a partir da matriz lipofílica. Esta característica da PFD poderia justificar o *burst* inicial das NPCLs-PFD, no qual

liberou 23% da droga em 15 minutos. Além disso, acreditasse que a liberação da PFD ocorreu em grande parte através do canal de água presente na estrutura hexagonal das nanopartículas de cristal líquido (Chen, Ma et al. 2014), conformação essa que foi indicada pela microscopia de luz polarizada (**Figura 10**). Após avaliação do teste de liberação *in vitro*, foi possível observar que as NPCLs-PFD apresentaram liberação quase total próximo ao tempo de 12 horas. Sendo assim, considerando que para uma boa adesão ao tratamento, menores doses diárias são recomendadas, concluímos que a posologia por 12h/12h seria a mais efetiva, confortável e segura.

**Figura 12.** Perfis de liberação acumulada *in vitro* da pirfenidona em solução e do sistema NPCLs-PFD (n = 3).



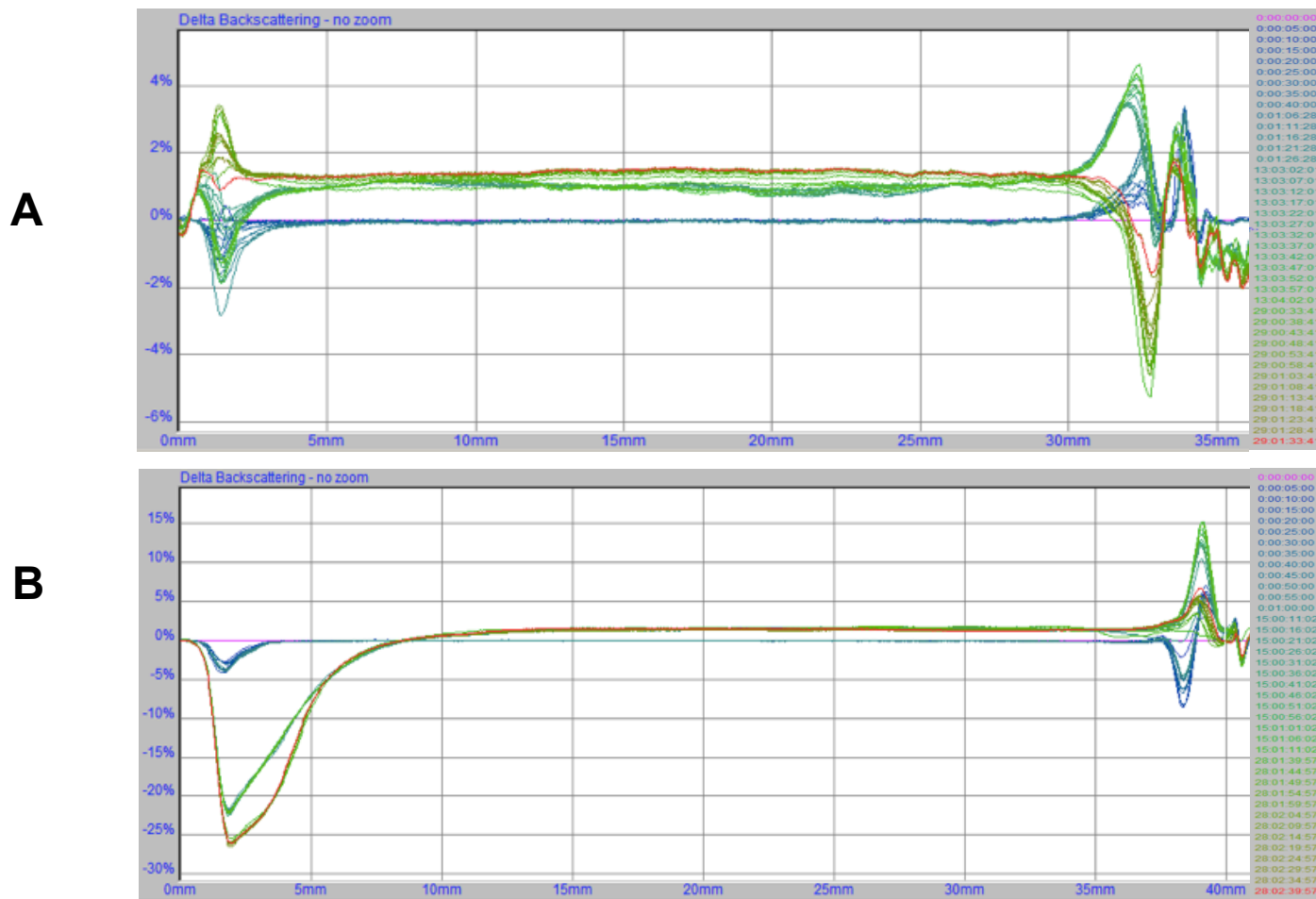
## 2.7 Estudos de estabilidade

Os gráficos obtidos a partir das análises de caracterização óptica por múltiplo espalhamento de luz são mostrados na **Figura 13**. Este instrumento é capaz de detectar desestabilização por cremagem, sedimentação, coalescência e floculação antes que seja visível a olho nu (Trujillo-Cayado, Ramirez et al. 2014). Para a formulação armazenada a 4 °C o gráfico de *Backscattering* (BS) indica que houve um ligeiro aumento na concentração de partículas na base

(linha vermelha) com o decorrer dos 28 dias avaliados e uma redução das partículas no topo da cubeta. No meio da célula, os espectros de BS apresentaram uma alta sobreposição, com uma variação menor que 2%, demonstrando boa estabilidade da formulação armazenada a 4 °C durante 28 dias de estudo (**Figura 13A**). Os resultados obtidos por Turbiscan corroboram com as análises de tamanho de partículas realizadas durante o mesmo intervalo de tempo (**Figura 8A**). Nenhuma das variações detectadas foi superior a 10%, sugerindo que não houve processos de desestabilização irreversíveis e que formulações estáveis foram obtidas (Celia, Locatelli et al. 2015). Essa observação pode ser atribuída ao tamanho apropriado e ao potencial zeta das nanopartículas, proporcionando forte repulsão eletrostática e estabilidade física ao longo do tempo.

No entanto, quando avaliada a formulação armazenada a 25 ° C, o gráfico de *Backscattering* (BS) mostrou variações negativas de mais de 20% na base da célula e 15% no topo logo após 13 dias de armazenamento (**Figura 13B**). Isso indica uma redução na concentração de partículas na base e aumento no topo da célula (cremação) (Celia et al., 2009). Além disso, o sinal de BS no tempo inicial (linha azul) a uma altura de 3 mm muda de -4% no tempo 0:00 para -26% após 29 dias (linha vermelha), enquanto na altura de 38 mm ocorre uma alteração de -9% para 15% demonstrando alta taxa de cremagem da formulação armazenada a 25° C (Wisniewska, Chibowski et al. 2016). Esse resultado corrobora com a variação do tamanho de partícula realizada durante o mesmo intervalo de tempo (**Figura 8A**) sob as mesmas condições de armazenamento. Levando em consideração esses resultados, as NPCLS-PFD armazenadas em 4°C apresentaram a melhor estabilidade física em função da evolução de seus tamanhos médios de gotículas.

**Figure 13.** Perfis de retroespalhamento a 25 °C de formulações de NPCLs-PFD analisadas pelo equipamento Turbiscan Lab®. **(A)** NPCLs-PFD armazenadas a 4 °C e analisadas dentro de um período de até 28 dias após a preparação. **(B)** NPCLs-PFD armazenadas a 25 °C e analisadas dentro de um período de até 29 dias após a preparação.



### 3 Conclusão

Os métodos de caracterização empregados nesta etapa do trabalho permitiram verificar por meio da técnica de espalhamento dinâmico da luz que o tamanho e índice de polidispersão indicam que as partículas produzidas estavam dentro da escala nanométrica, com índice de polidispersão adequado, indicando que a formulação é unimodal e homogênea. O potencial zeta das partículas foi negativo como já esperado considerando os componentes da formulação utilizados e o mesmo se encontra apropriado para evitar a agregação das partículas. O pH da formulação está em uma faixa que não causaria desconforto ou dano ocular. Com a MFA e MET foi possível observar a morfologia esférica das nanopartículas de cristal líquido. Utilizando a microscopia de luz polarizada foi identificado que a mesofase formada pelos cristais líquidos nessa formulação é hexagonal.

No teste de liberação *in vitro* foi possível observar que as NPCLs-PFD permitiram a liberação do fármaco por até 12 horas. A formulação obtida apresentou boa estabilidade no período avaliado de 30 dias quando armazenada a 4°C, sem variação do valor de tamanho de partícula, pH e potencial zeta. A análise de espalhamento múltiplo de luz demonstrou que há uma tendência de cremagem na formulação, porém, a variação encontrada foi menor que o valor considerado para formulações instáveis. Além disso, o fenômeno de migração identificado pode ser reversível.

**PARTE II: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E AÇÃO  
BIOLÓGICA DAS NANOPARTICULAS DE  
CRISTAL LÍQUIDO CONTENDO PIRFENIDONA**

## 1 MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.1 Materiais

A monoleína (MO), pirfenidona, poloxamer 407 (F127) e ácido oleico foram adquiridos pela Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO). Etanol obtido pela Merck Brasil, (Rio de Janeiro, Brasil) e cloreto de sódio, fosfato de sódio bibásico anidro e fosfato de potássio monobásico anidro pela Synth (Brasil). Fluoresceína Sódica 1,0% foi adquirida pela Allergan® (EUA), cloridrato de cetamina pela Dopalen® (Brasil), cloridrato de xilazina e cloridrato de proximetacaína pela Anestalcon® (Brasil). A água ultrapura foi produzida por um sistema Milli-Q (Millipore, Massachusetts, EUA). Todos os outros produtos químicos e reagentes utilizados no estudo eram de grau analítico ou farmacêutico.

### 1.2 Animais

Foram utilizados coelhos fêmeas Nova Zelândia, com três semanas de idade e pesando entre 2 e 3 kg, os quais foram comprados na Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa (Igarapé, Brasil). Os animais permaneceram em gaiolas durante todo o período de adaptação (1 semana) antes da experimentação e mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 h com fornecimento de água e ração *ad libitum*. O estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA, Belo Horizonte, Brasil, Protocolo nº 360/2018).

### 1.3 Métodos

#### 1.3.1 Teste de biocompatibilidade e tolerância ocular

A tolerabilidade ocular das NPCLs-PFD foram avaliadas pelo ensaio em membrana corioalantoica de embriões de galinha da espécie *Gallus domesticus* (HET-CAM) descrito por Fangueiro, Calpena et al. 2016 . Este estudo é usado

como uma alternativa ao teste de Draize na verificação da tolerância ocular da formulação desenvolvida. Dez ovos de galinha fertilizados para cada formulação foram selecionados e manipulados para descartar os defeituosos. Os ovos foram incubados em um dispositivo rotativo automático (Premium Ecologica, Brasil) a  $37 \pm 1$  ° C e  $60 \pm 1\%$  de umidade relativa, por 10 dias. No décimo dia, a casca do ovo foi aberta ao lado da câmara de ar e a membrana interna do ovo foi cuidadosamente removida para evitar qualquer dano aos vasos sanguíneos finos da membrana corioalantóide (CAM). Após dez dias da fertilização, aplicou-se solução oftálmica de PFD formulada usando NaCl 0,9% + carboximetilcelulose a 0,5%, CMC (1 mg/mL, 100 $\mu$ L), formulação de NPCLs-PFD (1 mg/mL, 100 $\mu$ L) sobre a superfície da CAM. Para avaliar a toxicidade dos componentes da formulação, aplicou-se o mesmo volume de formulação placebo (100 $\mu$ L de NPCLs sem o fármaco) sobre a CAM. Como controle negativo, foi realizado o mesmo procedimento e foram aplicados 100  $\mu$ L de veículo (NaCl 0,9% + carboximetilcelulose a 0,5%, CMC) sobre a superfície da CAM. Como controle positivo, 100 $\mu$ L de NaOH 0,1 M foram aplicados sobre a superfície da CAM. Após 5 minutos de contato, a membrana foi enxaguada a 37 °C com solução de PBS.

Em seguida, os vasos sanguíneos e o sistema capilar foram examinados quanto aos efeitos irritantes da hiperemia, hemorragia e coagulação após a aplicação em diferentes tempos (0: 0,5: 2 e 5 min). Um escore numérico dependente do tempo foi então definido para cada formulação, a soma dos escores numéricos dependentes do tempo para todas as três respostas de hiperemia, hemorragia e coagulação foram calculados e a soma média dos escores individuais de todos os tempos de dez replicados foram usados. Os ensaios deram um único valor numérico, indicando assim o potencial de irritação da formulação. A intensidade das reações foi avaliada semi-quantitativamente em uma escala de 0 (sem reação) a 3 (reação forte). O índice de irritação ocular (IIO) foi então calculado pela seguinte expressão:



$$\text{IIO} = \frac{(301 - h) \times 5}{300} + \frac{(301 - l) \times 7}{300} + \frac{(301 - c) \times 9}{300}$$

Onde  $h$  é o tempo (em segundos) do começo da hemorragia,  $l$  de lise e  $c$  de coagulação. Utilizou-se a seguinte classificação:  $\text{IIO} \leq 0,9$ : levemente irritante;  $0,9 < \text{IIO} \leq 4,9$ : moderadamente irritante;  $4,9 < \text{IIO} \leq 8,9$ : irritante;  $8,9 < \text{IIO} \leq 21$ : severamente irritante.

### 1.3.2 Avaliação do tempo de reepitelização da córnea

Os primeiros sete dias após a lesão química dos olhos é classificada como fase aguda da recuperação. Durante esse tempo, o tecido busca eliminar a substância exógena e contaminantes enquanto restabelece uma camada protetora superficial do epitélio da córnea (Singh, Tyagi et al. 2013). Desse modo, com o objetivo de avaliar a cicatrização por meio da avaliação do tempo de reepitelização foi utilizado o método descrito anteriormente por Mencucci e colaboradores com algumas modificações (Mencucci, Favuzza et al. 2014). Todos os procedimentos foram realizados com animais sob anestesia geral, induzida por injeção intramuscular de 50 mg/kg de cloridrato de cetamina e 15 mg/kg de cloridrato de xilazina.

Os animais foram divididos em três grupos de cinco coelhos cada. Os tratamentos foram assim divididos: 1) placebo (NPCLs sem PFD), 2) solução oftálmica de PFD a 1mg/mL e 3) NPCLs-PFD a 1mg/mL. A concentração escolhida para os tratamentos foi baseada em resultados encontrados no trabalho realizado por Lin e colaboradores que indicaram que a concentração de 1mg/mL de PFD quando utilizada em células da córnea de humanos não apresentou toxicidade (Lin, Yu et al. 2009). As soluções oftálmicas foram preparadas previamente para cada experimento para evitar o uso de qualquer conservante. Após anestesia da superfície ocular por instilação tópica de cloridrato de proximetacaína, um trépano oftalmológico de 9,0 mm (Katena, Denville, NJ) foi colocado firmemente na superfície da córnea com uma leve pressão, e 100µL de etanol absoluto foram colocados e deixado em contato

com a córnea por 30 segundos e após esse tempo foi absorvido com auxílio de algodão. Em seguida, o olho foi irrigado completamente com PBS estéril para remover todos os resíduos químicos. Por fim, o epitélio foi removido usando uma lâmina ao longo do limite da queimadura. Todos os procedimentos de remoção epitelial foram realizados no olho direito dos animais experimentais. Os tratamentos começaram imediatamente após a indução da lesão e nos três dias seguintes, a cada 12 horas, com aplicação de 100µL de cada solução oftálmica estéril no olho do coelho.

A resposta clínica foi acompanhada instilando uma gota de fluoresceína nos olhos em estudo, e documentadas por meio de fotografias obtidas usando lâmpada de fenda (Apramed HS5, Brasil) sob iluminação com luz azul-cobalto usando uma câmera digital Canon EOS Rebel T5, (Canon, Inc., Tóquio, Japão). A área de abrasão da córnea foi medida semi-automaticamente por meio do software ImageJ (Versão 1.49; National Institutes of Health, EUA).

### **1.3.3 Histologia**

Após 82 horas da indução da lesão, os animais foram eutanasiados e seus olhos foram removidos. Amostras de córnea foram obtidas e fixadas em solução de Dawidson (duas partes de 10% de formalina tamponada com fosfato neutro, três partes de etanol a 95%, uma parte de ácido acético glacial e três partes de água ultrapura) por 24 horas, então o tecido da córnea foi colocado em etanol a 70% por 12 horas, embebido em parafina, cortado a 4 µm e corado com hematoxilina e eosina. A análise histológica foi realizada em microscópio óptico (Zeiss®, Model Axio Imager M2).

### **1.3.4 Análise de infiltrados celular por quantificação das enzimas MPO e NAG**

Inicialmente, as amostras da córnea de cada animal foram homogeneizadas na solução Buffer 1 gelada (NaCl 0,1M, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,02M e

Na<sub>2</sub>EDTA 0,015M), numa proporção de 0,5 mL/20mg de tecido e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em solução de NaCl 0,2% e NaCl 1,6% acrescida de 5% de glicose, ambas geladas, numa proporção de 0,5mL/20mg de tecido. As amostras foram novamente homogenizadas e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspenso em Buffer 2 (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e HETAB 0,5% p/v) solução esta armazenada à temperatura ambiente, numa proporção de 0,5 mL/20mg. As amostras foram homogeneizadas e metade do volume foi retirado para a dosagem da atividade da enzima NAG. A outra metade do homogenato foi utilizada para a determinação da atividade da MPO. A partir desta etapa, as amostras receberam tratamentos distintos.

Para o ensaio de MPO, após a divisão do homogenato, àquele destinado à dosagem da atividade da MPO foi congelado em nitrogênio líquido e descongelado em água a temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado três vezes consecutivas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 10000 rpm. Foi retirada uma alíquota de 100 µL do sobrenadante para diluição em Buffer 2 e realização do ensaio enzimático.

Na microplaca, foram plaqueados, em triplicata, 25 µL de cada amostra. Foram adicionados 25 µL do substrato tetrametilbenzidina, previamente diluído em DMSO. A placa foi colocada em estufa a 37 °C por 5 minutos. Em seguida foram acrescentados 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,002% e as amostras foram novamente incubadas a 37 °C por 5 minutos. Após o período de incubação, a reação foi paralisada com a adição de 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A leitura da absorbância foi feita a 450nm. Utilizou-se a média dos valores obtidos em cada triplicata para a determinação da atividade da enzima.

Após a divisão do homogenato, a avaliação da atividade da NAG foi feita separadamente. Para isso, foi acrescentado ao homogenato a solução Salina/Triton (Salina 0,9% e Triton x-100 0,1%), numa proporção de

0,5mL/20mg de tecido. As amostras foram homogeneizadas e em seguida centrifugadas a 4 °C por 10 minutos a 3000 rpm. 100 µL do sobrenadante foi coletado e diluído em tampão citrato fosfato (ácido cítrico 0,1M e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M) para proceder o ensaio de NAG. Na microplaca foram plaqueados 100 µL de cada amostra diluída. Foram acrescentados 100 µL do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida, diluído em tampão citrato fosfato. As amostras foram incubadas em estufa a 37 °C por 5 minutos. Após a reação, 100 µL de tampão glicina 0,2M foram adicionados as amostras para paralisar a reação. A absorbância foi lida a 400nm. Utilizou-se a média dos valores obtidos em cada triplicata para determinação da atividade da enzima.

#### **1.4 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média e foram analisados por meio da análise de variância simples de uma via (ANOVA) ou por meio da análise de variância de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. Adotou-se um nível de significância de 5%. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 6.0 (San Diego, Califórnia, EUA).

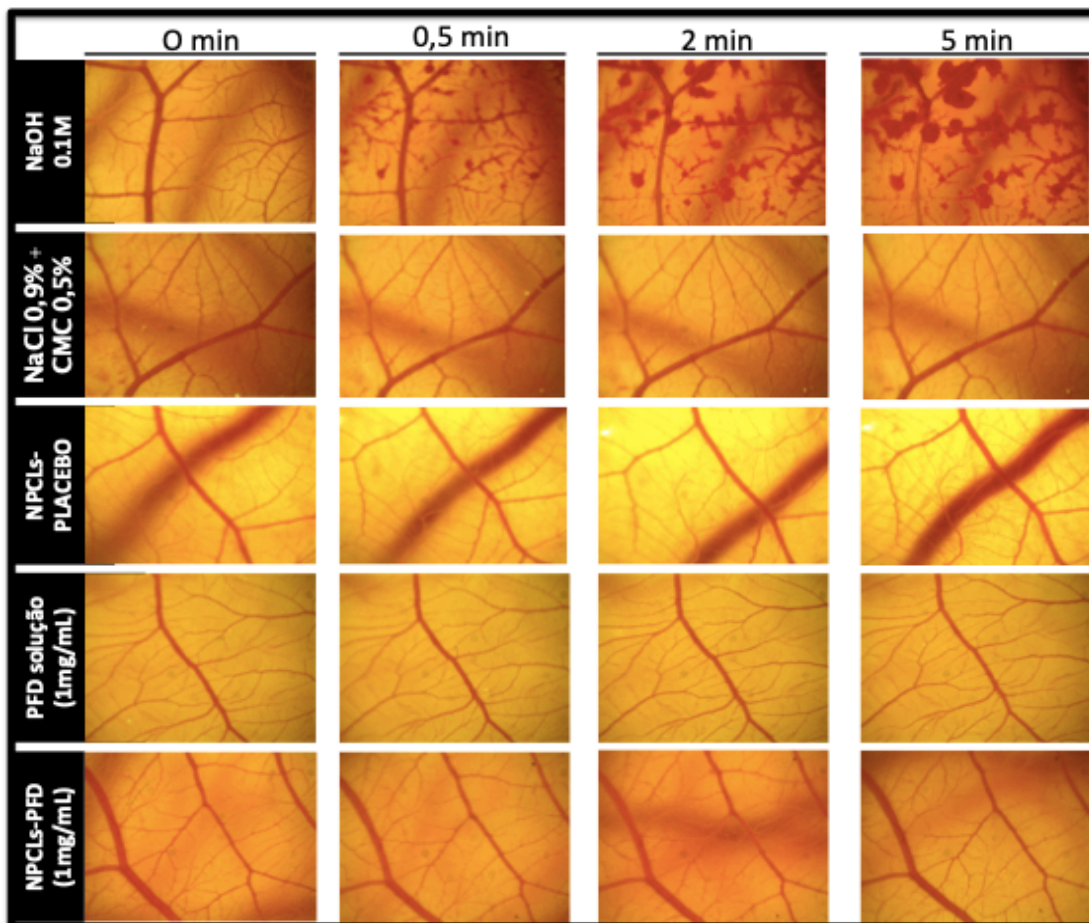
## 2 Resultados e discussão

### 2.1 Teste de biocompatibilidade e tolerância ocular

A membrana corioalantóide do embrião de galinha possui tecidos completos, incluindo artérias, veias e capilares, permitindo analisar respostas semelhantes as encontradas no tecido conjuntival na inflamação (Warren, Atkinson et al. 1990). As NPCLs-placebo, PFD solução oftálmica, NPCLs-PFD, NaCl 0,9% + CMC 0,5% (controle negativo) e NaOH 0,1M (controle positivo) foram testadas quanto ao potencial de irritação após instilação das mesmas sobre a membrana corioalantóide durante um período de 5 minutos e pontuadas (**Figura 14**). Os resultados mostraram (**Tabela 1**) que NPCLs-placebo, PFD solução oftálmica, NPCLs-PFD, NaCl 0,9% + CMC 0,5% (controle negativo) foram praticamente não irritantes (pontuação  $\leq 0,9$ ), enquanto a solução de NaOH 0,1M mostrou alta irritação como coagulação, lise e hemorragia em reduzido tempo de exposição (pontuação de 19,53). A partir do estudo, concluiu-se que os componentes das NPCLs-PFD não são irritantes e são bem tolerados para administração ocular.

Junqueira e colaboradores (2018) usando uma formulação com componentes próximos da proporção usada neste estudo para obtenção de nanopartículas de cristal líquido, também obtiveram resultados similares de toxicidade. Nenhuma das formulações causaram coagulação, poucos sinais de hemorragia e reduzidas manchas de lise puderam ser observadas após tratamento, porém ainda assim as formulações foram classificadas como não irritantes ou levemente irritante (pontuação de 0,89) (Junqueira Garcia, Pedralino Goncalves et al. 2018).

**Figura 14.** Sequência de fotografias ilustrando o efeito da administração de 100 $\mu$ L de NaOH 0,1 M (controle positivo), NaCl a 0,9% + CMC a 0,5% (controle negativo), NPCLs-placebo (veículo), PFD solução a 1 mg/mL e NPCLs-PFD a 1 mg/mL na membrana ao longo de um período de 5 min.



**Tabela 1-** Pontuações do Índice de Irritação Ocular (IIO)

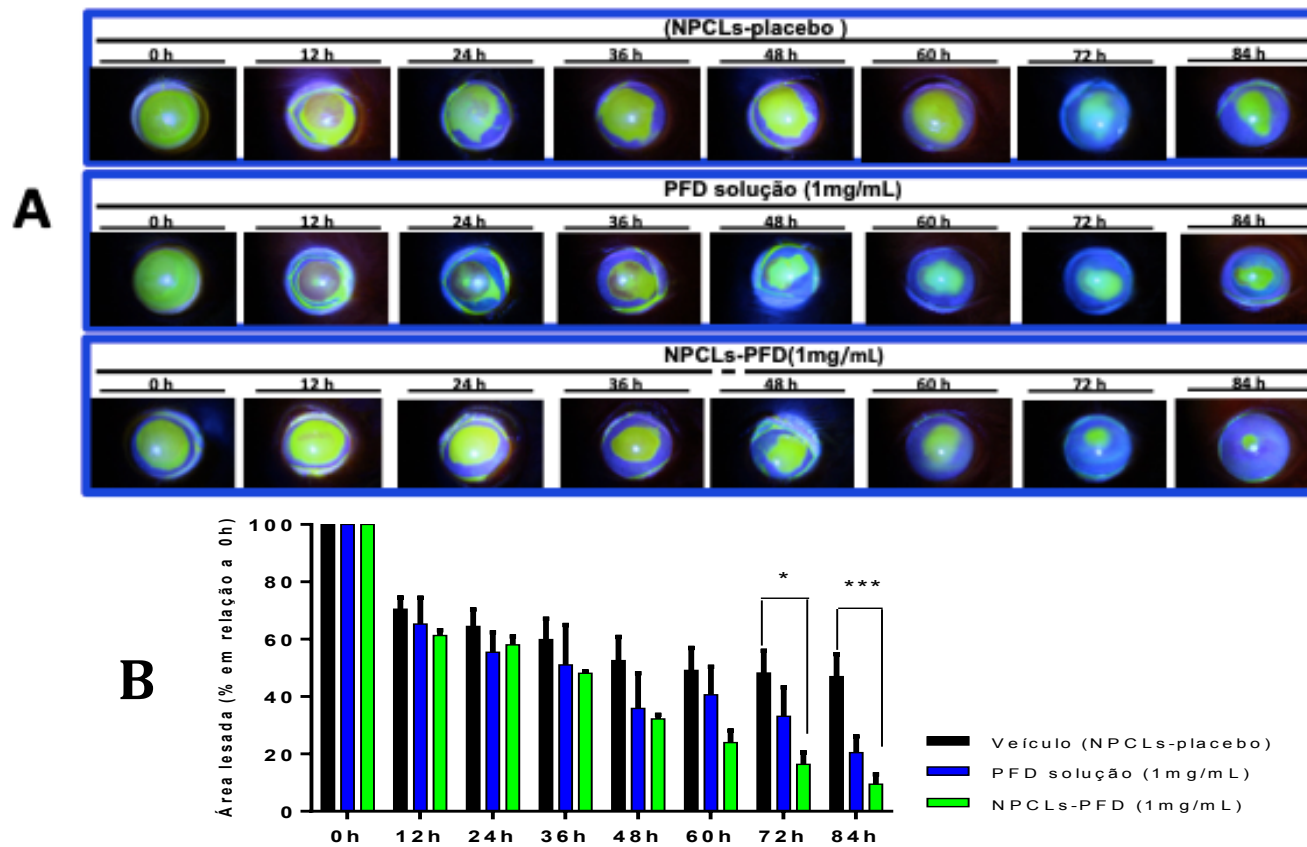
Amostra	IIO±EPM	Classi. irritação
0,1M NaOH, 100µL (controle positivo )	19.53 ± 0,05	SI
NaCl 0,9% + CMC 0,5%, 100µL (controle negativo)	≤0,9 ± 0,0	NI
NPCLs-placebo (veículo), 100µL	≤0,9 ± 0,0	NI
PFD solução – 1mg/mL, 100µL	≤0,9 ± 0,0	NI
NPCLs-PFD – 1mg/mL, 100µL	≤0,9 ± 0.0	NI

\*NI - não irritante ou levemente irritante; \* SI - Severamente irritante. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão da média (n = 10).

## 2.2 Avaliação do tempo de reepitelização da córnea

Tem sido demonstrado que a córnea de coelho é semelhante em tamanho à córnea humana permitindo que os resultados encontrados nesse modelo animal sejam transferidos para a pesquisa clínica em humanos (Imanishi, Kamiyama et al. 2000). Além disso, a córnea de coelho possui resposta em relação ao tempo de cicatrização, extensão da cicatrização e formação de miofibroblastos muito parecida ao que se observa na córnea humana (Stepp, Zieske et al. 2014). As fotografias de córneas sob luz azul-cobalto após coloração com fluoresceína são mostradas na **Figura 15A**, e o progresso da cicatrização é medido na **Figura 15B**. Os olhos dos animais (n = 5 por grupo) foram tratados com veículo (NPCLs-placebo), PFD solução oftálmica a 1 mg/mL e NPCLs-PFD a 1 mg/mL, todos com um volume fixo de 100 µL. Durante as primeiras 60h não foi observada diferença no padrão de cicatrização das lesões corneanas dos animais. No entanto, após 72 horas os animais que receberam o veículo tiveram uma redução de lesão de 52% enquanto o grupo tratado com NPCLs-PFD com 1mg/mL teve uma redução de 84% da lesão (\* p <0,05). Quando avaliado 84 horas após a queimadura química da córnea, os animais tratados com NPCLs-PFD a 1mg/mL e NPCLs-placebo exibiram reduções nas lesões da córnea de 91% e 54%, respectivamente (\*\*\*) p <0,01). Isto indicou uma melhoria no processo de cicatrização nos olhos tratados com NPCLs-PFD. Entretanto, não foram observadas diferenças na cicatrização entre as NPCLs-placebo e o grupo tratado com solução de PFD a 1 mg/mL, bem como nenhuma diferença entre as NPCLs-PFD a 1 mg/mL e a solução de PFD a 1 mg/mL (**Figura 15B**). É possível observar que, após 72 horas de administração de NPCLs-PFD, foi alcançada uma possível concentração de equilíbrio que levou ao efeito terapêutico desejado (reepitelização da córnea). Isto demonstra que as NPCLs-PFD aumentaram o tempo de contato entre o fármaco e a córnea, o que não é observado nos grupos tratados com a solução PFD devido à elevada depuração da PFD.

**Figura 15.** Efeito das NPCLs-PFD a 1mg/mL na cicatrização da córnea após queimadura química: **(A)** Figuras representativas das córneas tratadas com NPCLs-placebo, solução de PFD a 1 mg/mL e NPCLs-PFD a 1 mg/mL durante 84h. **(B)** O tempo de reepitelização da córnea foi reduzido quando administrada as NPCLs-PFD a 1mg/mL comparado ao grupo tratado com as NPCLs-placebo após 72 h (\*  $p < 0.05$ ) e 84 h (\*\* $p < 0,01$ ). Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM,  $n = 5$ . Foi usado análise de variância unidirecional (ANOVA), seguido pelo teste de comparação Bonferroni e considerado estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$ .





Resultados semelhantes de um bom processo de reepitelização foram encontrados administrando uma formulação de PFD encapsulada em PLGA 50:50 (5 mg/mL, 20  $\mu$ L) administrada na forma de colírio uma vez ao dia durante 7 dias, após dano à córnea por queimadura alcalina (Chowdhury, Guha et al. 2013). O tempo de reepitelização da córnea foi significativamente reduzido no grupo tratado com a nanopartículas de PLGA contendo pirfenidona em comparação com o grupo controle após 7 dias. Da mesma forma, Jiang e colaboradores (2018) usando modelo de queimadura alcalina em córnea de ratos administraram topicamente 10  $\mu$ L de pirfenidona (1mg/mL) dissolvida em solução salina tamponada com fosfato (PBS) quatro vezes por dia durante 14 dias. As lesões da córnea do grupo tratado com pirfenidona estavam próximo a cicatrização total no 7° dia de estudo, enquanto a lesão da córnea do grupo controle era ainda óbvia (Jiang, Ma et al. 2018). O efeito cicatrizante e antifibrótico da pirfenidona também foi verificado após administração tópica (5 mg/mL) em coelhos que foram submetidos a cirurgia de glaucoma (Teller and White 2009, Jung and Park 2016).

Foi demonstrado que a PFD inibe uma variedade de citocinas envolvidas na cicatrização de feridas, incluindo o TGF- $\beta$ , que tem a capacidade de controlar alterações fibróticas e proliferação de células epiteliais na cicatrização de tecidos oculares (Di Sario, Bendia et al. 2004, Jung, Choi et al. 2012). Foi observado supressão no influxo de células inflamatórias e macrófagos no sétimo dia pós-instilação da pirfenidona e níveis de TGF- $\beta$  reduziram significativamente em 33% usando hamster como modelo animal (Card, Racz et al. 2003).

Um possível mecanismo de ação para a aceleração da cicatrização com a utilização da PFD seria por neutralizar o efeito citostático celular induzido por TGF- $\beta$ , o que geraria uma proliferação aumentada das células epiteliais da córnea, resultando em uma reepitelização mais rápida da região lesionada. Em estudo *in vitro* utilizando fibroblastos humanos (fibroblastos Tenon) foi demonstrado que a pirfenidona reprimiu a expressão de TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3 (Lin, Yu et al. 2009). Uma rápida reepitelização ajuda a restabelecer a homeostase da córnea e a prevenir danos adicionais ao estroma subjacente. Portanto, como

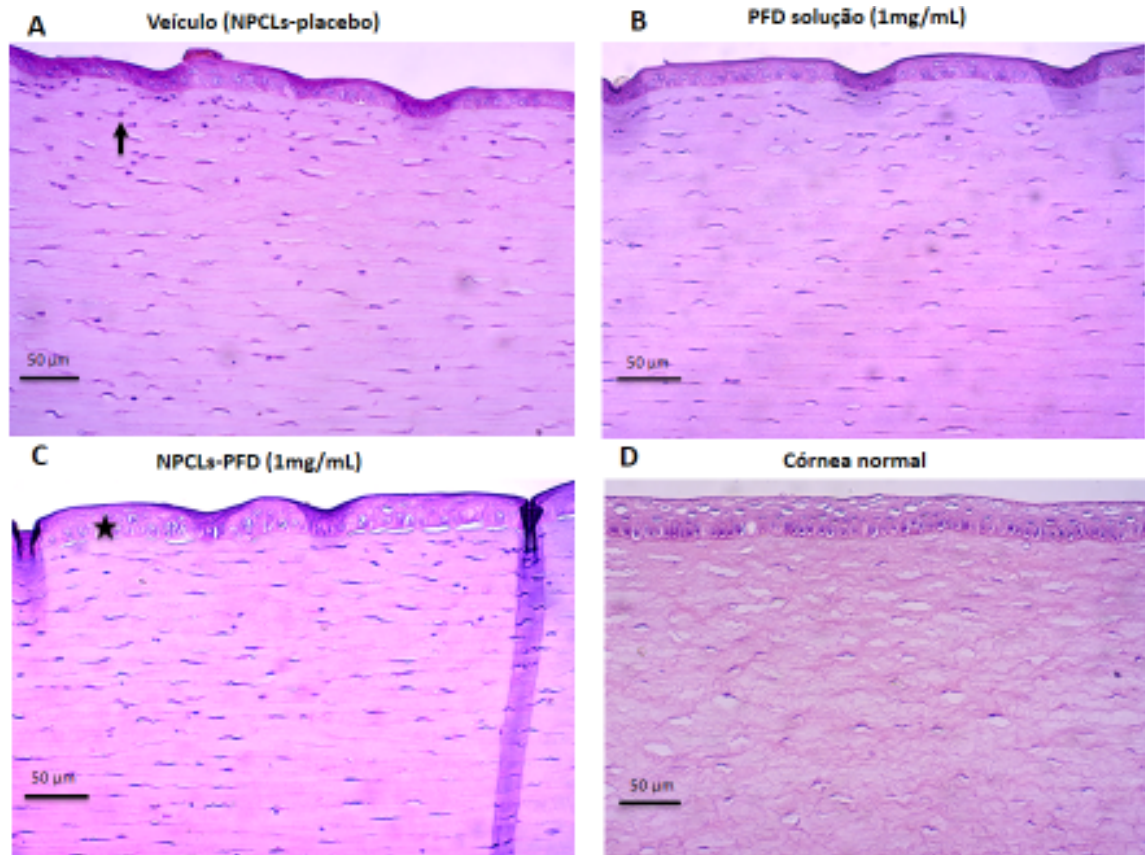
demonstrado pelos resultados o sistema NPCLs-PFD a 1 mg/mL acelerou a recuperação da área lesionada com cicatrização quase total da córnea após 84h do início do tratamento. Desse modo, concluímos que as nanopartículas de cristal líquido melhoram a biodisponibilidade do fármaco promovendo uma melhor repitelização do tecido e surgindo como uma terapia potencial para mediar as queimaduras químicas da córnea.

### 2.3 Histologia

A avaliação histológica do epitélio corneano decorrido 84 horas da lesão é mostrada na **Figura 16**. Animais tratados com NPCLs-PFD a 1mg/mL, 100µL apresentaram estroma com fibrócitos normais e o epitélio formado com seis a sete camadas de células, semelhante ao encontrado na córnea normal, justificando o fato do grupo possuir uma melhor reepitelização da córnea. Por outro lado, a histologia do grupo tratado com solução oftálmica de PFD a 1mg/mL, 100µL e NPCLs-placebo (veículo) evidenciam um epitélio menos espesso. Também é possível verificar que a histologia do grupo tratado com NPCLs-placebo (veículo) possui mais granulação e infiltrado inflamatório quando comparados com os dois grupos tratados com pirfenidona e com a córnea normal.

Esses resultados corroboram com estudos prévios que demonstraram que a pirfenidona além de ser um agente antifibrótico apresentava propriedades anti-inflamatórias substanciais em teste realizados em pacientes com fibrose pulmonar (Bayhan, Zeren et al. 2016).

**Figura 16.** Corte histológico da córnea de coelho excisada mostrando epitélio (EP) e estroma, corados com hematoxilina-eosina após 84 h de lesão. Os grupos (A) foram tratados apenas com veículo (NPCLs-placebo), (B) PFD solução à 1 mg/mL, (C) NPCLs-PFD a 1mg/mL e (D) córnea normal. Seta indica células inflamatórias próximas ao epitélio da córnea. Estrela indica multicamadas de células epiteliais.



## 2.4 Análise de infiltrados celulares por quantificação das enzimas MPO e NAG

A mieloperoxidase (MPO) é uma peroxidase contendo heme sintetizada durante a diferenciação mieloide, que constitui um componente principal dos grânulos azurofílicos neutrofílicos, e tem sido amplamente utilizada como marcador para medir a acumulação de leucócitos polimorfonucleares em amostras de tecidos (McCormick, Nelson et al. 2012). A N-acetilglucosaminidase (NAG), presente nos lisossomos, tem sido empregada

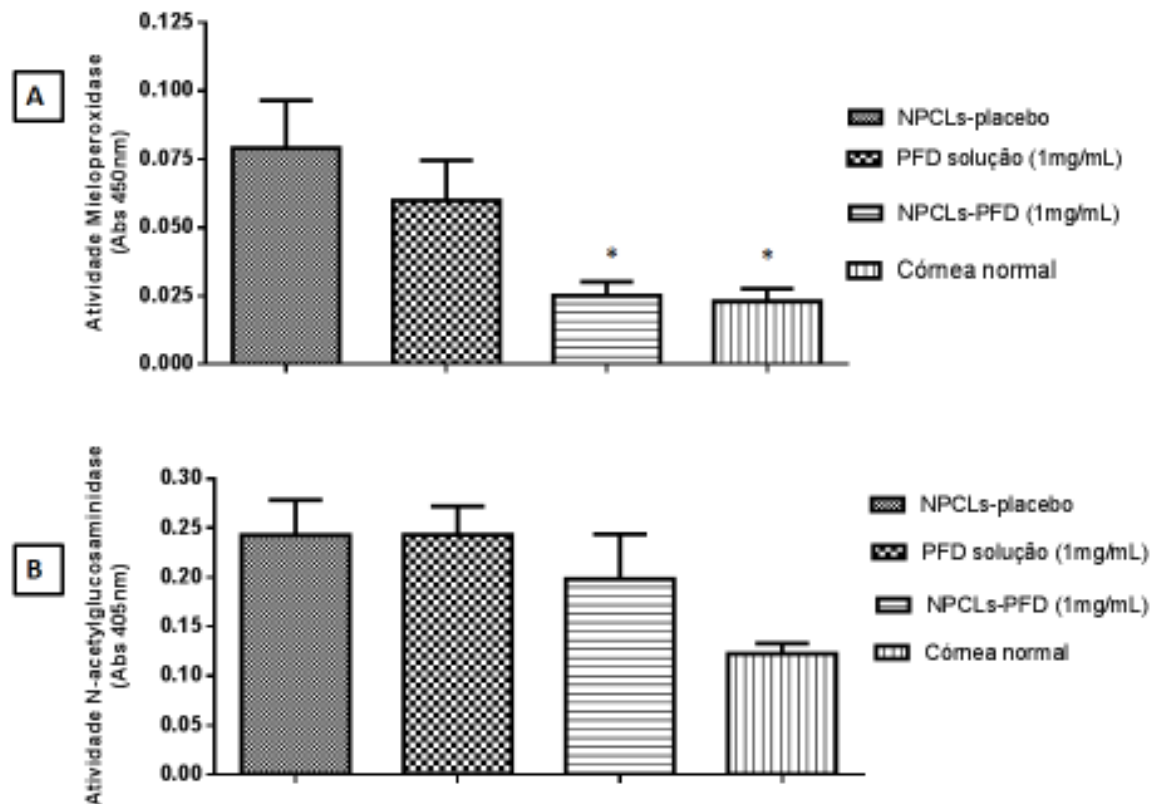
para detectar acúmulo/ativação de macrófagos em uma variedade de tecidos animais e humanos.

Como ilustrado na **Figura 17A**, as atividades de MPO foram menores em animais tratados com NPCLs-PFD a 1 mg/mL comparativamente com as NPCLs-placebo (\*p <0,034). Além disso, houve diferença entre os animais tratados com NPCLs-placebo e animal saudável (\*p <0,026). Encontramos menor atividade de MPO em animais que tiveram lesão química da córnea que foi tratada com NPCLs-PFD a 1mg/mL, o que reflete a redução do acúmulo de neutrófilos nessa região após 84 horas.

A PFD exerce seus efeitos reduzindo os níveis de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , proteína quimiotática de monócitos-1, interleucina-1 $\beta$  e interleucina-6, regulando negativamente a transcrição do TGF- $\beta$  e reduzindo a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo (Misra and Rabideau 2000, Oku, Nakazato et al. 2002, Oku, Shimizu et al. 2008). A melhora no padrão de cicatrização da córnea pode, portanto, estar relacionada a uma redução de células inflamatórias evidenciada pela menor atividade da MPO e como demonstrado pela histologia no grupo de animais que foram tratados com NPCLs-PFD a 1mg/mL (**Figura 16C**). Embora tenha sido descrito em alguns estudos a presença de macrófagos na resposta inflamatória em lesões corneanas, neste modelo avaliado de queimadura química não houve diferença entre os grupos quando avaliado a enzima NAG (**Figura 17B**). Novos estudos com outros biomarcadores inflamatórios são indicados para melhor entender o papel da inflamação nas lesões químicas da córnea.

**Figura 17.** Representação gráfica da quantificação das enzimas MPO e NAG da córneas de coelhos tratados com NPCLs-placebo, solução de PFD a 1 mg/mL e NPCLs-PFD a 1 mg/mL durante 84h. **(A)** Análise de mieloperoxidase (MPO) após 82 horas mostrou uma redução dos níveis dessa enzima nos coelhos tratados com NPCLs-PFD a 1 mg/mL. **(B)** A atividade da N-acetilglucosaminidase (NAG) na córneas de coelhos após 84 horas de tratamento não mostrou diferença entre os grupos avaliados. Foi usado análise de variância unidirecional (ANOVA), seguido pelo pos

teste de comparação Bonferroni e considerado estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$ .



### 3 Conclusão

As nanopartículas de cristal líquido desenvolvidas não induziram nenhum tipo de irritação ocular por meio do teste HET-CAM, comprovando que os componentes da formulação poderiam ser utilizados em preparações oftálmicas com segurança. O estudo *in vivo* utilizando queimadura química na córnea de coelhos comprovou uma aceleração na reepitelização da córnea após 72 horas de tratamento com NPCLs-PFD 1mg/mL (100  $\mu$ L, 12h/12h) quando comparado com o grupo controle. O estudo histológico da córnea dos animais tratados com as nanopartículas contendo pirfenidona evidenciou, qualitativamente, um menor infiltrado inflamatório e maior número de camadas de células formando o epitélio da córnea, indicio de uma melhor reepitelização do tecido. A análise de infiltrados celulares por quantificação da enzima MPO mostrou que um menor número de

leucócitos (polimorfonucleares) estão presentes no local da lesão no grupo dos animais tratados com NPCLs-PFD corroborando com os achados na histologia. Conclui-se que as nanopartículas contendo pirfenidona melhoram notavelmente a cicatrização de lesões da córnea sendo um potencial terapêutico no tratamento de queimaduras químicas que acometem o segmento anterior do olho.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS**

Foi desenvolvida uma formulação de nanopartículas de cristal líquido contendo pirfenidona que apresentou características desejáveis para administração ocular tópica no tratamento de lesões da córnea provocadas por queimadura química. Como características físicas as partículas produzidas tinham aspecto esférico, escala nanométrica e alta homogeneidade. Possivelmente, a mesofase obtida pelas nanopartículas foi a hexagonal e a liberação *in vitro* mostrou que a pirfenidona foi liberada por mais de 6 horas. Além disso, a formulação apresentou estabilidade adequada durante o período avaliado e não demonstrou sinais de irritação ocular por meio do teste HET-CAM. Os estudos *in vivo* mostraram que as NPCLs-PFD melhoraram a biodisponibilidade do fármaco, refletindo em uma aceleração da epitelização do tecido lesado e redução do processo inflamatório.

Com base nos resultados do presente estudo, pretende-se como perspectivas:

- Utilizar novos métodos para obtenção das nanopartículas bem como adição de novos componentes na formulação com o intuito de aumentar a taxa de encapsulação do fármaco,
- Caracterização por meio de raio X de baixo ângulo a mesofase na qual o sistema cristal líquido se encontra.
- Elucidar o mecanismo envolvido na ação anti-inflamatória das NPCLs-PFD por meio da avaliação de biomarcadores envolvidos no processo de lesão da córnea por queimadura química;
- Validar método bioanalítico para quantificação do fármaco nos tecidos oculares;
- Avaliar *in vitro* a permeação da formulação/fármaco;
- Avaliar a eficácia dos sistemas desenvolvidos em outros modelos de lesões químicas que apresentem uma resposta inflamatória associada.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abdelaziz, H. M., A. O. Elzoghby, M. W. Helmy, M. W. Samaha, J. Y. Fang and M. S. Freag (2019). "Liquid crystalline assembly for potential combinatorial chemo-herbal drug delivery to lung cancer cells." Int J Nanomedicine **14**: 499-517.

Agbenorku, P., J. Akpaloo, F. Chirurgie, K. Aboah, E. Klutsey, P. E. Hoyte-Williams, B. Farhat, E. Turkson, J. Yorke, F. Chirurgie, R. Ametih and R. Hussey (2015). "Chemical Burn Injury in Kumasi: The Trend and Complications following and Their Management." Plast Reconstr Surg Glob Open **3**(10): e548.

Agrahari, V., A. Mandal, V. Agrahari, H. M. Trinh, M. Joseph, A. Ray, H. Hadji, R. Mitra, D. Pal and A. K. Mitra (2016). "A comprehensive insight on ocular pharmacokinetics." Drug Deliv Transl Res **6**(6): 735-754.

Al Arfaj, K. (2015). "Boston keratoprosthesis - Clinical outcomes with wider geographic use and expanding indications - A systematic review." Saudi J Ophthalmol **29**(3): 212-221.

Angelova, A., B. Angelov, R. Mutafchieva, S. Lesieur and P. Couvreur (2011). "Self-assembled multicompartiment liquid crystalline lipid carriers for protein, peptide, and nucleic acid drug delivery." Acc Chem Res **44**(2): 147-156.

Antoniou, S. A. (2006). "Pirfenidone for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis." Expert Opin Investig Drugs **15**(7): 823-828.

Astolfi, P., E. Giorgini, V. Gambini, B. Rossi, L. Vaccari, F. Vita, O. Francescangeli, C. Marchini and M. Pisani (2017). "Lyotropic Liquid-Crystalline Nanosystems as Drug Delivery Agents for 5-Fluorouracil: Structure and Cytotoxicity." Langmuir **33**(43): 12369-12378.

Awwad, S., A. H. A. Mohamed Ahmed, G. Sharma, J. S. Heng, P. T. Khaw, S. Brocchini and A. Lockwood (2017). "Principles of pharmacology in the eye." Br J Pharmacol **174**(23): 4205-4223.

Baalousha, M. and J. R. Lead (2012). "Rationalizing nanomaterial sizes measured by atomic force microscopy, flow field-flow fractionation, and dynamic light scattering: sample preparation, polydispersity, and particle structure." Environ Sci Technol **46**(11): 6134-6142.

Baldwin, H. C. and J. Marshall (2002). "Growth factors in corneal wound healing following refractive surgery: A review." Acta Ophthalmol Scand **80**(3): 238-247.

Baradaran-Rafii, A., M. Eslani, Z. Haq, E. Shirzadeh, M. J. Huvard and A. R. Djalilian (2017). "Current and Upcoming Therapies for Ocular Surface Chemical Injuries." Ocul Surf **15**(1): 48-64.

Barar, J., A. R. Javadzadeh and Y. Omidi (2008). "Ocular novel drug delivery: impacts of membranes and barriers." Expert Opin Drug Deliv **5**(5): 567-581.

Bayhan, Z., S. Zeren, F. E. Kocak, C. Kocak, R. Akcilar, E. Kargi, C. Tiryaki, F. Yaylak and A. Akcilar (2016). "Antiadhesive and anti-inflammatory effects of pirfenidone in postoperative intra-abdominal adhesion in an experimental rat model." J Surg Res **201**(2): 348-355.

Berman, M., E. Manseau, M. Law and D. Aiken (1983). "Ulceration is correlated with degradation of fibrin and fibronectin at the corneal surface." Invest Ophthalmol Vis Sci **24**(10): 1358-1366.

Bhattacharjee, A., P. J. Das, P. Adhikari, D. Marbaniang, P. Pal, S. Ray and B. Mazumder (2018). "Novel drug delivery systems for ocular therapy: With special reference to liposomal ocular delivery." Eur J Ophthalmol: 1120672118769776.

Bhattacharjee, S. (2016). "DLS and zeta potential - What they are and what they are not?" J Control Release **235**: 337-351.

Boyd, B. J., S. B. Rizwan, Y. D. Dong, S. Hook and T. Rades (2007). "Self-assembled geometric liquid-crystalline nanoparticles imaged in three dimensions: hexosomes are not necessarily flat hexagonal prisms." Langmuir **23**(25): 12461-12464.

Braga-Mele, R., D. F. Chang, B. A. Henderson, N. Mamalis, A. Talley-Rostov, A. Vasavada and A. C. C. Committee (2014). "Intracameral antibiotics: Safety, efficacy, and preparation." J Cataract Refract Surg **40**(12): 2134-2142.

Bucolo, C., F. Drago and S. Salomone (2012). "Ocular drug delivery: a clue from nanotechnology." Front Pharmacol **3**: 188.

Burghardt, I., F. Tritschler, C. A. Opitz, B. Frank, M. Weller and W. Wick (2007). "Pirfenidone inhibits TGF-beta expression in malignant glioma cells." Biochem Biophys Res Commun **354**(2): 542-547.

Cankaya, A. B. and S. Ozates (2017). "Relationship between anterior segment and optic nerve head parameters in healthy subjects." Arq Bras Oftalmol **80**(5): 285-289.

Card, J. W., W. J. Racz, J. F. Brien, S. B. Margolin and T. E. Massey (2003). "Differential effects of pirfenidone on acute pulmonary injury and ensuing fibrosis in the hamster model of amiodarone-induced pulmonary toxicity." Toxicol Sci **75**(1): 169-180.

Celia, C., M. Locatelli, F. Cilurzo, D. Cosco, E. Gentile, D. Scalise, M. Carafa, C. A. Ventura, M. Fleury, C. Tisserand, R. C. Barbacane, M. Fresta, L. Di Marzio and D. Paolino (2015). "Long Term Stability Evaluation of Prostacyclin Released from Biomedical Device through Turbiscan Lab Expert." Med Chem **11**(4): 391-399.

Chen, Y., P. Ma and S. Gui (2014). "Cubic and hexagonal liquid crystals as drug delivery systems." Biomed Res Int **2014**: 815981.

Cher, I. (2012). "Fluids of the ocular surface: concepts, functions and physics." Clin Exp Ophthalmol **40**(6): 634-643.

Cholkar, K., S. P. Patel, A. D. Vadlapudi and A. K. Mitra (2013). "Novel strategies for anterior segment ocular drug delivery." J Ocul Pharmacol Ther **29**(2): 106-123.

Chowdhury, S., R. Guha, R. Trivedi, U. B. Kompella, A. Konar and S. Hazra (2013). "Pirfenidone nanoparticles improve corneal wound healing and prevent scarring following alkali burn." PLoS One **8**(8): e70528.

Clogston, J. and M. Caffrey (2005). "Controlling release from the lipidic cubic phase. Amino acids, peptides, proteins and nucleic acids." J Control Release **107**(1): 97-111.

Danaei, M., M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani and M. R. Mozafari (2018). "Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems." Pharmaceutics **10**(2).

de Campo, L., A. Yaghmur, L. Sagalowicz, M. E. Leser, H. Watzke and O. Glatter (2004). "Reversible phase transitions in emulsified nanostructured lipid systems." Langmuir **20**(13): 5254-5261.

Del Amo, E. M., A. K. Rimpela, E. Heikkinen, O. K. Kari, E. Ramsay, T. Lajunen, M. Schmitt, L. Pelkonen, M. Bhattacharya, D. Richardson, A. Subrizi, T. Turunen, M. Reinisalo, J. Itkonen, E. Toropainen, M. Casteleijn, H. Kidron, M. Antopolsky, K. S. Vellonen, M. Ruponen and A. Urtti (2017). "Pharmacokinetic aspects of retinal drug delivery." Prog Retin Eye Res **57**: 134-185.

DelMonte, D. W. and T. Kim (2011). "Anatomy and physiology of the cornea." J Cataract Refract Surg **37**(3): 588-598.

Di Sario, A., E. Bendia, G. Macarri, C. Candelaresi, S. Taffetani, M. Marzioni, A. Omenetti, S. De Minicis, L. Trozzi and A. Benedetti (2004). "The anti-fibrotic effect of pirfenidone in rat liver fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I), TIMP-1 and MMP-2." Dig Liver Dis **36**(11): 744-751.

Dian, L., Z. Yang, F. Li, Z. Wang, X. Pan, X. Peng, X. Huang, Z. Guo, G. Quan, X. Shi, B. Chen, G. Li and C. Wu (2013). "Cubic phase nanoparticles for sustained release of ibuprofen: formulation, characterization, and enhanced bioavailability study." Int J Nanomedicine **8**: 845-854.

Djebli, N., S. Khier, F. Griguer, A. L. Coutant, A. Tavernier, G. Fabre, C. Leriche and D. Fabre (2017). "Ocular Drug Distribution After Topical Administration: Population Pharmacokinetic Model in Rabbits." Eur J Drug Metab Pharmacokinet **42**(1): 59-68.

Domingos, R. F., M. A. Baalousha, Y. Ju-Nam, M. M. Reid, N. Tufenkji, J. R. Lead, G. G. Leppard and K. J. Wilkinson (2009). "Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes." Environ Sci Technol **43**(19): 7277-7284.

Ehlers, N., S. Heegaard, J. Hjortdal, A. Ivarsen, K. Nielsen and J. U. Prause (2010). "Morphological evaluation of normal human corneal epithelium." Acta Ophthalmol **88**(8): 858-861.

Fangueiro, J. F., A. C. Calpena, B. Clares, T. Andreani, M. A. Egea, F. J. Veiga, M. L. Garcia, A. M. Silva and E. B. Souto (2016). "Biopharmaceutical evaluation of epigallocatechin gallate-loaded cationic lipid nanoparticles (EGCG-LNs): In vivo, in vitro and ex vivo studies." Int J Pharm **502**(1-2): 161-169.

Fink, M. K., E. A. Giuliano, A. Tandon and R. R. Mohan (2015). "Therapeutic potential of Pirfenidone for treating equine corneal scarring." Vet Ophthalmol **18**(3): 242-250.

Fish, R. and R. S. Davidson (2010). "Management of ocular thermal and chemical injuries, including amniotic membrane therapy." Curr Opin Ophthalmol **21**(4): 317-321.

Fong, C., T. Le and C. J. Drummond (2012). "Lyotropic liquid crystal engineering-ordered nanostructured small molecule amphiphile self-assembly materials by design." Chem Soc Rev **41**(3): 1297-1322.

Furuya, K., S. Sakamoto, H. Shimizu, M. Sekiya, A. Kinoshita, T. Isshiki, K. Sugino, K. Matsumoto and S. Homma (2017). "Pirfenidone for acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: A retrospective study." Respir Med **126**: 93-99.

Gallar, J., P. Garcia de la Rubia, G. G. Gonzalez and C. Belmonte (1995). "Irritation of the anterior segment of the eye by ultraviolet radiation: influence of nerve blockade and calcium antagonists." Curr Eye Res **14**(9): 827-835.

Gan, L., S. Han, J. Shen, J. Zhu, C. Zhu, X. Zhang and Y. Gan (2010). "Self-assembled liquid crystalline nanoparticles as a novel ophthalmic delivery system for dexamethasone: Improving preocular retention and ocular bioavailability." Int J Pharm **396**(1-2): 179-187.

Gaudana, R., H. K. Ananthula, A. Parenky and A. K. Mitra (2010). "Ocular drug delivery." AAPS J **12**(3): 348-360.

Ghasemiyeh, P. and S. Mohammadi-Samani (2018). "Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages." Res Pharm Sci **13**(4): 288-303.

Guo, C., J. Wang, F. Cao, R. J. Lee and G. Zhai (2010). "Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery." Drug Discov Today **15**(23-24): 1032-1040.

Hahnel, C., S. Somodi, D. G. Weiss and R. F. Guthoff (2000). "The keratocyte network of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy." Cornea **19**(2): 185-193.

Hamill, C. E., S. Bozorg, H. Y. Peggy Chang, H. Lee, R. R. Sayegh, A. N. Shukla and J. Chodosh (2013). "Corneal alkali burns: a review of the literature and proposed protocol for evaluation and treatment." Int Ophthalmol Clin **53**(4): 185-194.

Haring, R. S., I. D. Sheffield, R. Channa, J. K. Canner and E. B. Schneider (2016). "Epidemiologic Trends of Chemical Ocular Burns in the United States." JAMA Ophthalmol **134**(10): 1119-1124.

Hewitson, T. D., K. J. Kelynack, M. G. Tait, M. Martic, C. L. Jones, S. B. Margolin and G. J. Becker (2001). "Pirfenidone reduces in vitro rat renal fibroblast activation and mitogenesis." J Nephrol **14**(6): 453-460.

Hisatomi, K., H. Mukae, N. Sakamoto, Y. Ishimatsu, T. Kakugawa, S. Hara, H. Fujita, S. Nakamichi, H. Oku, Y. Urata, H. Kubota, K. Nagata and S. Kohno (2012). "Pirfenidone inhibits TGF-beta1-induced over-expression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells." BMC Pulm Med **12**: 24.

Imanishi, J., K. Kamiyama, I. Iguchi, M. Kita, C. Sotozono and S. Kinoshita (2000). "Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea." Prog Retin Eye Res **19**(1): 113-129.

Jiang, N., M. Ma, Y. Li, T. Su, X. Z. Zhou, L. Ye, Q. Yuan, P. Zhu, Y. Min, W. Shi, X. Xu, J. Lv and Y. Shao (2018). "The role of pirfenidone in alkali burn rat cornea." Int Immunopharmacol **64**: 78-85.

Johannesson, G., E. Stefansson and T. Loftsson (2016). "Microspheres and Nanotechnology for Drug Delivery." Dev Ophthalmol **55**: 93-103.

Jung, K. I., J. S. Choi, H. K. Kim and S. Y. Shin (2012). "Effects of an anti-transforming growth factor-beta agent (pirfenidone) on strabismus surgery in rabbits." Curr Eye Res **37**(9): 770-776.

Jung, K. I. and C. K. Park (2016). "Pirfenidone inhibits fibrosis in foreign body reaction after glaucoma drainage device implantation." Drug Des Devel Ther **10**: 1477-1488.

Junqueira Garcia, M. T., T. Pedralino Goncalves, E. Sao Felix Martins, T. Silva Martins, M. Carvalho de Abreu Fantini, P. R. Regazi Minarini, S. Costa Fernandez, G. Cassone Salata and L. Biagini Lopes (2018). "Improvement of cutaneous delivery of methylene blue by liquid crystals." Int J Pharm **548**(1): 454-465.

Karamichos, D., X. Q. Guo, A. E. Hutcheon and J. D. Zieske (2010). "Human corneal fibrosis: an in vitro model." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(3): 1382-1388.

Kaur, I. P. and R. Smitha (2002). "Penetration enhancers and ocular bioadhesives: two new avenues for ophthalmic drug delivery." Drug Dev Ind Pharm **28**(4): 353-369.

Kenchegowda, S. and H. E. Bazan (2010). "Significance of lipid mediators in corneal injury and repair." J Lipid Res **51**(5): 879-891.

Kim, H., Y. H. Choi, S. J. Park, S. Y. Lee, S. J. Kim, I. Jou and K. H. Kook (2010). "Antifibrotic effect of Pirfenidone on orbital fibroblasts of patients with thyroid-associated ophthalmopathy by decreasing TIMP-1 and collagen levels." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(6): 3061-3066.

King, T. E., Jr., W. Z. Bradford, S. Castro-Bernardini, E. A. Fagan, I. Glaspole, M. K. Glassberg, E. Gorina, P. M. Hopkins, D. Kardatzke, L. Lancaster, D. J. Lederer, S. D. Nathan, C. A. Pereira, S. A. Sahn, R. Sussman, J. J. Swigris, P. W. Noble and A. S. Group (2014). "A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis." N Engl J Med **370**(22): 2083-2092.

Landau, E. M. and J. P. Rosenbusch (1996). "Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14532-14535.

Le, Q., Y. Chen, X. Wang, Y. Li, J. Hong and J. Xu (2011). "Vision-related quality of life in patients with ocular chemical burns." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(12): 8951-8956.

Lee, J. and I. W. Kellaway (2000). "Buccal permeation of [D-Ala(2), D-Leu(5)]enkephalin from liquid crystalline phases of glyceryl monooleate." Int J Pharm **195**(1-2): 35-38.

Li, J., L. Wu, W. Wu, B. Wang, Z. Wang, H. Xin and Q. Xu (2013). "A potential carrier based on liquid crystal nanoparticles for ophthalmic delivery of pilocarpine nitrate." Int J Pharm **455**(1-2): 75-84.

Li, W., Y. Hayashida, Y. T. Chen and S. C. Tseng (2007). "Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus." Cell Res **17**(1): 26-36.

Liang, L., W. Li, S. Ling, H. Sheha, W. Qiu, C. Li and Z. Liu (2009). "Amniotic membrane extraction solution for ocular chemical burns." Clin Exp Ophthalmol **37**(9): 855-863.

- Lin, A., N. Patel, D. Yoo, S. DeMartelaere and C. Bouchard (2011). "Management of ocular conditions in the burn unit: thermal and chemical burns and Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis." J Burn Care Res **32**(5): 547-560.
- Lin, X., M. Yu, K. Wu, H. Yuan and H. Zhong (2009). "Effects of pirfenidone on proliferation, migration, and collagen contraction of human Tenon's fibroblasts in vitro." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(8): 3763-3770.
- Liu, C., Q. Lan, W. He, C. Nie, C. Zhang, T. Xu, T. Jiang and S. Wang (2017). "Octa-arginine modified lipid emulsions as a potential ocular delivery system for disulfiram: A study of the corneal permeation, transcorneal mechanism and anti-cataract effect." Colloids Surf B Biointerfaces **160**: 305-314.
- Lu, L., P. S. Reinach and W. W. Kao (2001). "Corneal epithelial wound healing." Exp Biol Med (Maywood) **226**(7): 653-664.
- Ludwig, A. (2005). "The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery." Adv Drug Deliv Rev **57**(11): 1595-1639.
- Macias-Barragan, J., A. Sandoval-Rodriguez, J. Navarro-Partida and J. Armendariz-Borunda (2010). "The multifaceted role of pirfenidone and its novel targets." Fibrogenesis Tissue Repair **3**: 16.
- Maher, T. M. (2010). "Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis." Drugs Today (Barc) **46**(7): 473-482.
- Manaia, E. B., M. P. Abucafy, B. G. Chiari-Andreo, B. L. Silva, J. A. Oshiro Junior and L. A. Chivacci (2017). "Physicochemical characterization of drug nanocarriers." Int J Nanomedicine **12**: 4991-5011.
- Mas-Aixala, E., J. Gispets, N. Lupon and G. Cardona (2016). "The variability of corneal and anterior segment parameters in keratoconus." Cont Lens Anterior Eye **39**(6): 466-470.
- Matsuda, M., J. L. Ubels and H. F. Edelhauser (1985). "A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate." Invest Ophthalmol Vis Sci **26**(6): 897-900.
- McCormick, S., A. Nelson and W. M. Nauseef (2012). "Proconvertase proteolytic processing of an enzymatically active myeloperoxidase precursor." Arch Biochem Biophys **527**(1): 31-36.
- McCulley, J. P. (1990). "Ocular hydrofluoric acid burns: animal model, mechanism of injury and therapy." Trans Am Ophthalmol Soc **88**: 649-684.
- Mencucci, R., E. Favuzza, C. Bocalini, A. Lapucci, R. Felici, F. Resta, A. Chiarugi and L. Cavone (2014). "CoQ10-containing eye drops prevent UVB-induced cornea cell



damage and increase cornea wound healing by preserving mitochondrial function." Invest Ophthalmol Vis Sci **55**(11): 7266-7271.

Michelacci, Y. M. (2003). "Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix." Braz J Med Biol Res **36**(8): 1037-1046.

Miller, L., P. Clave, R. Farre, B. Lecea, M. R. Ruggieri, A. Ouyang, J. Regan and B. P. McMahon (2013). "Physiology of the upper segment, body, and lower segment of the esophagus." Ann N Y Acad Sci **1300**: 261-277.

Minkowski, J. S., S. P. Bartels, F. C. Delori, S. R. Lee, K. R. Kenyon and A. H. Neufeld (1984). "Corneal endothelial function and structure following cryo-injury in the rabbit." Invest Ophthalmol Vis Sci **25**(12): 1416-1425.

Mishraki, T., M. F. Ottaviani, A. I. Shames, A. Aserin and N. Garti (2011). "Structural effects of insulin-loading into HII mesophases monitored by electron paramagnetic resonance (EPR), small angle X-ray spectroscopy (SAXS), and attenuated total reflection Fourier transform spectroscopy (ATR-FTIR)." J Phys Chem B **115**(25): 8054-8062.

Misra, H. P. and C. Rabideau (2000). "Pirfenidone inhibits NADPH-dependent microsomal lipid peroxidation and scavenges hydroxyl radicals." Mol Cell Biochem **204**(1-2): 119-126.

Nagarwal, R. C., S. Kant, P. N. Singh, P. Maiti and J. K. Pandit (2009). "Polymeric nanoparticulate system: a potential approach for ocular drug delivery." J Control Release **136**(1): 2-13.

Nakazato, H., H. Oku, S. Yamane, Y. Tsuruta and R. Suzuki (2002). "A novel anti-fibrotic agent pirfenidone suppresses tumor necrosis factor-alpha at the translational level." Eur J Pharmacol **446**(1-3): 177-185.

Nayak, K. and M. Misra (2018). "A review on recent drug delivery systems for posterior segment of eye." Biomed Pharmacother **107**: 1564-1582.

Noble, P. W., C. Albera, W. Z. Bradford, U. Costabel, M. K. Glassberg, D. Kardatzke, T. E. King, Jr., L. Lancaster, S. A. Sahn, J. Szwarcberg, D. Valeyre, R. M. du Bois and C. S. Group (2011). "Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials." Lancet **377**(9779): 1760-1769.

Nolan, L. M., J. Corish, O. I. Corrigan and D. Fitzpatrick (2007). "Combined effects of iontophoretic and chemical enhancement on drug delivery. II. Transport across human and murine skin." Int J Pharm **341**(1-2): 114-124.

Oku, H., H. Nakazato, T. Horikawa, Y. Tsuruta and R. Suzuki (2002). "Pirfenidone suppresses tumor necrosis factor-alpha, enhances interleukin-10 and protects mice from endotoxic shock." Eur J Pharmacol **446**(1-3): 167-176.

Oku, H., T. Shimizu, T. Kawabata, M. Nagira, I. Hikita, A. Ueyama, S. Matsushima, M. Torii and A. Arimura (2008). "Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis." Eur J Pharmacol **590**(1-3): 400-408.

Pahuja, P., S. Arora and P. Pawar (2012). "Ocular drug delivery system: a reference to natural polymers." Expert Opin Drug Deliv **9**(7): 837-861.

Patel, A., K. Cholkar, V. Agrahari and A. K. Mitra (2013). "Ocular drug delivery systems: An overview." World J Pharmacol **2**(2): 47-64.

Patel, V. R. and Y. K. Agrawal (2011). "Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs." J Adv Pharm Technol Res **2**(2): 81-87.

Pfister, R. R. (1983). "The effects of chemical injury on the ocular surface." Ophthalmology **90**(6): 601-609.

Pomorski, T. G., T. Nylander and M. Cardenas (2014). "Model cell membranes: discerning lipid and protein contributions in shaping the cell." Adv Colloid Interface Sci **205**: 207-220.

Qiu, H. and M. Caffrey (2000). "The phase diagram of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects." Biomaterials **21**(3): 223-234.

Reis, C. P., R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro and F. Veiga (2006). "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles." Nanomedicine **2**(1): 8-21.

Rezvani, M., J. Hesari, S. H. Peighambaroust, M. Manconi and H. Hamishehkar (2018). "Development and Characterization of Nanostructured Pharmacosomal Mesophases: An Innovative Delivery System for Bioactive Peptides." Adv Pharm Bull **8**(4): 609-615.

Rizwan, S. B., B. J. Boyd, T. Rades and S. Hook (2010). "Bicontinuous cubic liquid crystals as sustained delivery systems for peptides and proteins." Expert Opin Drug Deliv **7**(10): 1133-1144.

Rizwan, S. B., T. Hanley, B. J. Boyd, T. Rades and S. Hook (2009). "Liquid crystalline systems of phytantriol and glyceryl monooleate containing a hydrophilic protein: Characterisation, swelling and release kinetics." J Pharm Sci **98**(11): 4191-4204.

Rodrigues, L., K. Kyriakos, F. Schneider, H. Dietz, G. Winter, C. M. Papadakis and M. Hubert (2016). "Characterization of Lipid-Based Hexosomes as Versatile Vaccine Carriers." Mol Pharm **13**(11): 3945-3954.

Ruponen, M. and A. Urtti (2015). "Undefined role of mucus as a barrier in ocular drug delivery." Eur J Pharm Biopharm **96**: 442-446.

Saghizadeh, M., S. Soleymani, A. Harounian, B. Bhakta, S. M. Troyanovsky, W. J. Brunken, G. Pellegrini and A. V. Ljubimov (2011). "Alterations of epithelial stem cell marker patterns in human diabetic corneas and effects of c-met gene therapy." Mol Vis **17**: 2177-2190.

Schrage, N. F., S. Langefeld, J. Zschocke, R. Kuckelkorn, C. Redbrake and M. Reim (2000). "Eye burns: an emergency and continuing problem." Burns **26**(8): 689-699.

Semeraro, F., E. Forbice, O. Braga, A. Bova, A. Di Salvatore and C. Azzolini (2014). "Evaluation of the efficacy of 50% autologous serum eye drops in different ocular surface pathologies." Biomed Res Int **2014**: 826970.

Seniutkin, O., S. Furuya, Y. S. Luo, J. A. Cichocki, H. Fukushima, Y. Kato, H. Sugimoto, T. Matsumoto, T. Uehara and I. Rusyn (2018). "Effects of pirfenidone in acute and sub-chronic liver fibrosis, and an initiation-promotion cancer model in the mouse." Toxicol Appl Pharmacol **339**: 1-9.

Shah, J. C., Y. Sadhale and D. M. Chilukuri (2001). "Cubic phase gels as drug delivery systems." Adv Drug Deliv Rev **47**(2-3): 229-250.

Shanbhag, S. S., H. N. Saeed, E. I. Paschalis and J. Chodosh (2018). "Boston keratoprosthesis type 1 for limbal stem cell deficiency after severe chemical corneal injury: A systematic review." Ocul Surf **16**(3): 272-281.

Sharma, N., D. Singh, P. K. Maharana, A. Kriplani, T. Velpandian, R. M. Pandey and R. B. Vajpayee (2016). "Comparison of Amniotic Membrane Transplantation and Umbilical Cord Serum in Acute Ocular Chemical Burns: A Randomized Controlled Trial." Am J Ophthalmol **168**: 157-163.

Shi, S., J. Wu, H. Chen, H. Chen, J. Wu and F. Zeng (2007). "Single- and multiple-dose pharmacokinetics of pirfenidone, an antifibrotic agent, in healthy Chinese volunteers." J Clin Pharmacol **47**(10): 1268-1276.

Shilpi, S., A. Jain, Y. Gupta and S. K. Jain (2007). "Colloidosomes: an emerging vesicular system in drug delivery." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst **24**(4): 361-391.

Singh, P., M. Tyagi, Y. Kumar, K. K. Gupta and P. D. Sharma (2013). "Ocular chemical injuries and their management." Oman J Ophthalmol **6**(2): 83-86.

Singh, V., V. Agrawal, M. R. Santhiago and S. E. Wilson (2012). "Stromal fibroblast-bone marrow-derived cell interactions: implications for myofibroblast development in the cornea." Exp Eye Res **98**: 1-8.

Sosne, G., A. Siddiqi and M. Kurpakus-Wheater (2004). "Thymosin-beta4 inhibits corneal epithelial cell apoptosis after ethanol exposure in vitro." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(4): 1095-1100.

Sosne, G., E. A. Szliter, R. Barrett, K. A. Kernacki, H. Kleinman and L. D. Hazlett (2002). "Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and decreases inflammation in vivo following alkali injury." Exp Eye Res **74**(2): 293-299.

Souza, J. G., K. Dias, T. A. Pereira, D. S. Bernardi and R. F. Lopez (2014). "Topical delivery of ocular therapeutics: carrier systems and physical methods." J Pharm Pharmacol **66**(4): 507-530.

Spector, J. and W. G. Fernandez (2008). "Chemical, thermal, and biological ocular exposures." Emerg Med Clin North Am **26**(1): 125-136, vii.

Stepp, M. A., J. D. Zieske, V. Trinkaus-Randall, B. M. Kyne, S. Pal-Ghosh, G. Tadvalkar and A. Pajooohesh-Ganji (2014). "Wounding the cornea to learn how it heals." Exp Eye Res **121**: 178-193.

Sun, G., X. Lin, H. Zhong, Y. Yang, X. Qiu, C. Ye, K. Wu and M. Yu (2011). "Pharmacokinetics of pirfenidone after topical administration in rabbit eye." Mol Vis **17**: 2191-2196.

Suzuki, K., J. Saito, R. Yanai, N. Yamada, T. Chikama, K. Seki and T. Nishida (2003). "Cell-matrix and cell-cell interactions during corneal epithelial wound healing." Prog Retin Eye Res **22**(2): 113-133.

Swigris, J. and D. Fairclough (2010). "Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis." Eur Respir J **36**(3): 695-696; author reply 696-698.

Teller, P. and T. K. White (2009). "The physiology of wound healing: injury through maturation." Surg Clin North Am **89**(3): 599-610.

Toricelli, A. A., V. Singh, M. R. Santhiago and S. E. Wilson (2013). "The corneal epithelial basement membrane: structure, function, and disease." Invest Ophthalmol Vis Sci **54**(9): 6390-6400.

Trivedi, R., E. F. Redente, A. Thakur, D. W. Riches and U. B. Kompella (2012). "Local delivery of biodegradable pirfenidone nanoparticles ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice." Nanotechnology **23**(50): 505101.

- Trujillo-Cayado, L. A., P. Ramirez, M. C. Alfaro, M. Ruiz and J. Munoz (2014). "Adsorption at the biocompatible alpha-pinene-water interface and emulsifying properties of two eco-friendly surfactants." Colloids Surf B Biointerfaces **122**: 623-629.
- Urtti, A. (2006). "Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery." Adv Drug Deliv Rev **58**(11): 1131-1135.
- Vandoolaeghe, P., J. Barauskas, M. Johnsson, F. Tiberg and T. Nylander (2009). "Interaction between lamellar (vesicles) and nonlamellar lipid liquid-crystalline nanoparticles as studied by time-resolved small-angle X-ray diffraction." Langmuir **25**(7): 3999-4008.
- Wagoner, M. D. (1997). "Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy." Surv Ophthalmol **41**(4): 275-313.
- Warren, M., K. Atkinson and S. Steer (1990). "INVITTOX: The ERGATT/FRAME data bank of in vitro techniques in toxicology." Toxicol In Vitro **4**(4-5): 707-710.
- Watsky, M. A., M. L. McDermott and H. F. Edelhauser (1989). "In vitro corneal endothelial permeability in rabbit and human: the effects of age, cataract surgery and diabetes." Exp Eye Res **49**(5): 751-767.
- Wiley, L., N. SundarRaj, T. T. Sun and R. A. Thoft (1991). "Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an immunohistochemical evaluation." Invest Ophthalmol Vis Sci **32**(3): 594-602.
- Willmann, D. and S. W. Melanson (2019). Corneal Injury. StatPearls. Treasure Island (FL).
- Wisniewska, M., S. Chibowski, T. Urban, D. Sternik and K. Terpilowski (2016). "Impact of anionic polyacrylamide on stability and surface properties of the Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-polymer solution system at different temperatures." Colloid Polym Sci **294**: 1511-1517.
- Wu, L., J. Zhang and W. Watanabe (2011). "Physical and chemical stability of drug nanoparticles." Adv Drug Deliv Rev **63**(6): 456-469.
- Yaghmur, A. and O. Glatter (2009). "Characterization and potential applications of nanostructured aqueous dispersions." Adv Colloid Interface Sci **147-148**: 333-342.
- Yamaguchi, M., S. Yasueda, A. Isowaki, M. Yamamoto, M. Kimura, K. Inada and A. Ohtori (2005). "Formulation of an ophthalmic lipid emulsion containing an anti-inflammatory steroidal drug, difluprednate." Int J Pharm **301**(1-2): 121-128.
- Yang, B. B., X. Y. Man and M. Zheng (2017). "Pirfenidone combined with corticosteroids in a patient with systemic lupus erythematosus-associated interstitial lung disease." J Eur Acad Dermatol Venereol **31**(9): e388-e389.

Yang, D., B. Armitage and S. R. Marder (2004). "Cubic liquid-crystalline nanoparticles." Angew Chem Int Ed Engl **43**(34): 4402-4409.

Yee, R. W., D. H. Geroski, M. Matsuda, E. J. Champeau, L. A. Meyer and H. F. Edelhauser (1985). "Correlation of corneal endothelial pump site density, barrier function, and morphology in wound repair." Invest Ophthalmol Vis Sci **26**(9): 1191-1201.

Yu, F. S., J. Yin, K. Xu and J. Huang (2010). "Growth factors and corneal epithelial wound healing." Brain Res Bull **81**(2-3): 229-235.

Zhong, H., G. Sun, X. Lin, K. Wu and M. Yu (2011). "Evaluation of pirfenidone as a new postoperative antiscarring agent in experimental glaucoma surgery." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(6): 3136-3142.

Zieske, J. D., S. R. Guimaraes and A. E. Hutcheon (2001). "Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement." Exp Eye Res **72**(1): 33-39.