

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

MATHEUS AUGUSTO DE CASTRO

**SISTEMA GELIFICANTE *IN-SITU* CONTENDO ÁCIDO HIALURÔNICO E
INDOMETACINA PARA O TRATAMENTO DE LESÃO QUÍMICA NA CÓRNEA:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA**

BELO HORIZONTE – MG

2022

MATHEUS AUGUSTO DE CASTRO

**SISTEMA GELIFICANTE *IN-SITU* CONTENDO ÁCIDO HIALURÔNICO E
INDOMETACINA PARA O TRATAMENTO DE LESÃO QUÍMICA NA CÓRNEA:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA**

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

Coorientadora: Dra. Silvia Ligório Fialho, Fundação Ezequiel Dias

BELO HORIZONTE – MG

2022

C355s Castro, Matheus Augusto de.
Sistema gelificante *in-situ* contendo ácido hialurônico e indometacina para o tratamento de lesão química na córnea: desenvolvimento, caracterização e avaliação de eficácia [recurso eletrônico] / Matheus Augusto de Castro. – 2022.
1 recurso eletrônico (107 f. : il.) : pdf

Orientador: Armando da Silva Cunha Júnior.
Coorientadora: Silvia Ligório Fialho.

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

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Lesões da córnea – Teses. 2. Doenças da córnea – Teses. 3. Olhos – Doenças – Tratamento – Teses. 4. Fármacos – Teses. 5. Poloxâmero – Teses. 6. Ácido hialurônico – Teses. I. Cunha Júnior, Armando da Silva. II. Fialho, Silvia Ligório. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 617.7



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

SISTEMA GELIFICANTE IN-SITU CONTENDO ÁCIDO HIALURÔNICO E INDOMETACINA PARA O TRATAMENTO DE LESÃO QUÍMICA NA CÓRNEA: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA

MATHEUS AUGUSTO DE CASTRO

Dissertação defendida e aprovada, no dia 30/06/22, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes membros:

Dra. Gabriella Maria Fernandes Cunha
Stanford University

Dra. Mariana Silva Oliveira
Brainfarma

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior- Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Dra. Sílvia Ligório Fialho - Coorientadora
Fundação Ezequiel Dias - FUNED

Belo Horizonte, 30 de junho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Sílvia Ligório Fialho, Usuário Externo**, em 01/07/2022, às 09:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Armando da Silva Cunha Junior, Membro**, em 01/07/2022, às 09:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Silva Oliveira, Usuária Externa**, em 14/07/2022, às 10:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriella Maria Fernandes Cunha, Usuária Externa**, em 15/07/2022, às 16:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1563623** e o código CRC **CEB344AD**.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por prover motivo e motivação em cada momento.

Agradeço a minha mãe Tânia por ser meu exemplo maior de bondade e resiliência durante toda minha vida. Ao Faissal por sempre se fazer presente nos momentos mais difíceis e ser um companheiro exemplar.

A minha esposa Camila por acreditar e me apoiar de forma amorosa e incondicional durante toda trajetória, muitas vezes incerta e complexa.

A Renato, meu irmão, e a Bárbara por se fazerem presentes e pelo auxílio na caminhada.

Ao Professor Armando por acreditar mais uma vez em meu potencial, pelos ensinamentos e por ser um exímio profissional que não desiste.

A Silvia por ser figura muito importante na execução do trabalho, me direcionando, e por ser um exemplo acadêmico.

Ao Professor Ricardo por acreditar no trabalho realizado e auxiliar nas análises de reologia.

Ao Professor Christian pelo trabalho em conjunto, e em especial ao Pedro Reis por todo o trabalho em conjunto que realizamos.

A todos os integrantes do SDTF, SCBio da FUNED e do LTF pela ajuda no desenvolvimento do trabalho, um período bastante complexo na retomada pós-pandemia.

A CAPES e ao PPGCF pela oportunidade de realizar esse trabalho.

A todos que contribuíram em algum momento no planejamento e execução do presente trabalho.

RESUMO

Lesões químicas na córnea se não manejadas adequadamente podem causar consequências severas, inclusive perda da visão. Essencialmente, o tratamento se baseia no adequado controle da inflamação local assim como no estímulo de reepitelização da córnea. Contudo, comumente há baixa biodisponibilidade de fármacos no olho humano por sua estrutura e função. Os sistemas gelificantes *in-situ* são formulações baseadas em polímeros que mediante algum estímulo externo gelificam-se, aumentando o tempo de retenção e a concentração de fármacos local desejado. Neste projeto, objetivou-se desenvolver um sistema gelificante *in-situ* composto por um poloxâmero (K407), que se gelifica por aquecimento, contendo ácido hialurônico (HA), e indometacina (IND). Inicialmente foi identificada a concentração máxima de IND no sistema por meio de design fatorial fracionado. Foram realizados ensaios preliminares de espalhamento dinâmico da luz (DLS) e teste de inversão de tubo para 12 formulações propostas que resultaram em valores adequados para administração ocular ($t_{sol-gel} \sim 34^{\circ}C$ e tamanho de partículas $< 10 \mu m$). Através da realização de análises reológicas foi identificado que a formulação F6 se gelificou na temperatura de $34,2^{\circ}C$ e apresentou viscosidade máxima adequada e superior a um colírio comercial, além de comportamento reológico não-newtoniano. Análises de microscopia e criomicroscopia eletrônica de transmissão (Crio-MET) identificaram a formação de micelas arredondadas e a formação de trama polimérica quando a formulação é aquecida. Não foi identificada qualquer incompatibilidade através da análise do espectro de infravermelho (FTIR). A formulação foi capaz de liberar 52% do conteúdo de IND no período de 24 horas em avaliação *in-vitro*, ademais, em teste de penetração ocular houve satisfatória retenção do fármaco nas córneas testadas. No teste preliminar de biocompatibilidade (HET-CAM), F6 foi considerado não irritante. Houve redução significativa no *score* de opacidade da córnea nos animais a partir do 3º dia da lesão, enquanto que em análises de tomografia de coerência ocular (OCT) diferença relevante na espessura da córnea foi identificado no 5º dia. Análises histológicas confirmaram que os animais tratados com F6 apresentavam estrutura da córnea mais conservada. Portanto, o sistema desenvolvido pode representar uma alternativa promissora para o tratamento de lesão química alcalina.

Palavras-chave: lesão alcalina; sistema gelificante *in-situ*; poloxâmeros; ácido hialurônico.

ABSTRACT

Corneal chemical injuries, if not treated appropriately, can result in visual impairment. The therapy consists in reducing local inflammation and promoting corneal re-epithelialization. However, due to the structure and function of the human eye, it has a poor bioavailability. *In-situ* gelling systems are polymer-based formulations which undergo gelation through external stimulus, increasing retention and local concentration. This work's aim was to create an *in-situ* gelling system made up of a poloxamer (K407), a thermosensitive polymer, containing hyaluronic acid (HA) and indomethacin (IND). The maximum concentration of IND in the system was initially determined using a fractional factorial design. For 12 suggested formulations, preliminary dynamic light scattering (DLS) and tube inversion tests were performed, showing values appropriate for ocular administration. Through rheological analysis the ideal formulation (F6) was identified, gelling at 34,2 °C. The developed formulation had compatible maximum viscosity, superior to a commercial eye-drops, and a non-Newtonian rheological behavior. Polarized-light microscopy and cryogenic electron microscopy (Cryo-TEM) identified rounded micelles and a complex polymer network once heated. None incompatibilities were found among formulation's components using infrared spectrum (FTIR). The developed formulation had released 52% of its content during 24 hours, moreover, eye penetration test revealed a satisfactory retention in tested corneas. In the biocompatibility test (HET-CAM) no irritancy was found. Significant reduction was identified in eye's opacity scores in the 3^o day, furthermore, relevant corneal thickness reduction was found in the 5^o day through ocular coherence tomography (OCT). Histological examinations show that the animals given F6 had a more preserved corneal structure. As a result, the developed formulation might be a potential therapy alternative for alkaline chemical injury.

Keywords: alkaline chemical burn; *in-situ* gelling system; poloxamer; hyaluronic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático do olho humano.	18
Figura 2 – Desenho esquemático das camadas da córnea.....	19
Figura 3 - Desenho ilustrativo da aparência macroscópica do limbo ocular e camada conjuntiva.	22
Figura 4 - Dinâmica XYZ de regeneração da córnea	25
Figura 5 - Estrutura molecular da Indometacina.....	29
Figura 6 - Estrutura molecular do Hialuronato de Sódio.....	31
Figura 7 – Estímulos de gelificação <i>in-situ</i> para polímeros.	38
Figura 8 - Estrutura geral dos poloxâmeros.	39
Figura 9 - Processo de preparação do sistema gelificante in-situ via solubilização a frio.	46
Figura 10 - Esquema experimental de design fatorial fracionado.....	51
Figura 11 - Gráficos de superfície para a resposta de aspecto da formulação.	52
Figura 12 - Temperatura de gelificação média para as formulações F1-F12. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão (n=3). Houve diferença relevante (** $p < 0,01$) nas comparações entre formulações sem e com 0,5% de HA. (F1 vs F3; F4 vs F6; F7 vs F9 e F10 vs F12). A avaliação estatística entre grupos foi realizada por ANOVA <i>one way</i> , seguida do teste de Bonferroni (<i>pós-hoc</i>). O nível de significância foi de $p < 0,05$	54
Figura 13 – Diâmetro hidrodinâmico médio e PDI das formulações F1- F12 (n = 3) nas temperaturas de 25°C (A) e 34 °C (B).	56
Figura 14 - Gráficos de reologia demonstrando o comportamento dos módulos G' e G'' com aumento de temperatura para as formulações F3, F6, F9 e F12 (n = 3). A temperatura apontada representa a intersecção entre os módulos e gelificação.	59
Figura 15 - Gráficos de reologia demonstrando o comportamento dos módulos G' e G'' com aumento de temperatura para as formulações F3 e F6. A temperatura apontada representa a intersecção entre os módulos e gelificação.....	61
Figura 16 - Gráficos de viscosidade de FC e F6, com e sem diluição, nas temperaturas de 25 e 34°C.....	62
Figura 17 - Fotografias obtidas por microscopia de luz polarizada no aumento de 10x. As imagens (A) e (B) representam F6 nos campos claro e escuro. Da mesma forma, (C) e (D) para FC.....	64
Figura 18 - Fotografia obtida por microscopia de luz polarizada de F6 no aumento de 20x. 65	
Figura 19 - Fotografias obtidas por microscopia de luz polarizada no aumento de 10x de F6 (A) e FC (B) após aquecimento de 34 °C.....	66
Figura 20 - Micrografias obtidas na técnica de Crio-MET dos componentes e de F6.	67

Figura 21 - Tamanho de partículas (nm) do poloxâmero K407 em solução e formulação F6.	68
Figura 22 - Fotomicrografia de F6 liofilizada, obtida por Crio-TEM.....	69
Figura 23 - Espectros de transmitância no infravermelho dos componentes K407 (linha preta), IND (linha vermelha), HA (linha azul) e F6 (linha verde) nos comprimentos de onda de 0 a 4000 (cm ⁻¹).....	70
Figura 24 - Porcentagem de liberação acumulada e liberação (%) /min de F6, no teste de liberação in-vitro (n=2).	72
Figura 25 - Porcentagem de penetração de IND no teste de penetração ocular realizado em célula de Franz (n =2).....	74
Figura 26 - Imagens representativas do teste de HET-CAM durante 5 minutos, entre os grupos testados (n = 10).....	82
Figura 27 - Acompanhamento de opacidade da córnea entre os grupos, após indução de lesão alcalina (n = 5).....	84
Figura 28 - Comparação do score de opacidade entre os grupos. Os resultados são expressos em média ± desvio padrão (n = 5). As comparações entre as médias foram feitas por ANOVA <i>two way</i> , e posterior teste de Bonferroni (<i>post-hoc</i>). Houve diferença significativa entre F6 e os demais grupos tratados no terceiro (*p < 0,05), quinto (**p < 0,01 e *p < 0,05) e sétimo (**p < 0,01) dias. O nível de significância considerado de *p < 0,05.....	85
Figura 29 – Fotos do acompanhamento de reepitelização por meio da instilação de fluoresceína sódica em luz cobalto (n = 5).....	86
Figura 30 - Imagens de tomografia ocular referentes aos grupos ao longo do período estudado.....	88
Figura 31 - Diferenças na espessura da córnea entre os grupos estudados durante a primeira semana após a lesão. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=5). A comparação foi feita por ANOVA <i>two way</i> com teste de Bonferroni (<i>post-hoc</i>). Foram identificadas diferenças com níveis de significância * p< 0,05 entre F6 e NT no quinto dia e ** p< 0,01 entre F6 e os demais grupos no sétimo dia. O nível de significância utilizado foi de p < 0,05.....	89
Figura 32. Fotografias de lâminas da lesão alcalina coradas com hematoxilina/eosina obtidas no microscópio dos grupos controle (A), F6 (B), FC (C) e NT (D), no aumento de 10x.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escala Roper-Hall de lesão química na córnea.....	24
Tabela 2 - Escala Dua de lesão química na córnea	24
Tabela 3 – Respostas de aspecto para o design experimental fatorial fracionado.	52
Tabela 4 - Respostas de gelificação e pH para as formulações preliminares (F1 - F12).	53
Tabela 5 - Diferença entre os valores de temperatura de gelificação do Teste de inversão de tubo e Reologia oscilatória das formulações F3, F6, F9 e F12 (n=3). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. As comparações entre as médias foram feitas por meio de Teste de T, com nível de significância $p < 0,05$	60
Tabela 6 - Score de opacidade da córnea.	80
Tabela 7 - Resultados do teste HET-CAM. Os resultados são mostrados como média \pm desvio padrão (n = 10).	83
Tabela 8 - Comparação entre as porcentagens de redução da área lesada nos diferentes grupos (n = 5). Os resultados são expressos como média e desvio padrão. A comparação entre as médias foi feita por ANOVA <i>two way</i> seguido de Bonferroni (post-hoc). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos, com nível de significância de $p < 0,05$	87

LISTA DE SIGLAS

AINES	Antinflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
BCS	Sistema de classificação biofarmacêutica (do inglês – Biopharmaceutical classification system)
CAM	Membrana corioalantóica
COX	Cicloxygenases
COX-2	Cicloxygenases – 2
Crio-MET	Criomicroscopia eletrônica de transmissão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês Ethylenediaminetetraacetic acid)
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês - <i>Epidermal growth factor</i>)
F6	Formulação otimizada
FC	Formulação comercial
FDA	Administração de Comida e Medicamentos (do inglês – <i>Food and Drug Administration</i>)
FGF	Fator de crescimento fiblobástico (do inglês – <i>Fibroblast growth factor</i>)
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (do inglês - <i>Fourier transform infrared spectrometer</i>)
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
HA	Ácido Hialurônico
HAS	Sintetases de ácido hialurônico (do inglês - <i>Hyaluronic acid synthase</i>)
HET-CAM	Teste de ovo de galinha-teste da membrana corioalantóica (do inglês - <i>Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane</i>)
HPC	Hidroxietilcelulose
HPMC	Hidroximetilpropilcelulose
IIO	Índice de irritação ocular
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IND	Indometacina
K407	Kolliphor 407®

KDa	Kilodalton
Log P	Coeficiente de partição
MMP	Metaloproteínas (do inglês - <i>Matrix metalloproteinases</i>)
NT	Não tratado
OCT	Tomografia de coerência óptica (do inglês – <i>Optical coherence tomography</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês – <i>Phosphate buffered saline</i>)
PDI	Índice de polidispersão (do inglês – <i>Polidispersity index</i>)
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação
PMN	Polimorfonucleares
POE	Poli óxido de etileno
POP	Poli óxido de propileno
PRP	Plasma rico em plaquetas
RHAMM	Receptor para movimentação mediada pelo Ácido Hialurônico (do inglês – <i>receptor for hyaluroan-mediated motility</i>)
RP-CLAE	Cromatografia líquida de fase reversa
TLR	Receptores do tipo <i>Toll</i> (do inglês – <i>Toll-like receptors</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral Alfa (do inglês - <i>Tumoral growth factor alpha</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 A córnea do olho humano	18
2.1.1 Camada Epitelial e camada de Bowman	19
2.1.2 Estroma, camada de Descemet e endotélio	20
2.1.3 Limbo e Conjuntiva	21
2.2 Lesões químicas oculares	22
2.3 Mecanismo de regeneração da córnea	25
2.4 Terapias para lesão química da córnea	27
2.4.1 Anti-inflamatórios	28
2.4.2 Ácido Hialurônico e reepitelização	30
2.4.3 Estratégias complementares	33
2.5 Formas farmacêuticas de administração ocular tópica com perfil de liberação prolongada	34
2.5.1 Hidrogéis	36
2.5.1.1 Poloxâmicos	38
3. JUSTIFICATIVA	41
4. OBJETIVOS	43
4.1 Objetivo Geral	43
4.2 Objetivos Específicos	43
CAPÍTULO I	44
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA GELIFICANTE <i>IN-SITU</i> CONTENDO ÁCIDO HIALURÔNICO E INDOMETACINA	44
5. MATERIAIS E MÉTODOS	45
5.1 Materiais	45
5.2 Métodos	45
5.2.1 Preparação do sistema gelificante in-situ	45
5.2.2 Medida de pH	46
5.2.3 Teste de Inversão de Tubo	46
5.2.4 Distribuição de tamanho de partícula e índice de polidispersão	47
5.2.5 Reologia oscilatória	47
5.2.6 Viscosidade	47
5.2.7 Microscopia de Luz Polarizada	47

5.2.8 Criomicroscopia eletrônica de Transmissão (Crio-MET)	48
5.2.9 Liofilização.....	48
5.2.10 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	48
5.2.11 Cromatografia Líquida de fase reversa (RP-CLAE).....	49
5.2.12 Teste de liberação – Método sem membrana	49
5.2.13 Teste de penetração ocular.....	50
5.2.14 Análise estatística	50
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6.1 Definição das concentrações dos componentes do sistema gelificante	51
6.2 Preparação do sistema gelificante	53
6.3 Distribuição de tamanho de partícula e índice de polidispersão	55
6.4 Comportamento reológico.....	57
6.5 Viscosidade das formulações	61
6.6 Microscopia de Luz Polarizada	63
6.7 Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Crio-MET)	66
6.8 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	69
6.9 Liberação <i>in-vitro</i>	71
6.10 Teste de Penetração Ocular	73
7. CONCLUSÃO	75
CAPÍTULO II.....	76
AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE E EFICÁCIA DO SISTEMA GELIFICANTE <i>IN-SITU</i> CONTENDO ÁCIDO HIALURÔNICO E INDOMETACINA	76
1 MATERIAIS E MÉTODOS	77
1.1 Materiais.....	77
1.2 Animais	77
1.3 Teste de biocompatibilidade ocular (HET-CAM).....	77
1.4 Indução de lesão química alcalina na córnea.....	78
1.5 Acompanhamento da regeneração da córnea.....	79
1.6 Tomografia de coerência óptica (OCT).....	80
1.7 Histologia	80
1.8 Análise estatística	81
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
2.1 Teste de biocompatibilidade ocular (HET-CAM).....	82
2.2 Indução de lesão alcalina e recuperação da lesão.....	83

2.3 Tomografia de coerência óptica (OCT).....	87
2.4 Histologia	91
3. CONCLUSÃO	94
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
ANEXOS	107

1 INTRODUÇÃO

Lesões químicas da córnea são causa frequente no atendimento hospitalar haja vista que são causadas por produtos de diversas naturezas, tanto no ambiente de trabalho quanto domiciliar. Se manejadas de forma incorreta podem resultar em consequências irreversíveis aos pacientes, como perda da visão (DUA; GOMES; SINGH, 1994; ESLANI et al., 2014).

Via de regra, o tratamento começa com a rápida remoção da substância causadora da lesão seguida da utilização de agentes que promovem a recuperação tecidual, controle da inflamação e estabilização da superfície atingida (BARADARAN-RAFFI et al., 2017). O Ácido Hialurônico (HA) é um polissacarídeo endógeno presente em articulações, músculos, humor vítreo e filme lacrimal. São conhecidas diversas funções desse composto no corpo humano e seu papel tem sido investigado na recuperação da superfície ocular. Relata-se que sua interação com receptores transmembrana (CD₄₄, RHAMM, TLR) das células epiteliais da córnea desencadeiam respostas de migração e multiplicação celulares essenciais para controle de lesões (NAOR, 2016; YANG et al., 2012).

Na prática clínica são utilizados anti-inflamatórios esteroidais ou não-esteroidais (AINES) tópicos para controle da inflamação. A indometacina (IND) é um derivado do ácido-indólico pertencente aos AINES, com elevada potência e perfil de segurança adequado para uso ocular. Seu mecanismo de ação se baseia na inibição da enzima cicloxigenase-2 (COX-2), e consequente interrupção da produção de prostaglandinas inflamatórias. Assim, o acúmulo de células inflamatórias, secreção de enzimas proteolíticas e radicais livres são diminuídos localmente (GAYNES; FISCELLA, 2002; HERSH et al., 1990)

Terapias com formulações convencionais, como colírios em soluções/suspensões, tem limitada utilidade nesse cenário, considerando o quão desafiador é atingir níveis terapêuticos satisfatórios no segmento anterior do olho humano, devido a rápida drenagem naso-lacrimal, absorção sistêmica via conjuntiva e reflexos oculares. Dessa forma, formulações que objetivam melhorar o tempo de residência na superfície ocular emergem cada vez mais lançando mão de diferentes estratégias (CHOLKAR; DASARI, 2013).

Sistemas gelificantes *in-situ* são formulações que quando submetidas a um determinado estímulo criam uma complexa rede polimérica e originam um hidrogel. Esse tipo de formulação pode ser considerada uma valiosa estratégia para administração ocular, considerando que são de fácil utilização, aumentam o tempo de residência dos ativos e são capazes de conter fármacos de distintas polaridades (SHARMA; NEGI; MAHINDROO, 2018). Uma das classes mais frequentemente utilizadas é a dos poloxâmeros, polímeros anfifílicos de variadas massas moleculares, ativados por aquecimento. Existem vários trabalhos na literatura que demonstram a potencialidade desse tipo de formulação para administração ocular, especialmente com Kolliphor 407® (K407) (AMMAR et al., 2010; DUMORTIER et al., 2006; LI; MOONEY, 2016)

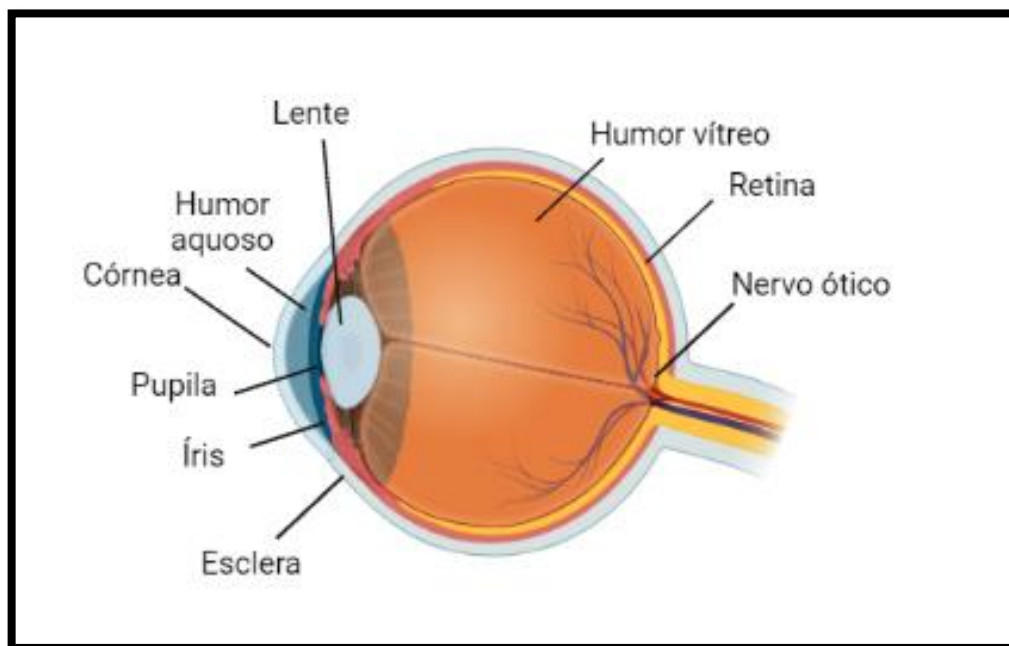
Nesse cenário, o presente projeto objetiva desenvolver um sistema gelificante *in-situ* (K407/HA/IND), caracterizá-lo e avaliar sua eficácia em modelo de lesão química alcalina da córnea.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A córnea do olho humano

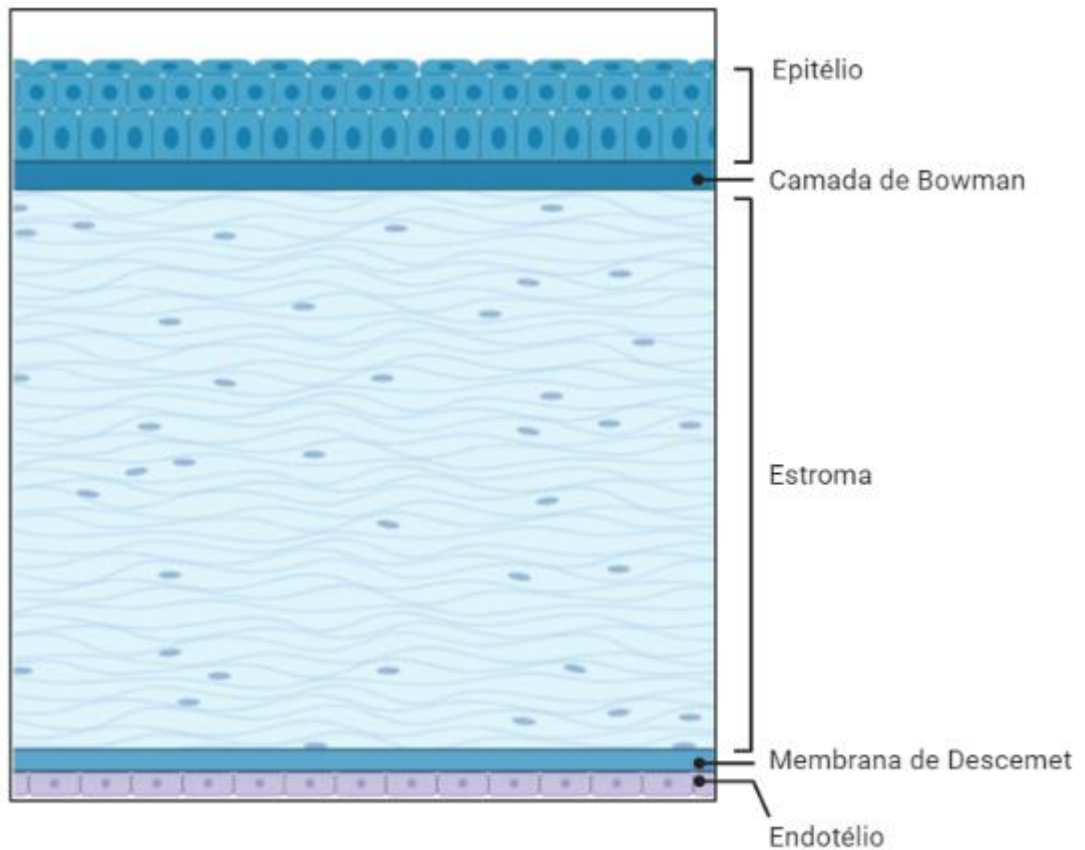
O olho humano possui uma complexa e fascinante estrutura que possibilita que percebamos o mundo que nos rodeia pelo sentido da visão. De maneira geral, sua anatomia é dividida em dois compartimentos. O segmento anterior, composto por córnea, conjuntiva, íris, lente, corpo ciliar, humor aquoso e parte da esclera. Ao passo que a retina, humor vítreo, coróide, nervo óptico e a porção posterior da conjuntiva são classificados como segmento posterior do olho (LEE ANN, 2012) (**Figura 1**).

Figura 1 - Desenho esquemático do olho humano.



A córnea é um tecido transparente e avascularizado que associada a lente e a íris atua na refração da luz para a retina, viabilizando a formação de imagens. Ademais, funciona como barreira para agentes externos, bem como na manutenção estrutural e fisiológica do olho. Essencialmente a córnea é dividida em 5 camadas com distintas funções e composições (**Figura 2**), sendo: (1) epitélio, (2) camada de Bowman, (3) estroma, (4) membrana de Descemet, (5) endotélio (CHOLKAR; DASARI, 2013).

Figura 2 – Desenho esquemático das camadas da córnea



2.1.1 Camada Epitelial e camada de Bowman

A camada epitelial é a mais externa da córnea composta por camadas de epitélio não-queratinizado com aproximadamente 50 μm de espessura total e dividida entre três tipos celulares majoritários. Sua camada mais superficial é composta por células escamosas poligonais com núcleos achatados. Outra característica marcante é a secreção de glicocálice - glicoproteínas que interagem de forma benéfica e simbiótica com a camada de mucina do filme lacrimal - de modo a manter uma superfície lisa e regular do tecido e estabilidade do filme. Imediatamente abaixo da camada superficial está presente uma camada intermediária de epitélio composta por células poliédricas e superfícies convexas, chamadas células alares. Existem junções celulares nas paredes laterais celulares, próximas à superfície apical, que são responsáveis pela formação de eficiente

barreira epitelial, que inviabiliza a passagem de excesso de líquido do filme lacrimal ou outros agentes externos entre as células (LEE ANN, 2012)

A camada mais interna do epitélio é formada por uma camada única de células cuboides com núcleo oval e direcionado para a porção apical celular, bem como organelas intracelulares abundantes. Tais características estão relacionadas de forma íntima ao papel da camada basal, haja vista que nela que ocorre mitose para formação das células de camadas mais superficiais do epitélio, junto a células tronco e células amplificadoras transitórias do limbo. Há nessa camada função determinante de ancoragem junto à membrana basal por meio de fibrilas formadas por colágeno (tipo I e IV) que podem se estender até o estroma córneo. O estado da ancoragem é de suma importância para a recuperação celular, especialmente em lesões químicas (CHOLKAR; DASARI, 2013). Posterior ao tecido epitelial está a camada de Bowman constituída por espessas camadas de colágeno (tipo I e V) e proteoglicanos, de tamanho aproximado de 12 μm . Sua principal função é a manutenção da forma e estrutura de córnea. Por ser um tecido acelular não é capaz de se regenerar caso haja lesão (LEE ANN, 2012).

2.1.2 Estroma, camada de Descemet e endotélio

O estroma é responsável por aproximadamente 90% da espessura da córnea, com estrutura altamente organizada e composta por múltiplos componentes, que permitem a transparência do tecido, bem como rigidez adequada para a córnea. Camadas de colágeno organizadas em lamelas paralelas compõe a maioria do tecido com diferentes níveis de complexidade da trama e em variadas direções. Além disso, o estroma contém queratócitos, células achatadas que permeiam as lamelas, responsáveis pela síntese de colágeno e componentes extracelulares. O espaço entre as células e fibrilas é preenchido por proteoglicanos, constituídos de um centro proteico e moléculas de carboidratos carregados negativamente, como sulfato de queratano, sulfato de heparina e sulfato de condroitina (SRIDHAR, 2017). Após o estroma é formada a camada de Descemet, formada por colágeno e laminina. Diferentemente da camada de Bowman, esta é elástica e se reconstitui com facilidade, mediante secreção da camada endotelial do epitélio.

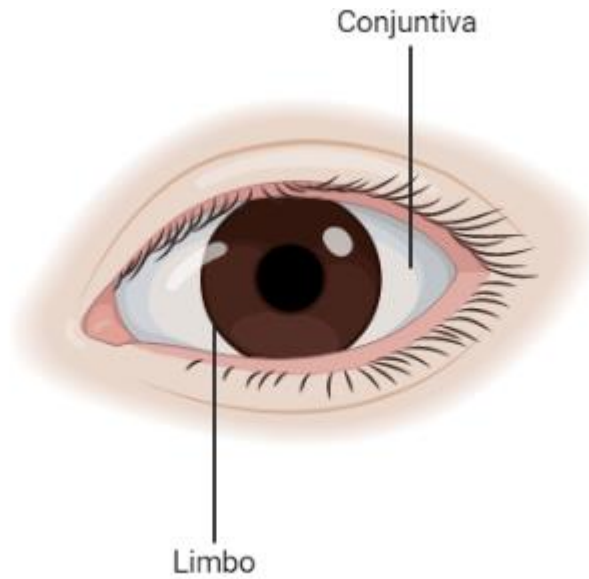
A camada endotelial é a mais interna das estruturas da córnea, formada por células poligonais, em sua maioria hexagonais, que garantem um aspecto característico de mosaico. São células sem capacidade de multiplicação e com extensas comunicações intercelulares por meio de junções intercelulares. Diferente de outras camadas, existem enzimas do tipo bomba de Na^+/K^+ que permitem a troca de íons com o humor aquoso, bem como outras moléculas (glicose, aminoácidos e vitaminas) transferidas sem envolvimento enzimático, essenciais para nutrição e manutenção da córnea (CHOLKAR; DASARI, 2013).

2.1.3 Limbo e Conjuntiva

Ao término dos limites da córnea inicia-se o tecido limbal, de forma circunscrita, com aproximadamente 2 mm em largura no olho humano. Em termos gerais, o limbo é uma zona de transição entre córnea e esclera/conjuntiva. O tecido epitelial altamente organizado da córnea se transforma em camadas sutilmente desordenadas, mais espessas (10 a 12 camadas), assim como o estroma é agora disposto de forma irregular sem organização lamelar. O limbo é crucial para a função da córnea, considerando que forma uma barreira aos vasos sanguíneos da conjuntiva adjacente, preservando a transparência do tecido, e ainda, auxilia na recuperação tecidual em eventuais lesões (ATCHISON; SMITH, 2000).

O epitélio da conjuntiva é composto por seis a nove camadas de células epiteliais colunares que contém células caliciformes, com funções importantes na proteção da córnea e formação da camada de mucina do filme lacrimal. (WAGONER, 1997). Seu estroma contém tecido conectivo, vasos sanguíneos, linfáticos e células variadas (linfócitos, neutrófilos, células sanguíneas). A relação entre a córnea, o limbo e a conjuntiva são de sinergismo em condições fisiológicas com um equilíbrio delicado em situações de lesão (**Figura 3**).

Figura 3 - Desenho ilustrativo da aparência macroscópica do limbo ocular e camada conjuntiva.



2.2 Lesões químicas oculares

Lesões químicas podem ser definidas como lesões de natureza não mecânica que induzem alterações no tecido atingido. Sua ocorrência engloba tanto o âmbito domiciliar quanto o ambiente de trabalho das vítimas, originada por substâncias de natureza básica, ácida e também outros solventes, como álcoois. Estima-se que lesões químicas representem 22% dos atendimentos hospitalares em traumas oculares, além de serem a segunda causa mais frequente em acidentes de trabalho. Além disso, são lesões que podem estar relacionadas a cenários de guerra (gases mostarda) e crimes de ódio (DUA et al., 2020).

Conforme mencionado, o olho humano é uma estrutura complexa que necessita de vários elementos estruturais para que a luz seja devidamente focada na retina para formação da imagem. Desse modo, os diferentes agentes químicos exógenos impactam componentes celulares e teciduais que corrompem a homeostase e resultam em danos imediatos e/ou crônicos (BIZRAH; YUSUF; AHMAD, 2019).

Os agentes comumente associados a lesão química alcalinam são amônia (NH_3), hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de magnésio ($\text{Mg} [\text{OH}]_2$) e hidróxido de cálcio ($\text{Ca} [\text{OH}]_2$). De forma geral, os agentes alcalinos possuem melhor capacidade de penetração nos tecidos oculares, transformando-os em potencialmente mais danosos. No contato com os tecidos, o

íon OH^- interage com os lipídeos da membrana celular resultando em reação de saponificação e conseqüente corrompimento das células. Em paralelo, o cátion do composto alcalino reage com o colágeno e os proteoglicanos presentes na camada estroma. Com isso, há perda de transparência, engrossamento e disjunção das fibrilas de colágeno (WAGONER, 1997).

Para os agentes ácidos, os mais frequentemente associados a lesões químicas são ácidos sulfúricos (H_2SO_4), ácido fluorídrico (HF), ácido acético (CH_3COOH) e ácido clorídrico (HCl). No caso dessas substâncias, há mudança no pH local pelo incremento de íons H^+ nos tecidos, assim como desnaturação e coagulação de proteínas nas camadas epiteliais e estroma superficial (ESLANI et al., 2014; WAGONER, 1997). Os solvente (álcoois) e agentes irritantes causam a remoção do epitélio da superfície ocular, considerada a mais branda das lesões químicas, recuperando-se sem maiores conseqüências (DUA et al., 2020). Ainda, é importante ressaltar que a extensão de dano e as conseqüências na superfície ocular não dependem exclusivamente da natureza do agente químicos, porém da relação de outros fatores como: duração do contato, quantidade e temperatura do agente químico, força de impacto, osmolaridade e capacidade de interação com o tecido ocular (SCHRAGE et al., 2000).

Existem classificações para que as lesões químicas da superfície ocular sejam melhor compreendidas e as práticas clínicas harmonizadas. A escala McCulley categoriza as fases de curso clínico em três: (1) fase imediata (<7 dias da lesão); (2) fase intermediária (1 – 3 semanas) e (3) fase tardia (superior a 3 semanas) (BARADARAN-RAFFI et al., 2017).

A escala Roper-Hall (**Tabela 1**) proposta na década de 60 classifica o grau da lesão química na córnea com base no dano epitelial e isquemia limbal, relacionando tais parâmetros a um determinado prognóstico. Porém, com a expansão do conhecimento de lesões químicas e patofisiologia ocular compreendeu-se que existe importante relação de células-tronco limbais e da camada conjuntiva ocular no curso na recuperação tecidual. Dessa forma, foi proposta a escala Dua (**Tabela 2**), capaz de avaliar o prognóstico de maneira mais abrangente e com classificações intermediárias mais precisas, por meio do teste de fluoresceína e/ou isquemia limbal, utilizando-se de um sistema posicional semelhante a um relógio (DUA et al., 2020).

Tabela 1 - Escala Roper-Hall de lesão química na córnea

Grau	Prognóstico	Isquemia limbal	Envolvimento da córnea
I	Bom	0	Dano epitelial
II	Bom	<1/3	Opaca, com íris visível
III	Incerto	1/3 a 1/2	Perda epitelial total e íris obscurecida
IV	Ruim	>1/2	Córnea, íris e pupila obscurecidas.

Fonte: (DUA et al., 2020)

Tabela 2 - Escala Dua de lesão química na córnea

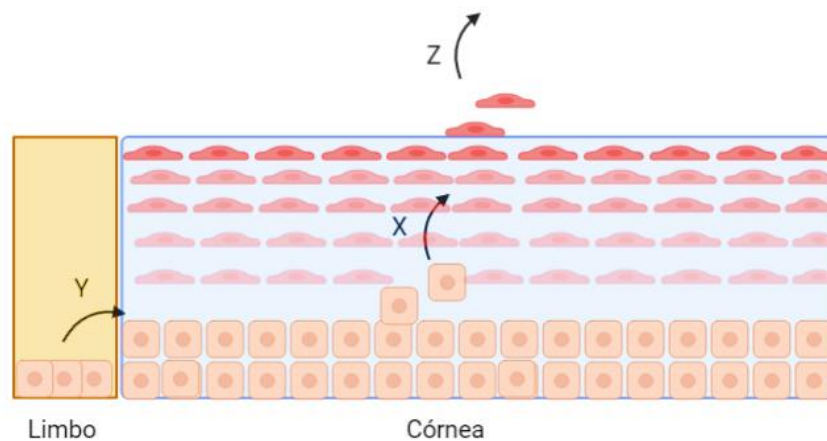
Grau	Prognóstico	Achados clínicos	Envolvimento da conjuntiva	Escala
I	Muito bom	0 envolvimento limbal	0%	0/0%
II	Bom	≤ 3/12 de envolvimento limbal	≤ 30%	0.1-3/ 1-29.9%
III	Bom	3/12 – 6/12 de envolvimento limbal	30 – 50%	3.1 – 6 / 31 – 50%
IV	Bom/Incerto	6/12 – 9/12 de envolvimento limbal	50 – 75%	6.1 – 9/ 51 – 75%
V	Ruim/Incerto	9/12 - <12 de envolvimento limbal	75 - <100%	9.1 – 11.9/ 75.1 – 99.9%
VI	Péssimo	Envolvimento limbal total (12/12)	100%	12/ 100%

Fonte: (DUA et al., 2020)

2.3 Mecanismo de regeneração da córnea

O tecido epitelial da córnea está em constante renovação de forma organizada e com importante participação do limbo. Atualmente a hipótese “XYZ” é o conceito que melhor explica o processo (**Figura 4**). Simplificadamente, cada letra representa um tipo de movimento celular que contribui para a homeostase tecidual: “X” representa o movimento celular ascendente das células epiteliais basais para a superfície do epitélio, “Y” a migração centrípeta de células amplificadoras transitórias originais do limbo a fim de transformar-se em células epiteliais basais e posteriormente superficiais, “Z” a descamação da camada superior epitelial por exfoliação natural ou traumas. Em um quadro de homeostase, a descamação (Z) deve ser igual aos movimentos de migração (X + Y) (YOON et al., 2016).

Figura 4 - Dinâmica XYZ de regeneração da córnea



Lesões na córnea desencadeiam respostas em cascata com migração, proliferação e adesão celular, governados por biomoléculas como os fatores de crescimento epitelial (EGF), fibroblástico (FGF), citocinas (IL-1 e IL-6), TNF- α e glicoproteínas (IMANISHI et al., 2000). Imediatamente após a lesão química os estímulos liberados pelas células adjacentes interrompem a proliferação de células do epitélio basal e paralelamente inicia a mudança no formato das células vicinais à lesão, fazendo-as desenvolverem extensões (filopodia) e tornando-as achatadas, bem como ancoragens celulares e comunicações intercelulares são interrompidas momentaneamente. Todos estes mecanismos compõe a fase de migração celular

focada na cobertura rápida e efetiva da lesão, e tal movimento acontece de forma centrípeta, do limbo em direção ao centro da córnea. Há ainda acúmulo de células polimorfonucleares no epitélio e no estroma próximo a lesão, originários do fluido lacrimal (DUA; GOMES; SINGH, 1994).

A partir do momento que a superfície é completamente coberta por células epiteliais migradas, a multiplicação celular retorna em ritmo acentuado, ocasionando aumento no consumo de glicogênio e na síntese proteica. As células basais do epitélio da córnea multiplicam-se e migram para as camadas mais superficiais, até que a característica estratificada do tecido seja recuperada, além das células amplificadoras transitórias oriundas do limbo. A espessura do epitélio é inicialmente aumentada recuperando-se o perfil original somente meses após a lesão química (WILSON et al., 2001). Em lesões que atingem a camada de Bowman o tecido é substituído por tecido cicatricial ou epitélio, visto que as células originais não são dotadas da capacidade de multiplicação. (LEE ANN, 2012)

Quando a lesão química atinge o estroma da córnea, mudanças substanciais no tecido ocorrem. Os queratócitos, células pluripotentes, porém relativamente inativas metabolicamente, ativam-se, aumentam em número e se transformam em miofibroblastos. Estimuladas por citocinas, células inflamatórias e outros componentes metabólicos, essas células adquirem funções de secreção de colágeno e glicosaminoglicanos, assim como colagenases. Mediante tais alterações, o tecido perde sua característica original de colágeno altamente organizado e lamelas extensas, mas passa a ter direções difusas e fibras mais encurtadas. Ainda, a precipitação de componentes fisiológicos causa a opacidade característica de lesões químicas na córnea (WAGONER, 1997).

Eventualmente, o agente causador da lesão pode atingir a camada de Descemet, que é considerada resistente a estímulos exógenos, e caso danificada, reestruturada via queratócitos e células endoteliais. Se o endotélio é afetado, as células vicinais à lesão se remodelam e cobrem a superfície lesionada. Posteriormente, se ajustam ao formato hexagonal e a síntese de enzimas superficiais é estimulada (LEE ANN, 2012).

Ressalta-se que a extensão da lesão química impacta diretamente no mecanismo de recuperação tecidual e conseqüentemente nos desdobramentos

enfrentados pelo paciente. Por exemplo, se a lesão é grave e excede os limites da córnea, com isso também é danificado o limbo. Portanto, equilíbrio do mecanismo “XYZ” é fundamentalmente afetado, assim como o papel de barreira física do limbo para com a córnea. Dessa forma, a dinâmica de recuperação da córnea dependerá da migração da conjuntiva, cuja estrutura possui diferenças estruturais importantes como a presença de células caliciformes e vasos sanguíneos. Como consequência, o tecido epitelial da córnea pode apresentar células capazes de interferir na característica primordial da córnea que é a sua transparência (DUA, 1998).

Finalmente, é relevante o papel das células inflamatórias polimorfonucleares e linfócitos T nas lesões químicas, pois dentro das horas iniciais do estímulo há uma migração massiva destas secretando enzimas importantes (metaloproteínases) assim como na remoção de corpos apoptóticos gerados em outros processos no estroma, especialmente em ulcerações estéreis. Um controle adequado dos níveis inflamatórios locais é crucial para a recuperação tecidual, levando em consideração que um excesso de liberação enzimática ou de componentes granulares pode prolongar a recuperação do estroma (WAGONER, 1997; WILSON et al., 2001).

2.4 Terapias para lesão química da córnea

A maior prioridade momentos após o contato do agente químico na superfície ocular é a sua remoção, uma vez que quanto maior o tempo de permanência, também é maior a capacidade de penetração e conseqüentemente danos celulares. Para isso, idealmente devem ser utilizadas soluções isotônicas como salina ou solução de Ringer com Lactato (cloreto de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de potássio e lactato de sódio em água ultrapura). O tempo da irrigação é variável, a depender do nível da lesão, da natureza química do agente, porém idealmente deve acontecer até que o pH da superfície ocular retorne a condições fisiológicas. Ademais, há benefício na utilização de anestésicos locais, visto que aumenta o conforto na irrigação por parte do paciente e o êxito na prática (BIZRAH; YUSUF; AHMAD, 2019; KUCKELKORN; KOTTEK, 1995).

Após a remoção inicial do agente químico, a farmacoterapia se baseia nos pilares de controle da inflamação, interrupção da degradação adicional do epitélio/estroma da córnea, e promoção de reepitelização.

2.4.1 Anti-inflamatórios

Decorrente das lesões químicas são liberados mediadores químicos indutores do acúmulo de células inflamatórias. Tais células liberam conteúdo de enzimas dos lisossomas resultando em danos nas células locais e como resultado tem-se dificuldade no reestabelecimento do tecido integro. Os corticosteroides são os principais representantes de anti-inflamatórios utilizados nesta fase, e sua ação estabiliza as membranas citoplasmáticas e lisossomais, coibindo a liberação de conteúdo enzimático, assim como na redução do infiltrado inflamatório. Tais respostas são consequência do bloqueio da via do ácido araquidônico via inibição das enzimas fosfolipase A2 e COX (BARADARAN-RAFFI et al., 2017; BIZRAH; YUSUF; AHMAD, 2019).

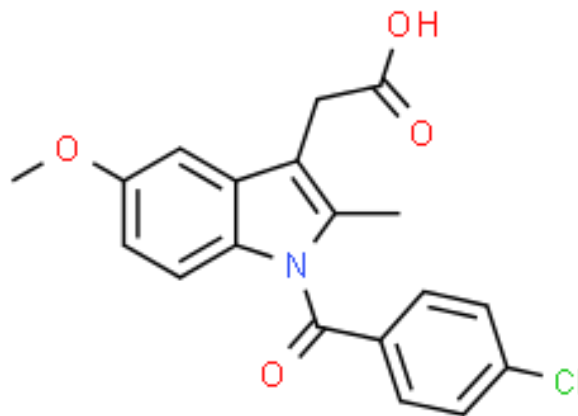
Apesar de extensamente empregados, o uso de corticosteroides deve ser realizado com cautela no tratamento de lesões na córnea, tendo em conta que seu uso pode inibir a reepitelização, a síntese de colágeno e aumentar a pressão intraocular (ESLANI et al., 2014). Alternativamente, pode-se lançar mão do uso de AINES que atuam em uma via metabólica mais restrita, porém têm sido frequente objeto de estudo por sua capacidade na redução da inflamação com menores efeitos deletérios nas células da córnea (HERSH et al., 1990; LEE; KIM; PARK, 2015).

A classe dos AINES é composta por ácidos orgânicos que inibem enzimas COX, e por isso há menor formação de prostaglandinas e tromboxanos, componentes cruciais para a resposta inflamatória. Ademais, é evidenciado que os AINES também contribuem na supressão de locomoção de células polimorfonucleares (PMN) e na redução de compostos radicais livres, fatores que potencializam a resposta inflamatória local (GAYNES; FISCELLA, 2002). Sua utilização tópica ocular também se faz útil no controle da dor pós-operatória da cirurgia de catarata considerando que os AINES também possuem moderada ação analgésica (AHUJA et al., 2008). É importante ressaltar que apenas algumas moléculas desse grupo são passíveis de serem formuladas topicamente em razão de toxicidade exacerbada e pobre solubilidade em água. Portanto, os principais representantes são os derivados do ácido salicílico (ácido acetil salicílico), indólico (indometacina), aril acético (diclofenaco), aril propionico (ibuprofeno) e enólico (piroxicam)

2.4.1.1 Indometacina

A indometacina, de nome químico ácido 2-{1-[(4-clorofenil) carbonil] -5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-il} acético (**Figura 5**), pertence a classe dos AINES derivados do ácido indólico, sintetizada pela primeira vez na década de 60. Trata-se de um pó cristalino, inodoro e de coloração levemente amarelada.

Figura 5 - Estrutura molecular da Indometacina



Fonte: ChemSpider

De acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica (BCS) é considerado um composto classe II, por conta de sua baixa solubilidade e elevada permeação (LOBENBERG; AMIDON, 2000). Sua solubilidade é fortemente relacionada ao pH do meio e constante de dissociação (pKa) é de 4,5. Além disso, é considerada instável em meios alcalinos e praticamente insolúvel em meios ácidos, com a formação de precipitados (GAYNES; FISCELLA, 2002). São descritas duas formas polimórficas principais para a indometacina (forma α e γ) e sua temperatura de fusão é cerca de 160 °C (SLAVIN et al., 2002).

Apesar de todos os AINES possuírem essencialmente o mesmo mecanismo de ação, a IND está dentre os mais potentes, pois menores concentrações são capazes de maior inibição enzimática (GAYNES; FISCELLA, 2002; PEREIRA DA SILVA, 2013). Tais características a tornam um alvo interessante e desafiador para a proposição de novas formulações que otimizem seu potencial em terapias oculares e

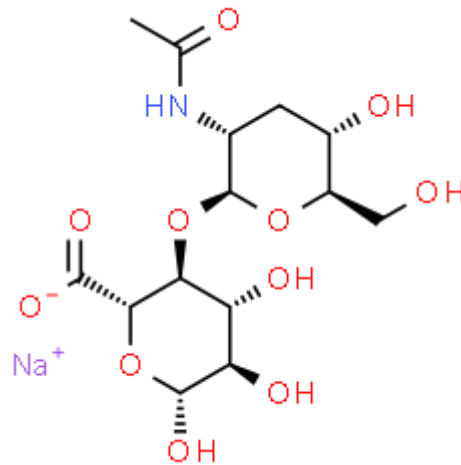
formulações inovadoras são continuamente propostas como nanocápsulas, nanoemulsões e implantes poliméricos (GAYNES; FISCELLA, 2002).

2.4.2 Ácido Hialurônico e reepitelização

A promoção da formação de novo epitélio posterior à lesão química é auxiliada por alguns agentes terapêuticos. A mais simples das estratégias é a manutenção de uma superfície hidratada e homogênea, evitando-se erosões secundárias e acelerando a reabilitação visual, mediante a utilização de lágrimas artificiais livres de conservantes. Outro agente é a fibronectina, uma glicoproteína, presente na matriz extracelular que auxilia na adesão entre células, porém sem impacto na mitose celular (SHARMA et al., 2018).

O ácido hialurônico (HA) é um polissacarídeo não-ramificado composto por dissacarídeos de ácido D-glucurônico e N-acetilglicosamina, frequentemente denominado “hialuronato” por não estar sempre em sua forma protonada (**Figura 6**). Foi descoberto no ano de 1934 por Meyer e Palmer a partir da análise dos componentes presentes no humor vítreo bovino e, inicialmente, a sua obtenção tinha como fonte primária os tecidos animais (cordão umbilical, líquido sinovial, cristas de galo), que ainda são utilizadas atualmente, porém em menor escala. Contudo, são processos complexos que requerem tratamentos adicionais do material orgânico, assim como há risco de reação imunológica nos pacientes, por outras proteínas remanescentes da fonte original (PAN et al., 2016).

Figura 6 - Estrutura molecular do Hialuronato de Sódio.



Fonte: ChemSpider

Posteriormente, a sua produção começou a ser realizada via processos biotecnológicos com o emprego de bactérias do gênero *Streptococcus*, solucionando assim alguns dos problemas técnicos. Entretanto, por ser um microrganismo patógeno, é possível que existam toxinas residuais no produto final. Recentemente, esforços estão sendo realizados para sua produção a partir de diversos gêneros de bactérias mediante modificação genética adequada e sistemas de produção “cell-free” a fim de potencializar e diversificar a produção desse composto tão valioso (HUI; JEREMY; LOVE, 2016).

Frequentemente o HA é o componente principal de formulações farmacêuticas e cosméticas, de estudos científicos inovadores e em procedimentos estéticos, graças as suas propriedades físicas e biológicas únicas. Uma das principais características do HA é sua característica intrínseca de hidratação resultante de sua estrutura hidroxilada. Estima-se que cada unidade de dissacarídeo tenha a capacidade de realizar de 10 a 15 ligações de hidrogênio com moléculas de água circundantes. Esse número de interações é bastante superior à de outros polímeros hidrofílicos, como os alginatos e diversas outras gomas naturais ou sintéticas. As propriedades viscoelásticas também são de grande interesse, tendo em vista que na presença de glicosaminoglicanos há formação de uma rede de hidratação similar a um gel e resulta em maior resistência mecânica (LIAO et al., 2005).

A mucoadesão exercida pelo HA também é de grande relevância, considerando que os grupos funcionais polares em sua estrutura são capazes de interagir fortemente mediante ligações de hidrogênio com mucinas - glicoproteínas presentes em tecidos biológicos - (SALZILLO et al., 2016). Na superfície ocular, o HA interage com mucinas da camada aquosa do filme lacrimal assim como membranas celulares recobertas por mucina no epitélio superficial, dessa forma estimula-se a hidratação e um ambiente favorável a recuperação tecidual. Além disso, tal propriedade é interessante para maior retenção de fármacos na superfície ocular e aumento do sucesso terapêutico (MÜLLER-LIERHEIM, 2020). Interessantemente, a maioria das propriedades físico-químicas do HA são moduláveis, ou seja, dependem de sua massa molecular, condições fisiológicas do meio (pH, osmolaridade e temperatura) e da presença de outros componentes (sais, glicoproteínas, entre outros) multiplicando as possibilidades de uso (LIAO et al., 2005).

A presença de HA é abundante no corpo humano, sendo sintetizado na membrana plasmática de vários tecidos (endoteliais, sinoviais, musculares, epidérmicas, humores oculares) por três enzimas homólogas (HAS₁, HAS₂ e HAS₃). Após a síntese, o composto é armazenado no espaço extracelular. A gama de funções do HA é complexa, contudo, há cada vez mais evidências da relevância de sua interação com receptores superficiais celulares, principalmente CD₄₄ e RHAMM, e seu papel fisiológico e em processos inflamatórios. O primeiro receptor mencionado tem forte influência na interação, migração, multiplicação e adesão celular, ao passo que o receptor RHAMM influencia na alteração do citoesqueleto celular e na motilidade celular (NAOR, 2016).

Há uma complexa relação em seus mecanismos em razão de diferentes respostas mediadas pela massa molecular do HA ligante. Em um cenário fisiológico, os HA de elevada massa molecular (> 200 KDa) são os mais presentes nos tecidos, haja vista que sua interação com os receptores promove ações anti-inflamatórias, migração e multiplicação celular e inibem a neovascularização. Alternativamente, em processos inflamatórios as moléculas de HA sofrem degradação via mecanismos enzimáticos ou estresse oxidativo. Com isso, a quantidade de polímeros de reduzida massa molecular (< 10 KDa) e oligômeros (< 5 KDa) eleva-se. Como consequência, respostas pró-inflamatórias, quimiotaxia e neovascularização são promovidas pelos

mecanismos desencadeados pelos receptores. Especificamente na superfície ocular existe ampla distribuição de receptores CD₄₄ nas células endoteliais e na porção apical de células epiteliais superiores da córnea e conjuntiva. Tal distribuição corrobora com as evidências já relatadas de benefício do HA na manutenção da hidratação ocular, aumento do conforto ocular de formulações e auxílio na recuperação de lesões (MÜLLER-LIERHEIM, 2020; RUPPERT et al., 2014).

2.4.3 Estratégias complementares

Soros autólogos e o plasma rico em plaquetas (PRP) são estratégias valiosas que têm sido empregadas em estudos de recuperação tecidual graças a presença de fatores de crescimento, imunoglobulinas e vitaminas promotoras de crescimento celular (OLIVEIRA; SANTOS; BRANDÃO, 2019) (BARADARAN-RAFFI et al., 2017).

Além disso, o citrato de sódio, a tetraciclina, a acetilcisteína (CAMPOS et al., 2003) e sais de EDTA (BIZRAH; YUSUF; AHMAD, 2019) são utilizados no tratamento agudo da lesão química. De maneira geral, estes reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, enzimas proteolíticas (MMP) e inibição do acúmulo de infiltrado inflamatório (neutrófilos e leucócitos) (DUA et al., 2020). O ascorbato é um co-fator crucial para formação do colágeno que possui um papel na recuperação do estroma e existem evidências fomentando também sua ação em impedir a migração de células inflamatórias e a liberação de enzimas proteolíticas. Portanto, seu uso em concentrações de 5-10% em formulações tópicas é recomendado (BARADARAN-RAFFI et al., 2017). Esses mecanismos são capazes de coibir a degeneração no estroma e facilitar o processo de recuperação tecidual.

O processo de reepitelização inicial é beneficiado pelo transplante de membrana amniótica em forma de enxerto ou emplastro, servindo como uma bandagem biológica. Existem evidências que correlacionam seu uso com um menor nível de dor dos pacientes, assim como um promotor de reepitelização em razão da indução de apoptose do infiltrado inflamatório (PONTES et al., 2011). De forma isolada, ou combinada com a técnica anterior, em casos de perda da vascularidade limbal é possível que esta seja recuperada utilizando-se da camada de Tenon (fascia que recobre a parte externa do olho) cirurgicamente

Nos quadros de lesão química extensa que afetam o limbo, as células-tronco são potencialmente impactadas, corrompendo o equilíbrio de recuperação tecidual, com consequências no estágio crônico da lesão. Nesse caso, há benefício do transplante de células-tronco limbais para promoção da recuperação da superfície ocular, por meio de células coletadas do próprio paciente, cultivadas separadamente ou ainda de parentes próximos (ESLANI; BARADARAN-RAFII; AHMAD, 2012).

Nas situações em que há cicatrização profunda do estroma e efeito direto na qualidade da visão do paciente afetado pode-se lançar mão do transplante de córnea, em que o paciente pode receber um tecido completamente novo de um doador ou apenas certos segmentos, a depender do caso e avaliação clínica. Ademais, mediante o avanço na tecnologia de materiais, córneas artificiais estão sendo desenvolvidas e utilizadas como artifício para recuperação da visão, assim como hidrogéis de colágeno e demais biomateriais que auxiliam na recuperação do tecido original lesionado (SINGH et al., 2019).

2.5 Formas farmacêuticas de administração ocular tópica com perfil de liberação prolongada

O olho humano possui estruturas anatômica, fisiológica e bioquímica únicas exercendo papel de barreira contra agentes externos, com isso, a administração de agentes terapêuticos se torna especialmente desafiadora. De maneira geral, as formulações tópicas são preferíveis, considerando que são mais fáceis de serem utilizadas na terapêutica (DAVIES, 2000).

Entretanto, mesmo em terapias locais que visam doenças do segmento anterior, vários obstáculos têm que ser considerados no planejamento de uma nova apresentação farmacêutica. A primeira barreira pré-corneal a ser considerada é o filme lacrimal cuja influência pode limitar-se a diluição do fármaco da formulação até ligações com os diversos peptídeos presentes. Ainda, o volume excessivo instilado pode ser drenado pela ducto naso-lacrimal visto que o *cul-de-sac* possui volume útil de aproximadamente 10 μ L (KUNO; FUJII, 2011).

Outra questão relevante está relacionada às características celulares das camadas da córnea. A camada superficial, formada pelo epitélio, tem característica

fortemente lipofílica e as células epiteliais estão fortemente conectadas por proteínas. Tal característica dificulta a entrada de qualquer molécula, especialmente aquelas com caráter hidrofílico pronunciado. Em contrapartida, o estroma é constituído por componentes hidrofílicos que formam uma matriz complexa, a qual impede a permeação de fármacos hidrofóbicos (CHOLKAR; DASARI, 2013). A conjuntiva do globo ocular possui uma rica e complexa trama de vasos sanguíneos e linfáticos que se estendem por toda extensão do segmento anterior. Portanto, moléculas podem entrar na corrente sanguínea por pinocitose considerando que as junções intercelulares menos coesas possibilitam esse transporte (KUNO; FUJII, 2011). O resultado desses, e de outros mecanismos protetores oculares contra o meio externo, é a baixa capacidade de penetração de fármacos nos tecidos do segmento anterior, atingindo, em média, apenas 5% da concentração teórica. Esse fato impossibilita o tratamento adequado de várias doenças que acometem o olho e impacta no regime posológico do paciente (DE ARRUDA MELLO FILHO et al., 2010).

Todos estes obstáculos mencionados estão relacionados ao tratamento de doenças do segmento anterior, entretanto, as dificuldades são ainda maiores em desordens do segmento posterior, que representam doenças com elevada prevalência (glaucoma, retinopatia diabética, entre outras). Para essas condições, o tratamento frequentemente envolve injeções intravítreas como via de administração (PATEL et al., 2013).

Diante do cenário apresentado, esforços estão sendo realizados a fim de desenvolver formulações que superem os problemas da administração de fármacos no segmento anterior do olho. Além das características inerentes do fármaco (log P, pKa, afinidade a proteínas, massa molecular, etc), o tempo de residência é um fator crucial para penetração tecidual. Dessa forma, formulações convencionais como: colírios, suspensões, emulsões e pomadas foram desenvolvidos utilizando-se como adjuvantes agentes viscosantes (HPMC e HPC), promotores de penetração (saponinas, Cremophor EL[®], cloreto de benzalcônio) e ciclodextrinas. De modo geral, tais formulações obtém êxito na entrega aumentada de fármacos, contudo desvantagens como irritação local, vermelhidão, inflamação, interferência na visão e problemas de estabilidade estão presentes (PATEL et al., 2013).

Além disso, formulações denominadas não-convencionais são constantemente desenvolvidas de modo a tirar vantagem de diversos locais de administração e da propriedade de determinados materiais em prolongar a liberação de fármacos, tais como os lipossomas (MEHANNA; EL-KADER; SAMAHA, 2017), os implantes poliméricos subconjuntivais (RODRIGUES et al., 2014) e os sistemas nanoparticulados (JANAGAM; WU; LOWE, 2017). Ainda, cada vez mais os hidrogéis têm sido utilizados para formulações oculares graças as suas vantagens inerentes e polivalência.

2.5.1 Hidrogéis

Os hidrogéis podem ser definidos como redes poliméricas tridimensionais com elevada capacidade de retenção de água, divididos em dois grandes grupos, a depender do tipo de interação em suas cadeias poliméricas. A primeira é a ligação física entre as moléculas do polímero constituinte, realizada por interações eletrostáticas (ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals ou ligações iônicas. Naturalmente, hidrogéis baseados nesse tipo de interação possuem gelificação notadamente reversível. Já ligações químicas compreendem as situações em que o gel é formado mediante a formação de ligações covalentes entre as cadeias poliméricas, tornando o hidrogel irreversível e mais estável (LYNCH et al., 2020).

As suas características fortemente ajustáveis ao fim de utilização tornam os hidrogéis uma forma vantajosa em vários cenários como em procedimentos estéticos, bioengenharia e sistemas de liberação de fármacos.

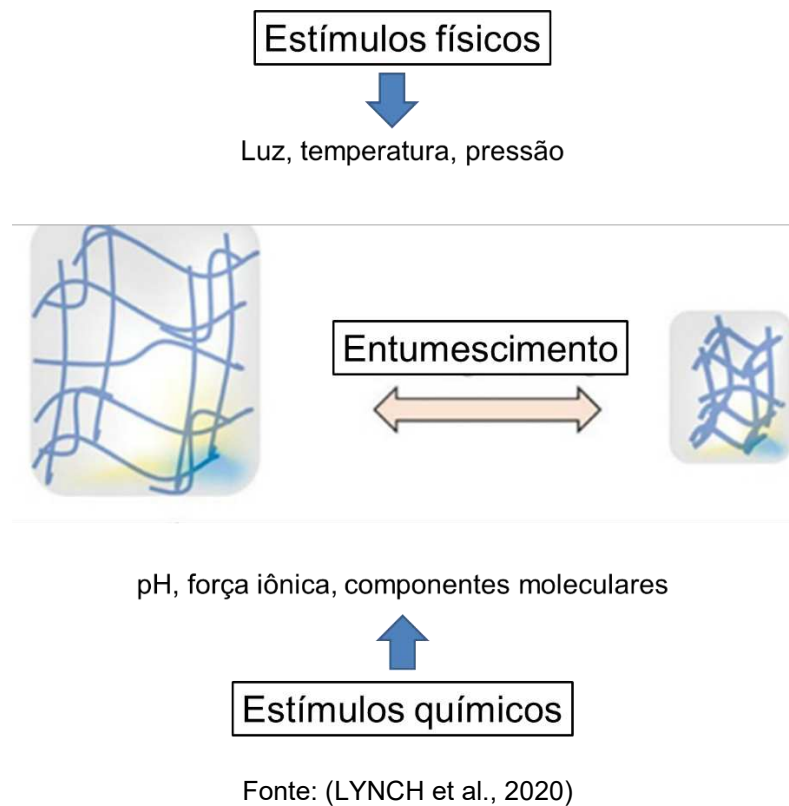
No que tange a capacidade de liberação de fármacos vários fatores devem ser levados em consideração como diferenciais positivos dos hidrogéis. Conforme mencionado, sua estrutura é composta por cadeias poliméricas interligadas, que possuem entre elas espaços livres. Tal configuração é útil na proteção de princípios ativos sensíveis a degradação química ou enzimática, uma vez que as cadeias poliméricas servem como barreira de proteção. Além disso, no entumescimento após a hidratação são formados espaços maiores entre as cadeias, então fármaco é capaz de difundir do hidrogel para o local de ação de forma controlada, a depender de sua interação com o polímero, tamanho de partícula e cinética de liberação (LI; MOONEY, 2016).

Os hidrogéis são geralmente compostos por polímeros hidrofílicos (colágeno, polietilenoglicol, entre outros) ou de caráter anfifílico: poli (óxido de propileno), poli (ácido lático-co-ácido glicólico), policaprolactona, dentre outros. A variedade de polímeros que compõe os hidrogéis garantem caráter diversificado, uma vez que são capazes de interagir não apenas com fármacos hidrofílicos, mas também aqueles com caráter hidrofóbico mais pronunciado. Ademais, há elevada biocompatibilidade explicada pela estrutura tridimensional das cadeias poliméricas altamente carregada de água tem características parecidas ao material extracelular (HOARE; KOHANE, 2008).

Alguns dos polímeros formadores de hidrogéis interagem de forma eficiente com as mucosas mediante interações de hidrogênio ou atração de cargas opostas, são exemplos disso o poli (ácido acrílico) e a quitosana, respectivamente. Com isso prolonga-se o tempo de contato entre a formulação e a barreira de entrada do fármaco, resultando em aumento da concentração local. Para polímeros que não interagem fortemente com as mucosas é possível incorporar outro polímero adjuvante, que forma interações com o meio biológico. Essa estratégia se demonstra especialmente útil nas administrações nasais e oculares (LI; MOONEY, 2016).

Hidrogéis tradicionais possuem inúmeras vantagens como sistema de entrega de fármacos, contudo, algumas dificuldades podem surgir dependendo da forma de administração (via sistêmica) ou até em superfícies de aplicação tópica irregulares. Uma abordagem alternativa que representa avanço sobre algumas dessas limitações são os sistemas formados *in-situ*. Nestes, os polímeros formadores, inicialmente em solução, são rearranjados mediante algum estímulo externo seja físico (luz, ultrassom, temperatura, campo magnético, pressão) ou químico (pH, força iônica, moléculas exógenas) para formação do gel (**Figura 7**). A variedade de polímeros e estímulos possíveis está em constante aumento, conforme a literatura demonstra (ALMEIDA et al., 2014).

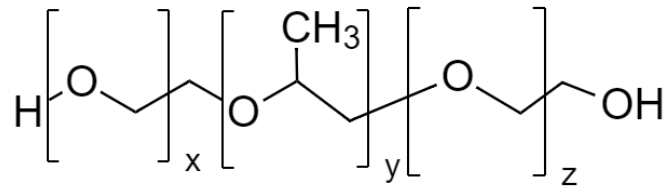
Figura 7 – Estímulos de gelificação *in-situ* para polímeros.



2.5.1.1 Poloxâmeros

Os poloxâmeros são copolímeros não iônicos em tribloco, com uma cadeia hidrofóbica central de poli (óxido de propileno) (POP) flanqueada por duas cadeias hidrofílicas de poli (óxido de etileno) (POE) (**Figura 8**). É uma classe de polímeros atóxica, aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em formulações de aplicação tópica e amplamente utilizada em bioengenharia de tecidos e em sistemas de liberação controlada de fármacos (DUMORTIER et al., 2006).

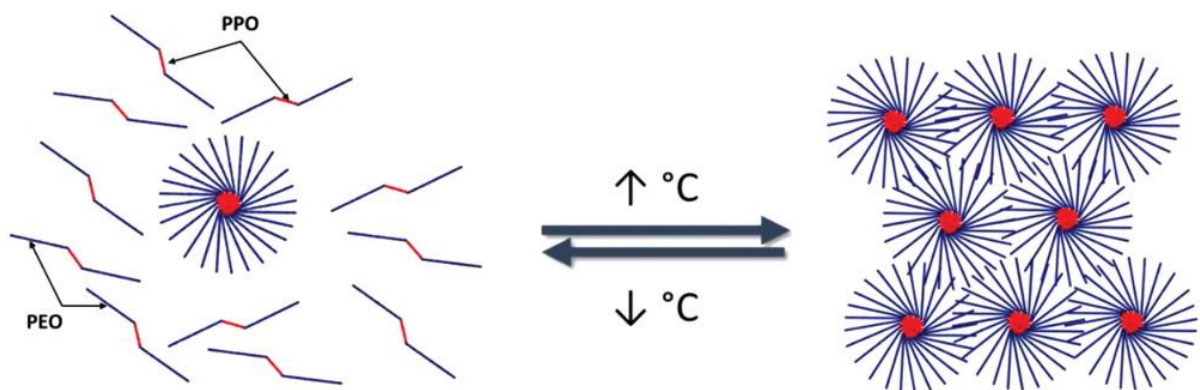
Figura 8 - Estrutura geral dos poloxâmeros.



Fonte: Chemspider

Sua estrutura com característica anfifílica garante solubilidade em água em baixas temperaturas com organização aleatória de suas cadeias. Com aumento da temperatura, os domínios centrais hidrofóbicos (POP) se agregam com intuito de reduzir a interação com o meio aquoso, organizando-se em forma de micelas de centro apolar. Em certa temperatura, é formada uma complexa rede de micelas poliméricas interligadas, resultando na formação do hidrogel. Tal processo depende fortemente da concentração de poloxâmero na solução, assim como na proporção de blocos hidrofóbicos e hidrofílicos que constituem o polímero (RUSSO; VILLA, 2019).

Figura 9 - Modificações na estrutura nanométrica das micelas de K407 mediante aquecimento.



Fonte: ABOU-SHAMAT ET AL., 2019

Na administração ocular tópica os sistemas gelificantes *in-situ* baseados em poloxâmeros, além da melhora no tempo de retenção e redução da remoção pelo sistema naso-lacrimonal, também se permite a aplicação de doses mais precisas, liberação controlada e prolongada dos fármacos, propriedades reológicas adequadas e facilidade no processo de formulação. Graças ao centro hidrofóbico formado pela organização das micelas dos poloxâmeros estes sistemas também são capazes de veicular fármacos hidrofóbicos (AGRAWAL; DAS; JAIN, 2012; RUSSO; VILLA, 2019).

Dentre os poloxâmeros, o polímero K407 se destaca por suas características gelificantes, adequada biocompatibilidade e solubilização de fármacos hidrofóbicos. Sua massa molecular é aproximadamente de 12,6 KDa, e contém cerca de 70% de POE em sua estrutura, aumentando seu caráter hidrofílico em relação a outros poloxâmeros (GIULIANO et al., 2018). Como os demais poloxâmeros, é um polímero aprovado pelo FDA, o qual tem seu uso comercialmente aprovado pelo mesmo órgão apenas para uma formulação de suspensão auricular na concentração de 15,1% p/p. Na pesquisa, é amplamente utilizado para diversos tipos de formulações tópicas em concentrações variadas (AKKARI et al., 2016; GARALA et al., 2013; MANSOUR et al., 2008; QIAN et al., 2010).

3. JUSTIFICATIVA

Lesões químicas da superfície ocular são causa frequente de internações hospitalares, haja vista que ocorrem tanto no ambiente domiciliar e no ambiente de trabalho. Portanto, há um grande impacto na vida de pessoas afetadas diariamente (DUA et al., 2020).

Conforme discutido, o processo de recuperação tecidual da córnea depende de um sensível equilíbrio de diversos fatores inflamatórios e mediadores de recuperação tecidual que devem atuar de maneira controlada. Muito embora haja relevante avanço no entendimento da patofisiologia de lesões químicas da superfície ocular, nos tratamentos tópicos com entrega de fármacos melhorada e no prognóstico de modo geral, ainda há necessidade de melhorar as terapias atualmente empregadas (STEPP et al., 2011).

Os corticosteroides tópicos utilizados no controle da inflamação tem reconhecidamente a capacidade de inibir a capacidade de recuperação tecidual, bem como promover aumento da pressão intraocular, se utilizados durante períodos longos em lesões oculares severas (HERSH et al., 1990). Recentemente, como forma alternativa, a utilização de AINES tem sido estudada em casos de lesão química ocular, dadas suas propriedades na redução da inflamação local (AHUJA et al., 2008). Estudos demonstram a utilização de indometacina, um fármaco seguro para formulações de uso ocular e elevada potência relativa de inibição das enzimas COX (ANDONOVA; PETROVA; GEORGIEV, 2013; BADAWI et al., 2008; HIPPALGAONKAR et al., 2013a).

Sistemas gelificantes *in-situ* abrem novas possibilidades na administração de fármacos na superfície ocular, visto que são fáceis de formular, se mantêm no estado líquido até o estímulo ser introduzido e acomodam-se mesmo em superfícies irregulares, como a do olho humano lesionado. Sistemas contendo indometacina foram desenvolvidos e resultaram em formulações estáveis, facilmente executáveis e com prolongada liberação do fármaco (KUMAR et al., 2003; PANDIT et al., 2007). Os poloxâmeros tem características ideais para tais formulações uma vez que sua atoxicidade, solubilidade em água e inerente capacidade de carregar fármacos hidrofóbicos em estruturas micelares. Além disso, sua capacidade de gelificação é

uma ferramenta útil para liberação controlada do princípio ativo e aumento do tempo de residência da formulação.

Contudo, os poloxâmeros não possuem propriedade mucoadesiva pronunciada, e por isso suas preparações podem ser beneficiadas pela introdução de um polímero capaz de interagir com as mucosas. A utilização do HA em associação aos poloxâmeros é capaz de formar uma plataforma para entrega de fármacos no olho com propriedades interessantes de mucoadesividade, reologia não-newtoniana, gelificação em temperatura biológica e manutenção da entrega controlada de fármacos (MAYOL et al., 2008; PEREIRA GARRASTAZU et al., 2013). Ainda, para lesões químicas, o ácido hialurônico é capaz de exercer função de hidratante local e bioquímica no crescimento e diferenciação celular por suas interações com receptores (CD₄₄ e RHAMM).

Neste contexto, uma formulação contendo indometacina em um sistema gelificante *in-situ*, composto pela associação de K407 e HA, pode proporcionar uma interessante alternativa terapêutica. A caracterização físico-química e a investigação da atividade *in-vivo*, em modelo de lesão química alcalina, são os primeiros passos para que essa formulação transcenda o conceito inicial e demonstre seu potencial, culminando eventualmente em um novo medicamento. Por esses motivos o presente trabalho foi realizado.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar um sistema gelificante *in-situ*, composto por K407, HA e contendo indometacina, assim como avaliar a progressão de recuperação na fase imediata (< 7 dias) de lesão química alcalina de córnea em modelo experimental animal.

4.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer as concentrações ideais dos componentes para gelificação na temperatura biológica.
- Caracterizar as formulações de sistema gelificante mediante análise de tamanho de partículas, índice de polidispersão, microscopia de luz polarizada criomicroscopia de transmissão, pH, viscosidade, identificando a formulação ideal.
- Avaliar a segurança preliminar da formulação desenvolvida em modelo de membrana corioalantóica em embrião de galinha (HET-CAM).
- Realizar teste de liberação *in-vitro* sem membrana da formulação, assim como teste de penetração ocular, utilizando-se de método analítico desenvolvido e validado em cromatografia líquida de fase reversa (CLAE-RP).
- Avaliar *in-vivo* a progressão de recuperação da córnea de coelhos lesadas por agente alcalino tratadas com a formulação desenvolvida por meio índice de opacidade, teste de fluoresceína, tomografia de coerência óptica (OCT), histologia.

CAPÍTULO I

**DESENVOLVIMENTO E
CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA
GELIFICANTE *IN-SITU* CONTENDO ÁCIDO
HIALURÔNICO E INDOMETACINA**

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

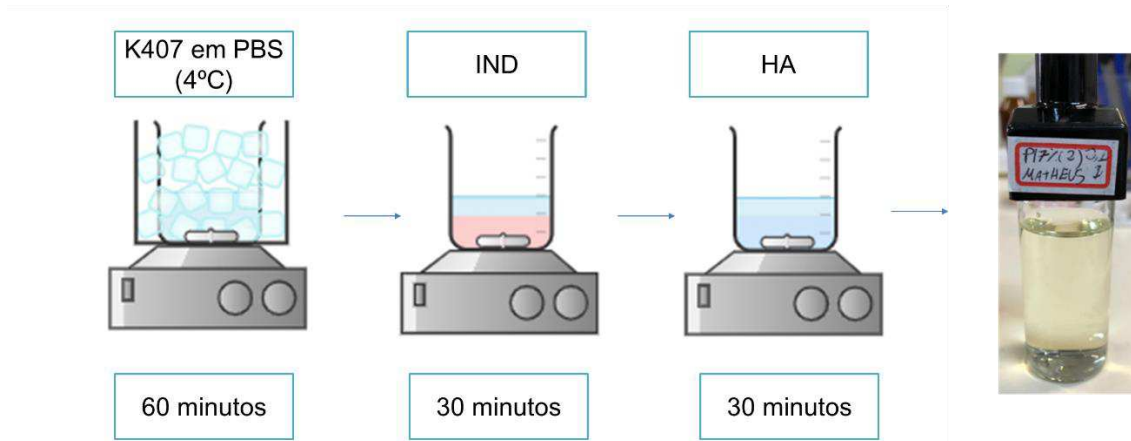
A indometacina (IND) foi adquirida da Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brazil) e o HA, na forma de Hialuronato de Sódio (8 a 200 KDa), foi obtido da Contipro® (República Tcheca). O Kollidon 407 (K407) foi gentilmente cedido pela BASF® (São Paulo – Brasil) e a água ultrapura utilizada durante os processos foi produzida por sistema Milli-Q® (Millipore, Massachusetts, EUA). A formulação comercial (FC) utilizada: um colírio contendo indometacina a 0,1% p/v, foi adquirido da Chauvin - Bausch Lomb (Montpellier, França). Os demais reagentes utilizados nos experimentos eram de grau analítico.

5.2 Métodos

5.2.1 Preparação do sistema gelificante *in-situ*

Os sistemas gelificantes *in-situ* foram preparados utilizando-se o método de solubilização a frio, comumente empregado em formulações contendo poloxâmeros (GIULIANO et al., 2018). Inicialmente, pesou-se o K407 em balança analítica e a quantidade foi transferida para um béquer em banho gelado. Adicionou-se 5 mL de tampão PBS (4 °C) e o sistema foi mantido sob agitação magnética por volta de 1 hora, até completa dissolução do polímero e obtenção de solução transparente. Posteriormente o sistema de banho gelado foi removido e IND adicionada ao béquer, ainda sob agitação, até que fosse completamente solubilizada, resultando em solução levemente amarelada. Como terceiro e último passo, adicionou-se HA ao sistema, mantido sob agitação até solubilização completa. O esquema do processo de preparo é demonstrado na **figura 10**.

Figura 10 - Processo de preparação do sistema gelificante in-situ via solubilização a frio.



As concentrações dos componentes variaram entre K407 (16% - 19% p/v), HA (0,1% - 0,5% p/v) e IND (0,1% - 0,2% p/v) de modo a identificar as proporções para formação de um sistema gelificante otimizado.

5.2.2 Medida de pH

As aferições de pH foram realizadas em potenciômetro devidamente calibrado (mPA-210 - Tecnopon, São Paulo, Brasil). Mediu-se o pH das formulações em diversas proporções sem diluição das amostras, em triplicata.

5.2.3 Teste de Inversão de Tubo

O teste de inversão de tubo é considerado uma maneira de fácil execução e baixo custo para verificar o comportamento preliminar de gelificação de compostos poliméricos (STANZIONE et al., 2020). Para tal, foi adicionado 1 mL da formulação em eppendorfs de plástico de 2 mL. Os recipientes eram colocados em uma incubadora (TE-4200, Tecnal) a 20 °C e a temperatura era aumentada em regime constante (1° C a cada 2 minutos), até atingir a temperatura de 37 °C. A cada intervalo de temperatura invertiam-se os tubos a fim de verificar se a gelificação havia ocorrido.

5.2.4 Distribuição de tamanho de partícula e índice de polidispersão

O tamanho de partícula das micelas do sistema gelificante foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (Zetasizer® Nanoseries ZS90, Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra), após diluição adequada das amostras (1:100 v/v). Utilizou-se para as análises cubetas de poliestireno com 1 cm de largura e ângulo fixo de 90°. Além disso, essas concentrações foram testadas nas temperaturas de 25 °C e 34 °C.

5.2.5 Reologia oscilatória

Foi utilizado o reômetro ARES (TA Instruments®, New Castle, EUA) para medição da temperatura de gelificação, por meio da intersecção entre os módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') das formulações selecionadas. Para tanto, aproximadamente 1 mL da amostra foi submetida a rampa de aquecimento (20°C – 37°C) com dispositivo Peltier, utilizou-se o *spindle* 52 de superfície plana e frequência fixa de 1 Hz. Também foi realizada em formulações diluídas (7:30 v/v) para avaliar a interferência da diluição.

5.2.6 Viscosidade

A viscosidade da formulação otimizada foi analisada comparativamente à viscosidade de FC utilizando ARES (TA Instruments®, New Castle, EUA) acoplado ao *spindle* 52 de superfície plana. Foi comparada a viscosidade de cada uma das formulações sem e com diluição (7:30 v/v) em rampa de cisalhamento de 0 cm⁻¹ até 1500 cm⁻¹, em temperaturas de 25° e 34° C. Tais condições foram empregadas de modo a simular a diluição da formulação em fluido lacrimal, assim como o cisalhamento causado pelos movimentos de pálpebra e temperatura fisiológica.

5.2.7 Microscopia de Luz Polarizada

O aspecto da formulação otimizada e FC foram avaliados por microscopia de luz polarizada nos aumentos de 10 e 20x, com e sem aquecimento prévio (34°C). Para isso, uma pequena quantidade de cada formulação foi espalhada em lâminas

de microscopia, o suficiente para formar uma fina camada homogênea. Posteriormente, as lâminas foram visualizadas utilizando o microscópio óptico (Zeiss®, Modelo Axio Imager M2) equipado com filtro polarizador.

5.2.8 Criomicroscopia eletrônica de Transmissão (Crio-MET)

A morfologia e distribuição de tamanho da formulação otimizada foi submetida a análise microscopia eletrônica de transmissão. Nesse caso, foi utilizada a técnica de criomicroscopia, uma vez que as delicadas estruturas micelares podem ser melhor observadas e são estabilizadas frente ao vácuo, mediante um processo prévio de congelamento (DOBRO et al., 2010). A amostra foi espalhada em grade de microscopia eletrônica composta por cobre revestido de carbono e rapidamente submersa em etano líquido para formação de uma fina camada de amostra (*plunge freezing*).

Posteriormente foram obtidas imagens utilizando-se o Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai® G2-20 - FEI SuperTwin 200 kV e o perfil de distribuição do tamanho de partículas foi obtido. As análises foram realizadas no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

5.2.9 Liofilização

A formulação otimizada foi liofilizada a fim de compreender seu comportamento e para realização de demais testes. Para tanto, cerca de 1 mL de amostra foi colocada em um frasco de vidro, posteriormente congelada com nitrogênio líquido. Após o congelamento da amostra, utilizou-se liofilizador Freezone (LabConco Corporation®, Kansas, EUA) em um ciclo de 24 horas de liofilização.

5.2.10 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os componentes foram analisados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier a fim de verificar a compatibilidade entre eles nas concentrações determinadas. Amostras de aproximadamente 5 mg de cada componente (K407, HA, IND, F6) foram misturadas a KBr em um almofariz de

porcelana até obter-se uma mistura homogênea de pós. Posteriormente, as amostras foram comprimidas em prensa hidráulica para formação de um delicado disco. O disco foi colocado no equipamento (Spectrum BX – Perkin Elmer®) e a sua transmitância avaliada na faixa de comprimento de onda de 0 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} .

5.2.11 Cromatografia líquida de fase reversa (CLAE-RP)

Para análise e quantificação da liberação de indometacina foi desenvolvido e validado método analítico em cromatografia líquida de fase reversa (CLAE-RP). Utilizou-se coluna de fase reversa C18 de 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e com partículas de 5 μm (LiChrospher® 100 RP-18 encapada, Merck, Alemanha). Foram injetadas no sistema amostras de 20 μL em fase móvel constituída de Tampão Fosfato (pH 3), acetonitrila, água (3:57:40 v/v), fluxo de 1 mL/min isocrático e temperatura de 25 °C. Os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda de 254 nm.

5.2.12 Teste de liberação – Método sem membrana

Para os sistemas gelificantes existe a possibilidade análise da liberação do fármaco nele contido, baseando-se na capacidade de gelificação em determinadas temperaturas. De maneira geral, certa quantidade de formulação é colocada em um recipiente rígido e mantido em temperatura para que a gelificação seja atingida no fundo desse. Posteriormente, é adicionado o meio de dissolução acima do gel, formando um sistema bifásico que possibilita movimentos de difusão do fármaco e erosão de cadeias poliméricas (NIE et al., 2011).

Para o teste, 1 mL da formulação otimizada foi adicionado a um frasco de penicilina de 5 mL, em duplicata. Os recipientes foram mantidos em agitação de 100 rpm e 34 °C, resultando em um gel no fundo dos frascos. Posteriormente, foram adicionados 4 mL de PBS (pH 7,4) em cada um dos frascos e sistema fechado com tampas de borracha. Amostrou-se 1 mL do meio de liberação nos intervalos de 2, 5, 30, 120, 400 e 1440 min, e imediatamente era adicionado 1 mL de PBS (pH 7,4) para manutenção de condição *sink*. Ao final do teste, o gel restante no frasco foi

extraído com acetonitrila e foi também quantificado. As amostras obtidas foram analisadas em CLAE-RP pelo método desenvolvido.

5.2.13 Teste de penetração ocular

A penetração foi testada em sistema de célula de Franz. Completou-se o compartimento receptor com tampão PBS (pH 7,4) mantido em 34 °C e em agitação com barra magnética durante a execução do teste. Utilizou-se córnea de porco como barreira entre os compartimentos doador e receptor do sistema. Cerca de 500 µL da formulação otimizada foram adicionados ao sistema, em duplicata. Amostrou-se 1 mL do compartimento receptor nos intervalos de min, 2, 5, 30, 120, 400 e 1440 min e imediatamente era adicionado 1 mL de PBS (pH 7,4) para manutenção de condição *sink*. Ao final do teste, as córneas foram recuperada e extraída em um cadinho com pistilo de porcelana com 1 mL de acetonitrila. Posteriormente as amostras obtidas foram analisadas em CLAE-RP pelo método desenvolvido.

5.2.14 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os resultados da temperatura de gelificação em teste de inversão de tubo e entre grupos de reologia oscilatória foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) *one way* com pós-teste de Bonferroni. Além disso, teste de T para comparação dos valores de temperatura entre testes de inversão de tubo e reologia oscilatória. O nível de significância aplicado aos testes foi de $p < 0,5$. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 8.4.3 (San Diego, Califórnia, EUA).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Definição das concentrações dos componentes do sistema gelificante

Para a formulação desenvolvida objetiva-se haja solubilidade da IND, uma molécula com caráter hidrofóbico acentuado (LogP 4,27), em um sistema majoritariamente anfifílico. A concentração mínima (16%) de K407 é embasada na concentração para função gelificante preconizada pelo fabricante, assim como testes preliminares de gelificação. Sua concentração máxima leva em consideração a aspectos de biocompatibilidade, uma vez que concentrações superiores a 20% p/v possuem alguma toxicidade intraocular, em caso de alguma capacidade de penetração da córnea (SOLIMAN et al., 2019). As concentrações de HA testadas para a formulação foram de 0,1 e 0,5% p/v, em conformidade com outros estudos que utilizaram quantidades semelhantes com sucesso (HSIEH et al., 2020; PEREIRA GARRASTAZU et al., 2013).

Testou-se, então, a concentração convencional de 0,1% p/v de IND encontrada em produtos comerciais, assim como 0,2 % p/v em termos de aspecto e solubilidade. De modo a entender de maneira mais eficiente foi utilizado um design experimental fatorial fracionado (2^{k-1}) com dois níveis (+1 e -1) para cada componentes da formulação (**Figura 11** e **Tabela 3**). Na interpretação dos resultados abaixo considerou-se um *score* binário (1 = satisfatório, 2 = não satisfatório) para as características de aspecto/solubilidade da formulação.

Figura 11 - Esquema experimental de design fatorial fracionado

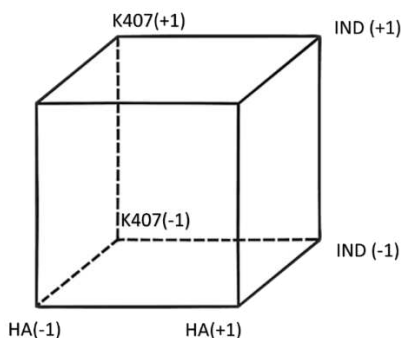
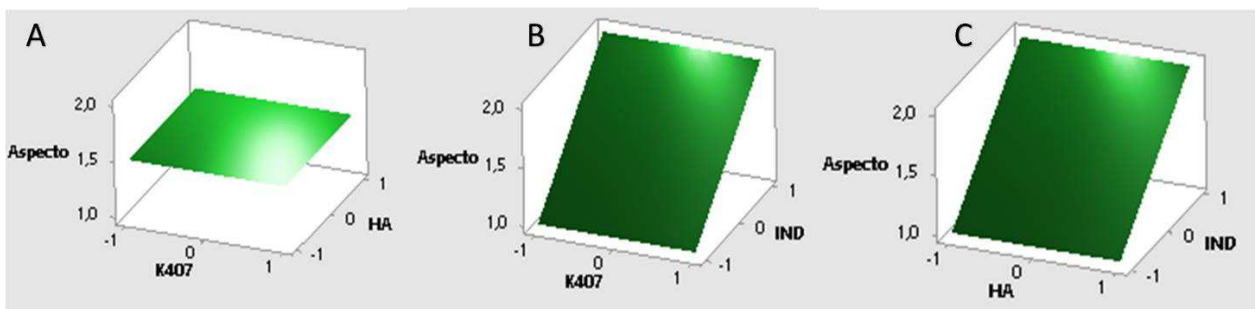


Tabela 3 – Respostas de aspecto para o design experimental fatorial fracionado.

K407 (% p/v)	HA (% p/v)	IND (% p/v)	Aspecto
16	0,1	0,1	1
16	0,1	0,2	2
16	0,5	0,1	1
16	0,5	0,2	2
19	0,1	0,1	1
19	0,1	0,2	2
19	0,5	0,1	1
19	0,5	0,2	2

Por meio dos gráficos de superfície (**Figura 12-A**) entende-se que a interação entre as concentrações de K407 e HA não é relevante para o aspecto da formulação pois a resposta de superfície foi mantida plana. Porém, nos níveis maiores de IND (nível +1) há inclinação da superfície resposta de “Aspecto” em direção ao nível “2”, que é insatisfatório (**Figura 12-B e C**). Na concentração de 0,2% p/v a formulação apresentou-se com coloração amarelada intensa, porém com precipitado após o término da agitação. Ao passo que, na concentração de 0,1% p/v a formulação com coloração amarelada se manteve límpida e sem a presença de precipitados que podem influenciar na segurança da aplicação ocular. Desse modo, a concentração de 0,1% p/v foi a escolhida.

Figura 12 - Gráficos de superfície para a resposta de aspecto da formulação.

6.2 Preparação do sistema gelificante

Em sistemas gelificantes *in-situ* a concentração do polímero é crucial para a compreensão da temperatura de gelificação, pois há relação direta na concentração micelar crítica (CMC). Além disso, as interações entre os componentes da formulação têm a capacidade de alterar a temperatura de gelificação do sistema. Para tanto, foram preparadas 12 formulações em triplicata (design experimental fatorial completo) com distintas concentrações de K407 e HA, mantendo-se constante a concentração de IND (0,1% p/v). Os valores de temperatura de gelificação e pH para as formulações desenvolvidas são apresentados na **tabela 4**.

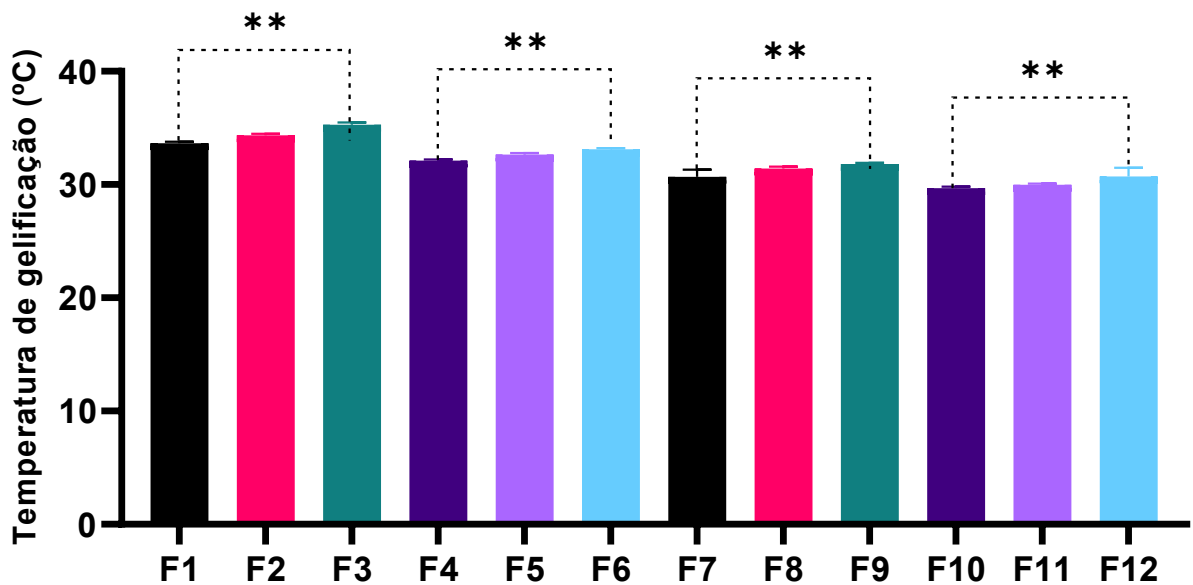
Tabela 4 - Respostas de gelificação e pH para as formulações preliminares (F1 - F12).

Formulação	K407 (% p/v)	HA (% p/v)	IND (p/v%)	Temperatura média (°C)	pH
F1	16	0	0,1	33,6 ± 0,08	7,24 ± 0,03
F2	16	0,1	0,1	34,3 ± 0,08	6,91 ± 0,01
F3	16	0,5	0,1	35,2 ± 0,12	6,88 ± 0,01
F4	17	0	0,1	32,1 ± 0,05	7,27 ± 0,03
F5	17	0,1	0,1	32,6 ± 0,06	6,89 ± 0,01
F6	17	0,5	0,1	33,1 ± 0,06	6,86 ± 0,01
F7	18	0	0,1	30,7 ± 0,45	6,81 ± 0,01
F8	18	0,1	0,1	31,4 ± 0,1	6,90 ± 0,02
F9	18	0,5	0,1	31,8 ± 0,05	6,84 ± 0,01
F10	19	0	0,1	29,6 ± 0,09	7,27 ± 0,02
F11	19	0,1	0,1	29,9 ± 0,06	6,88 ± 0,04
F12	19	0,5	0,1	30,6 ± 0,38	7,28 ± 0,02

As temperaturas de gelificação obtidas por meio do teste de inversão de tubo representam evidente comportamento entre o aumento da concentração de K407 e a redução da temperatura de gelificação, conforme já evidenciado em outros trabalhos (GIULIANO et al., 2020). Além disso, na **figura 13** as temperaturas de gelificação estão mostradas em forma gráfica e nela foram comparadas as temperaturas entre os grupos com a mesma concentração de K407 por ANOVA (F1 vs F2; F1 vs F3; F4 vs F5; F4 vs F6; F7 vs F8; F7 vs F9; F10 vs F11; F10 vs F12).

Identificou-se diferença estatística por Bonferroni ($p < 0,0001$) entre as formulações sem HA e aquelas com 0,5% p/v.

Figura 13 - Temperatura de gelificação média para as formulações F1-F12. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão ($n=3$). Houve diferença relevante (** $p < 0,01$) nas comparações entre formulações sem e com 0,5% de HA. (F1 vs F3; F4 vs F6; F7 vs F9 e F10 vs F12). A avaliação estatística entre grupos foi realizada por ANOVA *one way*, seguida do teste de Bonferroni (*pós-hoc*). O nível de significância foi de $p < 0,05$.



Conforme mencionado, o mecanismo de gelificação de poloxâmeros depende da dessolvatação e aproximação das cadeias poliméricas mediada pelo aumento da temperatura, para formação da trama polimérica. Com a presença do HA na concentração de 0,5% p/v na formulação, provavelmente o contato entre as cadeias de K407 é dificultada, resultando em maior temperatura necessária para a transição de solução para gel (sol-gel). A mesma dificuldade não acontece na concentração de 0,1% p/v, portanto pode ser considerada uma interferência concentração-dependente.

Estima-se que o olho humano tenha temperatura aproximada de 34°C (FORUSHANI; HASSANI; IZADI, 2012), portanto, a maioria das formulações desenvolvidas tem temperatura aproximada à biológica (exceto F3).

Formulações para uso ocular devem ter pH entre 6,5 e 7,8 como forma de evitar irritações, inflamações oriundas da forma farmacêutica, bem como melhorar o

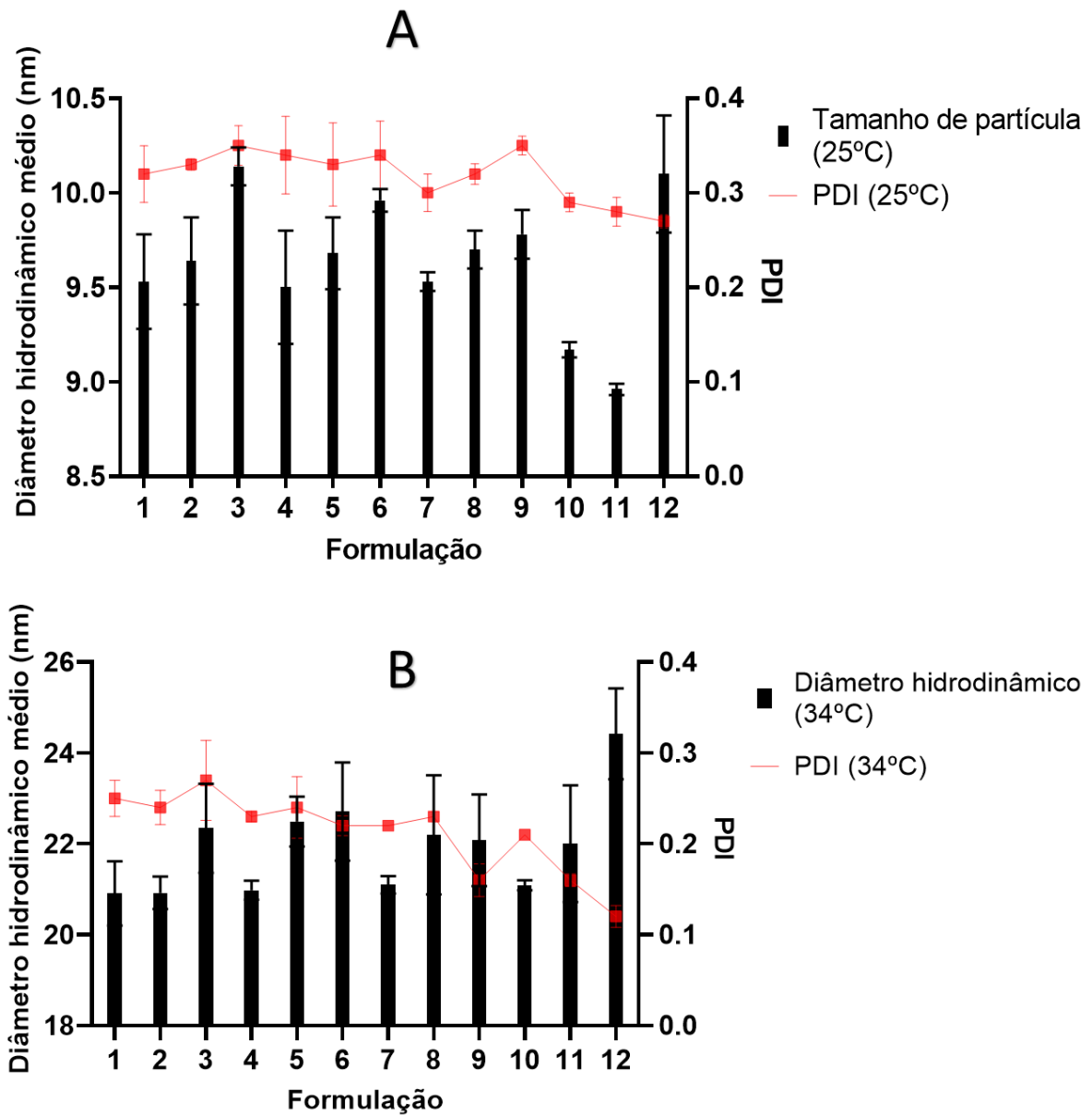
conforto por parte do paciente (BARANOWSKI; GAJDA; PLUTA, 2014). Por meio dos resultados verifica-se a adição de IND e HA na formulação decresce o valor médio de pH, graças ao caráter ácido de ambos os componentes. Contudo, essa alteração não torna o pH demasiadamente ácido e as formulações são viáveis para serem instiladas no olho humano.

6.3 Distribuição de tamanho de partícula e índice de polidispersão

O conhecimento do tamanho das partículas e de sua configuração é importante para que seja definido como o sistema de liberação funciona além da distribuição de seus componentes quando administrado *in-vivo*. Sobretudo, na formulação dos sistemas gelificantes *in-situ*, a mudança de temperatura altera fundamentalmente as propriedades e comportamento de seus constituintes uma vez micelas são transformadas em uma complexa trama polimérica.

Por meio dos resultados (**Figura 14-A** e **Figura 14-B**) verifica-se que nas duas temperaturas avaliadas (25°C e 34°C) existem variações no diâmetro hidrodinâmico médio e no índice de polidispersão (PDI) para as diferentes formulações. O diâmetro hidrodinâmico das micelas a 25°C gira em torno de 10 nm ao passo que em 34 °C é aproximadamente de 20 nm. Tais dados demonstram a característica principal dos poloxâmeros, visto que mediante aumento da temperatura as cadeias poliméricas se dessolvatam, aproximam-se e aumento do diâmetro hidrodinâmico é efeito direto de uma nova configuração (AKKARI et al., 2016). Além disso, partículas que serão administradas no olho não podem exceder 10 µm, a fim de evitar irritações e/ou inflamações adicionais, portanto, em todas as 12 formulações testadas esse limite é obedecido (NEERVANNAN; KOMPELLA, 2021)

Figura 14 – Diâmetro hidrodinâmico médio e PDI das formulações F1- F12 (n = 3) nas temperaturas de 25°C (A) e 34 °C (B).



O PDI é um indicativo de estabilidade importante para caracterização de sistemas nanométricos, haja vista que é uma medida da homogeneidade da distribuição de tamanhos de partícula. De modo geral partículas de tamanho homogêneo possuem características uniformes entre si e uma previsibilidade de comportamento mais apurada em meios biológicos. Os valores de PDI estão por volta de 0,30 e 0,20 para as temperaturas 25°C e 34°C respectivamente. Estima-se

que valores de valores PDI próximos a 0,20 representam distribuição homogênea e unimodal de partículas (ADU-FRIMPONG et al., 2019). Portanto, na temperatura biológica a distribuição das formulações se aproxima de uma distribuição adequada.

Ressalta-se, ainda, que foram feitas múltiplas comparações entre o diâmetro e o PDI entre os grupos e existem diferenças estatisticamente significativas. Contudo, essas diferenças não se mostram em um padrão e por isso, provavelmente estão relacionadas a variações da análise em si e não do comportamento da formulação. Os dados não foram exibidos pelo fato de as comparações múltiplas serem demasiadas (66 comparações múltiplas pós-teste).

6.4 Comportamento reológico

As formulações F3, F6, F9 e F12 foram escolhidas para o estudo de comportamento reológico considerando que tiveram resultados satisfatórios de tamanho de partículas, índice de polidispersão e gelificação próxima a temperatura biológica, segundo teste de inversão de tubo. Além disso, são as formulações com a maior proporção de HA (0,5% p/v), que apresentam maior potencial de mucoadesão da formulação

Além do teste de inversão de tubo existem outras técnicas capazes de identificar de maneira mais precisa a temperatura de transição sol-gel, utilizando propriedades de calorimetria e reologia dos materiais (RAGHAVAN; CIPRIANO, 2005). Essas condições são necessárias no desenvolvimento de formulações de uso ocular com característica de gelificação *in-situ* quando se considera que o incremento no tempo de retenção e na concentração local está relacionado intrinsecamente com a capacidade de gelificação na temperatura correta. Além disso, idealmente o sistema não deve gelificar-se na temperatura ambiente.

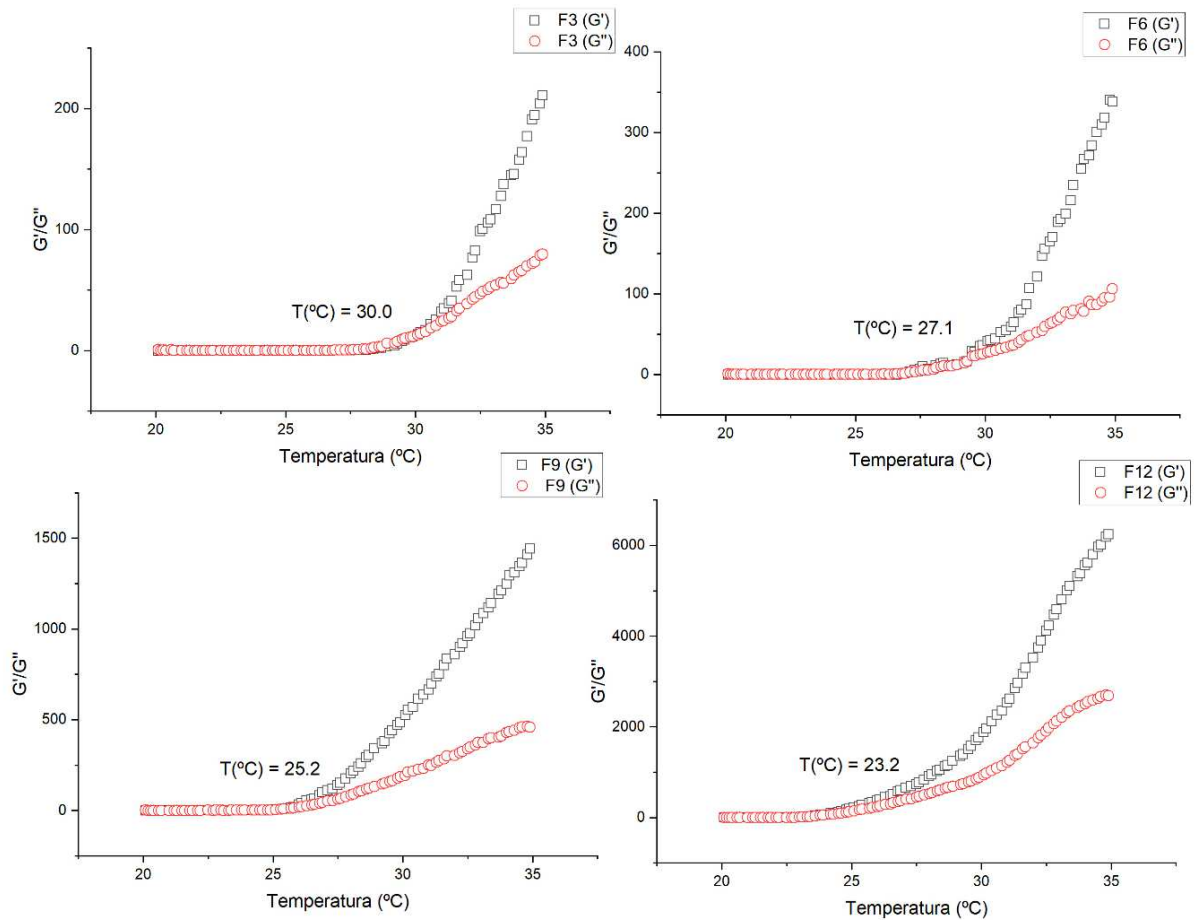
Os materiais, em especial os polímeros, possuem dois módulos principais responsáveis pelo seu comportamento quando deformados: o módulo de armazenamento (G') expressa a energia que é armazenada no material ou recuperada em ciclos de deformação, ao passo que o módulo de dissipação (G'') representa a energia que é dissipada em forma de calor. O comportamento geral de um dado material é composto pela relação entre ambos os módulos. Por exemplo,

um material sólido totalmente elástico teria toda energia da deformação conservada (G'), enquanto um material sem propriedades elásticas teria a energia dissipada em forma de calor (G'') (ALBANO, 2012).

Para os sistemas gelificantes *in-situ* pode-se considerar que em condições de $G'' > G'$ a formulação exibe um comportamento de dissipação mais pronunciado (como os líquidos) e alternativamente, quando $G' > G''$ há predomínio do comportamento elástico (comportamento geral dos sólidos). Assim, é possível mensurar de forma acurada a temperatura de transição de sistemas gelificantes identificando o valor exato em que os módulos se igualam e inicia-se a mudança de comportamento do material. Os ensaios de reologia oscilatória utilizam-se de pequenas oscilações de frequência e uma rampa de aquecimento controlado na faixa de interesse para este fim (DESTRUDEL et al., 2019; PEREIRA GARRASTAZU et al., 2013).

A **Figura 15** demonstra como os módulos G' e G'' de cada uma das formulações se comporta com o aumento de temperatura. Em linhas gerais, para todas as formulações os valores de G'' eram superiores aos de G' até a transição, confirmando o comportamento líquido da formulação em baixas temperaturas. Na medida em que a temperatura era aumentada o módulo G' aumenta e ultrapassa G'' , fato que indica a transição sol-gel. Destaca-se, ainda, que os dois módulos coexistem nos materiais, e o comportamento de um material viscoelástico, como os hidrogéis, é relevante para o aumento do tempo de residência e da concentração do fármaco no local (BALOGLU et al., 2011; GIULIANO et al., 2018).

Figura 15 - Gráficos de reologia demonstrando o comportamento dos módulos G' e G'' com aumento de temperatura para as formulações F3, F6, F9 e F12 ($n = 3$). A temperatura apontada representa a intersecção entre os módulos e gelificação.



Pelos dados obtidos conclui-se que a temperatura de transição é concentração-dependente, ou seja, quanto maior a concentração menor a temperatura necessária para que ela ocorra. Além disso, as temperaturas de gelificação são estatisticamente diferentes entre os grupos ($p < 0,0001$) na comparação realizada em ANOVA *one-way* seguida teste de Bonferroni, na significância de 0,05. Esse achado vai de encontro ao mecanismo de gelificação do K407 já previamente discutido neste trabalho. Ainda, pela análise da **Tabela 5**, conclui-se que os valores obtidos no teste de inversão de tubo e na reologia oscilatória são distintos, com isso a precisão da análise é certamente evidenciada.

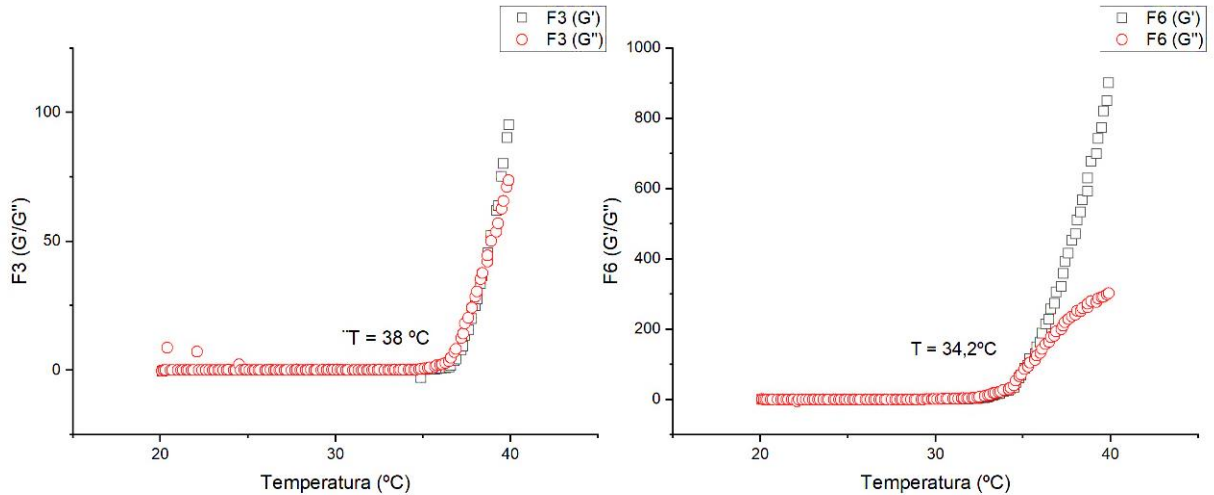
Tabela 5 - Diferença entre os valores de temperatura de gelificação do Teste de inversão de tubo e Reologia oscilatória das formulações F3, F6, F9 e F12 (n=3). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. As comparações entre as médias foram feitas por meio de Teste de T, com nível de significância $p < 0,05$.

Formulação	Temperatura Inversão de Tubo (°C)	Temperatura Reologia oscilatória (°C)	Diferença estatística (p)
F3	33,6 \pm 0,08	30 \pm 0,30	0,000145
F6	32,1 \pm 0,05	27,1 \pm 0,08	<0,000001
F9	30,7 \pm 0,45	25,2 \pm 0,15	0,000145
F12	29,6 \pm 0,09	23,2 \pm 0,12	<0,000001

As formulações F9 e F12 têm temperaturas de gelificação próximas a temperatura ambiente e por isso foram descontinuadas do estudo, considerando que em condições ambientais estas podem potencialmente gelificar-se dificultando a utilização da formulação.

A considerar a complexidade do olho humano como alvo de terapêuticas deve-se levar em conta a diluição da formulação no filme lacrimal, pois há impacto na concentração dos constituintes e finalmente na temperatura de gelificação. Dessa forma, os dados da **Figura 16** exibem a temperatura de sol-gel das formulações F3 e F6 quando diluídas na proporção 7:30 (v/v), correspondente ao volume do filme lacrimal (7 μ L) e o volume usual de uma gota de colírio (30 μ L) (DESTRUEL et al., 2019). A temperatura de F3 foi de 38°C, enquanto F6 teve temperatura igual a 34,2°C. Finalmente F6 foi a formulação escolhida para seguir as próximas etapas do desenvolvimento por apresentar temperatura de gelificação compatível com o olho humano.

Figura 16 - Gráficos de reologia demonstrando o comportamento dos módulos G' e G'' com aumento de temperatura para as formulações F3 e F6. A temperatura apontada representa a intersecção entre os módulos e gelificação.



6.5 Viscosidade das formulações

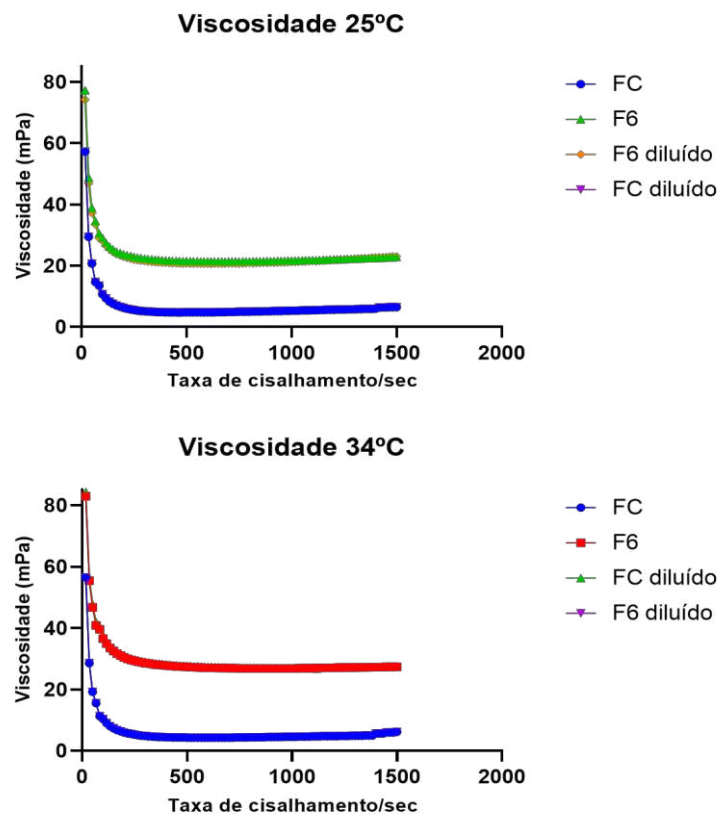
As formulações de uso ocular devem ter características adequadas de viscosidade com o intuito de facilitar a aplicação da formulação na superfície ocular, assim como evitar efeitos indesejáveis como irritação ou visão borrada. Mas ao mesmo tempo, devem ser viscosas o suficiente para se manter na superfície ocular sem que sejam rapidamente eliminadas pela drenagem lacrimal ou movimentos oculares do paciente. O equilíbrio entre estes fatores é crucial para o desenvolvimento da formulação.

Dessa forma foram selecionadas condições que emulassem o contato de F6 e de uma formulação comercial (FC) contendo indometacina conforme abaixo e a viscosidade avaliada por reologia oscilatória.

- 1) Diluição das formulações para simular o fluído lacrimal;
- 2) Temperaturas de 25°C e 34°C para simular a temperatura ambiental e fisiológica do olho humano;
- 3) Aumento da taxa de cisalhamento até 1500 cm^{-1} a fim de simular o movimento executado pelas pálpebras quando o olho humano se movimenta (movimentos laterais e verticais).

Na literatura são encontradas informações acerca da viscosidade ideal de formulações de uso ocular. Estima-se que o fluido lacrimal tenha a viscosidade média de 1,5 mPa. Portanto, a viscosidade das formulações deve ser superior a esse valor para uma retenção satisfatória, contudo deve limitar-se a aproximadamente 100 mPa para que não ocorram efeitos indesejados e potencialmente deletérios (MAZET et al., 2020). O valor máximo de viscosidade de FC foi de 57,25 e 56,48 mPa nas temperaturas de 25° e 34°C respectivamente. Paralelamente, a F6 exibiu valores máximos de viscosidade de 77,33 e 82,96 mPa nas mesmas temperaturas. Conclui-se que nenhuma das formulações (**Figura 17**) nas condições testadas superam o valor limite de viscosidade. Ademais, não houve diferença relevante de viscosidade nas condições de formulações diluídas.

Figura 17 - Gráficos de viscosidade de FC e F6, com e sem diluição, nas temperaturas de 25 e 34°C.



Idealmente as formulações de uso ocular devem apresentar padrão de viscosidade não-newtoniano, ou seja, com o aumento do cisalhamento no sistema a viscosidade decresce proporcionalmente. Isso justifica-se pelo fato de as formulações exibirem elevada viscosidade quando o olho não oferece cisalhamento,

potencializando a manutenção da formulação. Contudo, ao ser exercida deformação essa fica menos viscosa e pode ser removida da superfície ocular sem maiores problemas (DESTRUDEL et al., 2019). Assim, é possível concluir pelo perfil exponencial decrescente dos gráficos de ambas as formulações que os menores valores de viscosidade foram atingidos nas maiores taxas de cisalhamento e, portanto, ambas as formulações possuem tal comportamento.

6.6 Microscopia de Luz Polarizada

A técnica de microscopia de luz polarizada é capaz de analisar finas camadas de amostras com materiais refringentes por meio de dois polarizadores cruzados acoplados ao microscópio. O estado estrutural e organização dos constituintes da amostra frente a luz polarizada pode ser indicativo de interações ou mudanças físicas entre os materiais (DE OLIVEIRA, 2011). Dessa forma, essa técnica é utilizada de maneira ampla em formulações nanométricas de cristais líquidos com o objetivo de compreensão da distribuição de componentes e sua organização geral (ARAÚJO et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2019).

Aproveitando-se das funcionalidades dessa técnica foram submetidas para análise em aumento de 10x e 20x amostras de F6 e de FC, que é declarado como sendo uma solução de IND pelo fabricante. De forma macroscópica ambas se apresentam como líquidos transparentes de tom amarelado, com viscosidades distintas.

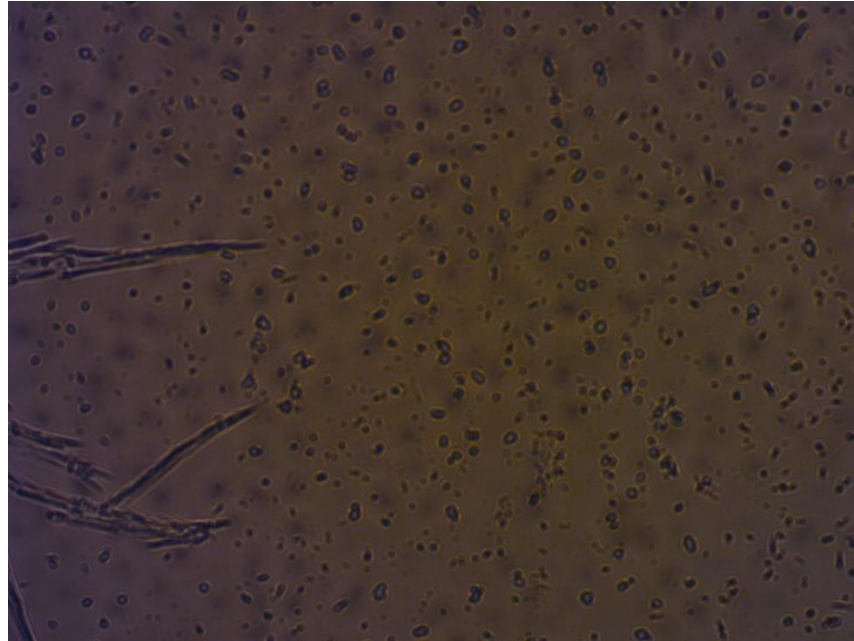
Na **Figura 18-A** é evidente a presença de várias pequenas estruturas distribuídas de forma homogênea por todo campo da micrografia, e paralelamente, quando submetido o campo escuro na imagem **18-B** é possível observar a presença de material refringente, provavelmente correspondente a cristais de IND que não estão incluídos na estrutura micelar. Avaliando-se FC (**Figura 18-C**) são identificadas estruturas alongadas de perfil cristalino e não se observa a presença de estruturas micelares, apenas pequenos fragmentos de aspecto cristalino. Na imagem de campo escuro (**Figura 18-D**) há uma intensa refringência do material cristalino, diferentemente da formulação F6. Tais evidências sugerem que há uma fração substancial do fármaco na formulação comercial não solubilizado.

Figura 18 - Fotografias obtidas por microscopia de luz polarizada no aumento de 10x. As imagens (A) e (B) representam F6 nos campos claro e escuro. Da mesma forma, (C) e (D) para FC.



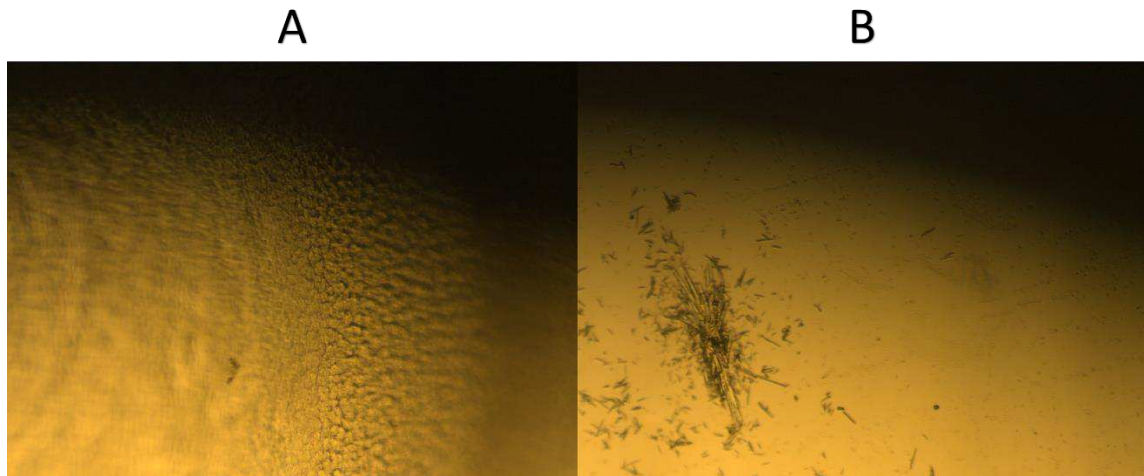
Na análise da F6 (**Figura 19**) no aumento de 20x foi possível identificar estruturas esféricas com centro escurecido, indicativo da formação de estruturas micelares distribuídas de maneira homogênea.

Figura 19 - Fotografia obtida por microscopia de luz polarizada de F6 no aumento de 20x.



As formulações foram aquecidas até aproximadamente 34°C após a disposição em lâminas de microscópio e as imagens da **figura 20-A e B** foram obtidas. Na formulação F6 estão evidentes as cadeias poliméricas que formam uma trama na imagem obtido pelo microscópio, e de forma macroscópica são vistas como um gel firme. Contudo, a FC, por não ter propriedades de gelificação apresenta-se sem alterações relevantes, conforme pode ser observado na imagem.

Figura 20 - Fotografias obtidas por microscopia de luz polarizada no aumento de 10x de F6 (A) e FC (B) após aquecimento de 34 °C.

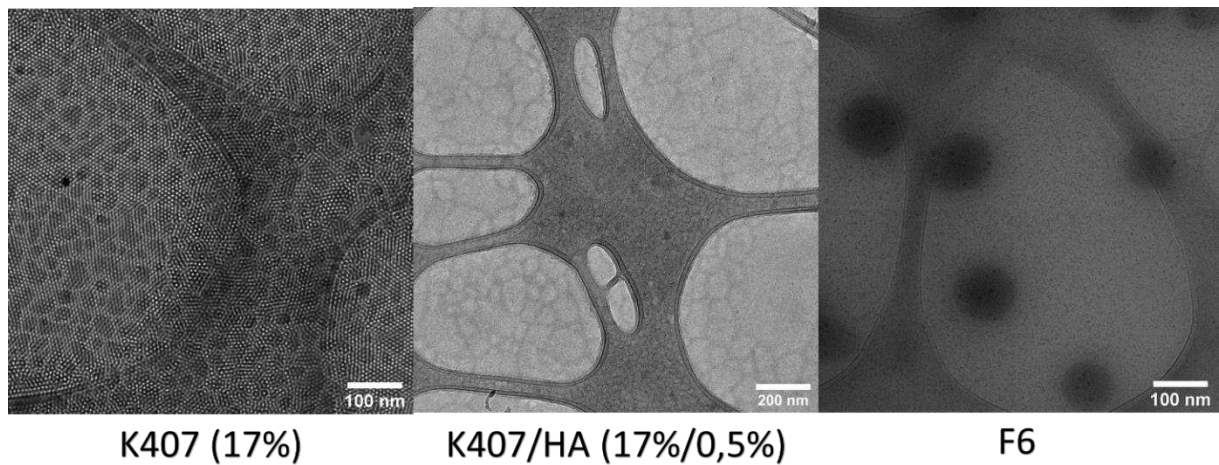


6.7 Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Crio-MET)

As delicadas e nanométricas estruturas micelares necessitam de técnicas sofisticadas, como a microscopia eletrônica, para avaliação de sua morfologia e tamanho com a devida precisão. Resumidamente, nas diferentes modalidades de microscopia eletrônica, a imagem é formada mediante a incidência de um feixe de elétrons na amostra, interpretada por diferentes detectores, fornecendo características de superfície com elevada resolução. A Crio-MET é sugerida como uma alternativa vantajosa a despeito de seu custo e complexidade, é capaz de excelente resolução de imagem e não requer a desidratação da amostra como em outras técnicas de microscopia. Portanto, possibilita-se a avaliação da amostra nativa da solução micelar, sem qualquer alteração e com baixa radiação empregada (GHEZZI et al., 2021).

A organização das micelas de K407 é fortemente influenciada tanto pela concentração da solução quanto pelas condições de preparo da amostra submetida a crio-MET. É reportado na literatura que as amostras de concentrações entre 10% - 20% w/v arranjam-se em micelas com limites bem definidos e organização supramolecular hexagonal (LAURA et al., 2020). Tais características podem ser observadas na **Figura 21**, referente a micrografia da solução de K407 (17% w/v) como utilizada na F6, em que as micelas estão bem definidas, circulares e aparentemente organizadas em formato hexagonal.

Figura 21 - Micrografias obtidas na técnica de Crio-MET dos componentes e de F6.



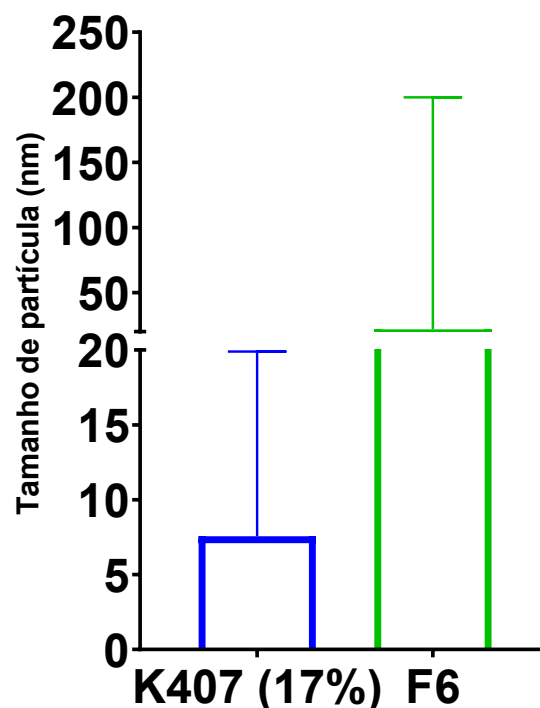
Adicionalmente, é importante compreender como todos os constituintes da formulação (K407/HA/IND) interagem e se organizam para racionalizar o modo de liberação do fármaco, eventuais interações com sistemas biológicos, dentre outros. Alguns trabalhos realizados com polímeros também anfífilicos avaliam tal característica do sistema desenvolvido. Por exemplo, em estudo envolvendo formulação contendo o copolímero de polietilenoglicol (PEG)/poli (sulfureto de propileno) contendo ciclosporina A e o copolímero de PEG/poli (ϵ -caprolactona), foi observado que as micelas se apresentavam circulares ou em formato alongado com variados tamanhos a depender da proporção dos polímeros (VELLUTO; DEMURTAS; HUBBELL, 2008). Outro trabalho encontrado na literatura empregando copolímeros constituídos de diferentes proporções de PEG e derivados dos acrilatos (n-butil e benzil) contendo dexametasona descreve a presença micelas arredondadas divididas em camadas e núcleo escurecido, relacionado a presença do fármaco (JANAS et al., 2016).

A **Figura 21** exibe as micrografias obtidas de K407/HA e de F6, respectivamente. Na primeira pode-se notar a perda do padrão característico da solução de K407 isolada. São formadas estruturas arredondadas maiores distribuídas de forma homogênea e com os limites menos bem definidos. A mudança no padrão provavelmente está relacionada a interação entre o K407 e HA, haja vista que por suas estruturas conseguem realizar diversas ligações de hidrogênio, alterando a distribuição micelar. Posteriormente, com a introdução de IND nota-se mudança completa na distribuição, sendo observada a presença de estruturas

circulares maiores escurecidas com um ou vários pontos distribuídos em sua região central, indicativo a capacidade de interação da porção hidrofóbica de K407 com a IND, protegendo-a do meio hidrofílico. Além disso, observa-se um aro menos perceptível ao redor dessa estrutura, provavelmente relacionado ao HA, que interage com a porção hidrofílica do K407. Por fim, estruturas menores de variados tamanhos estão amplamente distribuídas pela micrografia.

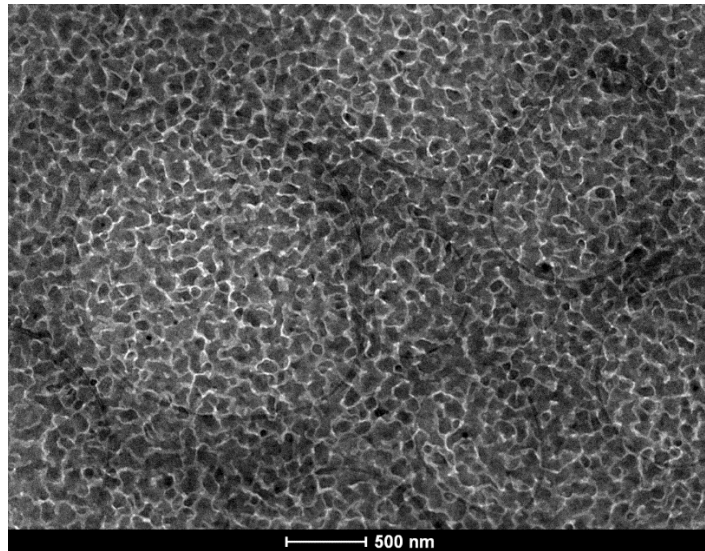
Além disso, os valores de tamanho médio de partícula das micelas de K407 (7,56 nm) corresponde com valores identificados na literatura (próximo a 10 nm de diâmetro médio) (LAM; GOLDBECK-WOOD, 1999). O tamanho médio de partículas da formulação F6 (21,86 nm) e a presença de micelas de tamanhos maiores apresenta boa correlação com valores de outras micelas poliméricas com polímeros anfifílicos (**Figura 22**), que pode variar de 20 a 500 nm (FAIRLEY; HOANG; ALLEN, 2008; JANAS et al., 2016; VELLUTO; DEMURTAS; HUBBELL, 2008). Os valores diferem das análises de DLS por duas principais razões: (1) diluição prévia da amostra na técnica de espalhamento da luz, e (2) medição do diâmetro hidrodinâmico das partículas, e não o diâmetro físico.

Figura 22 - Tamanho de partículas (nm) do poloxâmero K407 em solução e formulação F6.



Finalmente, analisou-se também por Crio-MET a forma liofilizada de F6 após ressuspensão com 1,0 mL de PBS. A configuração é fundamentalmente diferente visto que não ocorrem estruturas micelares mais escurecidas e maiores, mas há distribuição homogênea de estruturas quase circulares e de formatos variados (**Figura 23**). Maior compreensão sobre esse a formulação no estado liofilizado ainda é necessária.

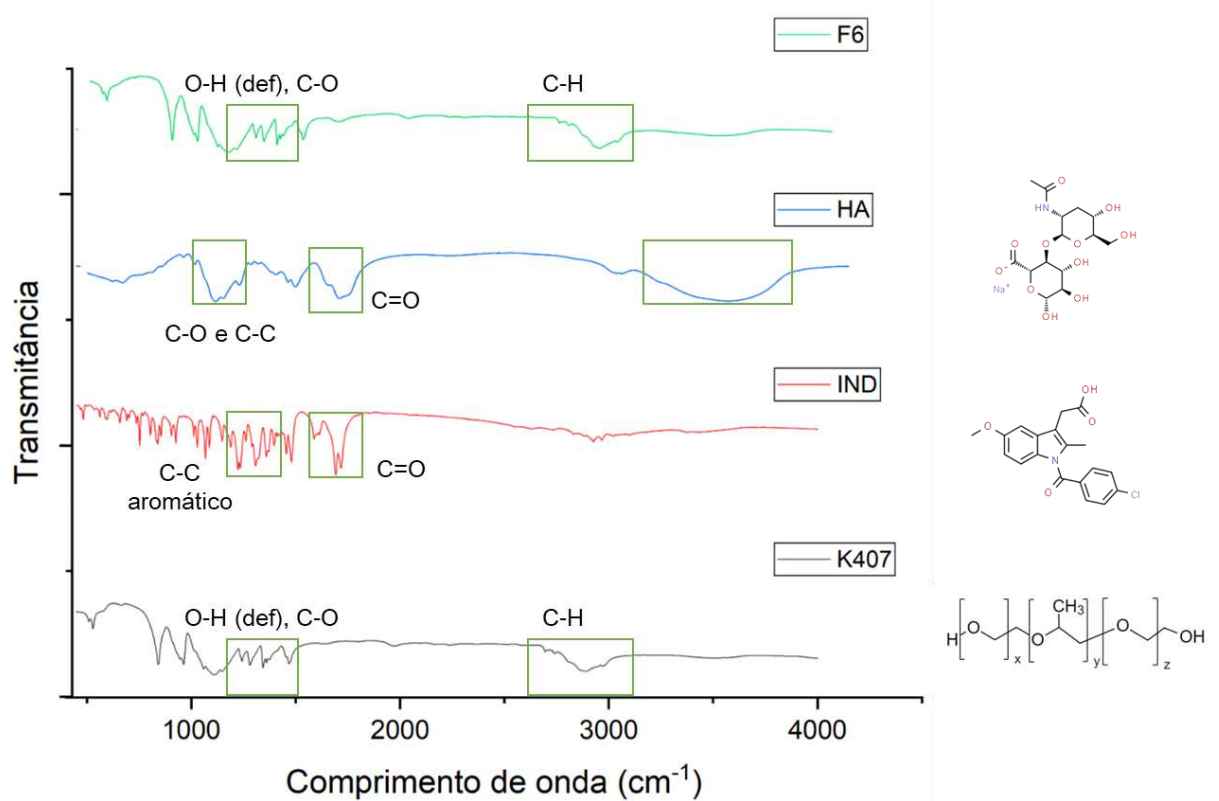
Figura 23 - Fotomicrografia de F6 liofilizada, obtida por Crio-TEM.



6.8 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os resultados de FTIR dos componentes da formulação são demonstrados na **Figura 24**. Para o polímero (K407) identifica-se intensa banda por volta de 2800 cm^{-1} referente a estiramento do grupo C-H alifático, assim como bandas por volta de 1300 e 1200 cm^{-1} correspondentes a deformação da ligação O-H e estiramento C-O respectivamente. Padrão de bandas semelhante ao que foi demonstrado na literatura (GARALA et al., 2013).

Figura 24 - Espectros de transmitância no infravermelho dos componentes K407 (linha preta), IND (linha vermelha), HA (linha azul) e F6 (linha verde) nos comprimentos de onda de 0 a 4000 (cm^{-1})



A molécula de IND é um derivado do ácido-indólico com funções químicas bastante características. Existem duas proeminentes bandas por volta de 1700 cm^{-1} correspondente as ligações $\text{C} = \text{O}$ do grupo carbonila do ácido carboxílico e amida em sua molécula (EWING; CLARKE; KAZARIAN, 2014). Seu espectro exhibe várias bandas na região entre 1200 e 1500 cm^{-1} relacionadas ao estiramento das ligações $\text{C}-\text{C}$ de carbonos aromáticos (SOLTANI; NABIPOUR; NASAB, 2017).

O espectro do HA exhibe bandas na região de 3500 cm^{-1} características do estiramento de ligações $\text{N}-\text{H}$ e $\text{O}-\text{H}$ presentes em abundância na molécula. Na região de 1700 cm^{-1} estão presentes bandas de estiramento simétrico e assimétrico da ligação $\text{C} = \text{O}$. Bandas correspondentes a ligações $\text{C}-\text{O}$ e $\text{C}-\text{C}$ estão presentes na região entre 1000 e 1200 cm^{-1} (PAN et al., 2016).

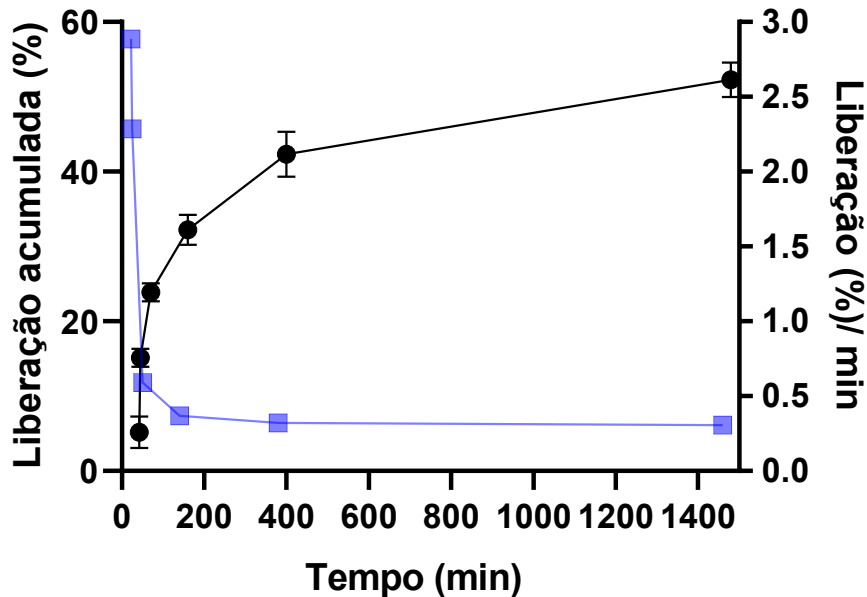
Percebe-se que o padrão do espectro de F6 possui bandas de maior intensidade na região de 2800 cm^{-1} e entre $1200 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ referindo-se ao estiramento da ligação $\text{C}-\text{H}$ alifática e a deformação $\text{O}-\text{H}$ e estiramento $\text{C}-\text{O}$, de

maneira similar ao K407. Considerando que o poloxâmero é o material em maior concentração na formulação o resultado obtido condiz com o que se espera do padrão espectroscópico da formulação. Ademais, não são evidenciadas bandas anômalas ou eventuais grupos funcionais não esperados, e por isso, sugere-se que os componentes da formulação são estáveis quando na presença dos demais.

6.9 Liberação *in-vitro*

De forma geral, os estudos de liberação *in-vitro* servem para compreensão do perfil de liberação do fármaco contido no sistema antes da formulação ser submetida aos testes *in-vivo*. Para sistemas gelificantes *in-situ* existe a possibilidade da realização de testes sem membrana, aproveitando-se da propriedade gelificante mediante aquecimento. Conforme a **Figura 25** constatou-se liberação inicial de IND nos primeiros minutos avaliados até 1440 min (24 horas) atingindo $52 \pm 1,3\%$ de liberação acumulada. Ao extrair-se o restante do gel com acetonitrila foi identificada quantidade de fármaco correspondente a $36 \pm 0,8\%$ do fármaco, totalizando $88 \pm 2,1\%$ do conteúdo total entre fármaco liberado no meio e retido no gel. A variação de aproximadamente 12% em relação ao conteúdo total identificada pode ser explicada por um processo de extração que necessita de melhorias.

Figura 25 - Porcentagem de liberação acumulada (linha preta) e liberação (%) / min (linha azul) de F6, no teste de liberação in-vitro (n=2).



Considerando o perfil de liberação observado, verificou-se que a taxa de liberação do fármaco é maior no começo do teste (*burst release*) e diminui com o passar do tempo. O conteúdo de hidrogéis é liberado por meio de difusão do fármaco, e tal processo é governado pelo gradiente de concentração que exerce força suficiente para que rompidas interações entre o fármaco e o polímero (LI; MOONEY, 2016). Portanto, uma liberação acelerada no início do processo e posterior redução condiz com o mecanismo de liberação.

Perfil de liberação semelhante já foi relatado em formulações com poloxâmeros e fármacos hidrofóbicos como paclitaxel e progesterona atingindo liberações que se estendem de 14 até 48 horas (BERMUDEZ; GRAU, 2016; NIE et al., 2011). Além disso, sistemas gelificantes baseados em alginato e carbopol (induzidos por alterações no pH) contendo IND liberaram fármaco por até 8 horas (HIPALGAONKAR et al., 2013b; KUMAR et al., 2003). Utilizando o mesmo polímero com HA, outro estudo evidenciou a liberação de aciclovir com pico de concentração em aproximadamente 7 horas (MAYOL et al., 2008). GIULIANO e colaboradores (2020) identificaram a concentração máxima de rutina após 72 horas de liberação. Considerando os sistemas com IND, há uma aparente melhoria no perfil de liberação, visto que a liberação ultrapassa 24 horas.

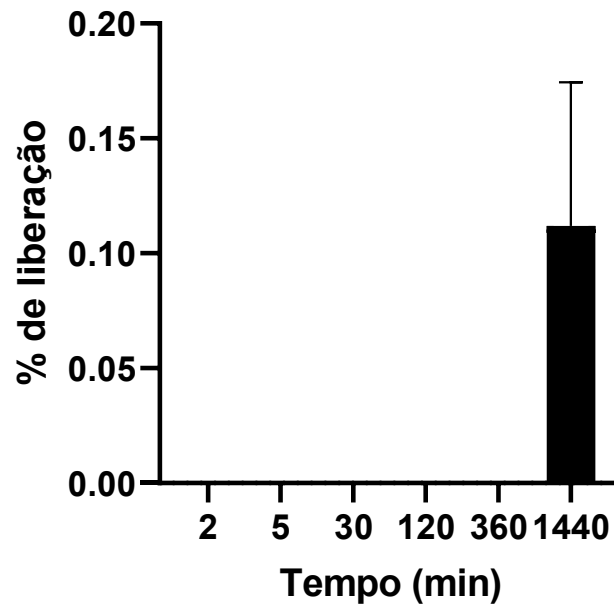
6.10 Teste de Penetração Ocular

A **Figura 26** mostra a porcentagem que foi capaz de ultrapassar a córnea de porco, ao longo do tempo, no teste de penetração ocular executado com auxílio de célula de Franz. Imediatamente nota-se que nenhum fármaco ultrapassa a estrutura e apenas após 24 horas (1440 min) é identificada alguma concentração de IND ($0,11 \pm 0,06\%$) no compartimento receptor. Tal evidência indica que a formulação F6 apresenta boa retenção na córnea.

Posteriormente, foi realizada extração das córneas utilizadas no estudo, as quais foram maceradas na presença de acetonitrila com auxílio de gral e pistilo. O material resultante foi analisado através de RP-CLAE e obteve-se $74,08 \pm 7,16\%$ do conteúdo total. Entende-se que a grande maioria da formulação ficou aderida a córnea, o que é um indicativo relevante da sua capacidade mucoadesiva e na manutenção da concentração local do fármaco. Assim como no teste de liberação sem membrana, a concentração total de 100% não foi atingida, provavelmente por conta do processo de extração da córnea, que precisa ser mais eficiente.

É importante ressaltar que esse é um teste *in-vitro* que não é capaz de reproduzir todas as características do olho humano. Dessa forma, sugere-se que a penetração ocular será menor ainda em humanos, considerando toda a dinâmica do local de aplicação (drenagem naso-lacrimonal, absorção sistêmica, conteúdo enzimático e proteico).

Figura 26 - Porcentagem de penetração de IND no teste de penetração ocular realizado em célula de Franz (n =2).



7. CONCLUSÃO

As caracterizações realizadas demonstraram que o sistema obtido é capaz de solubilizar o fármaco, assim como gelificar-se em temperatura fisiológica. O tamanho de partículas e índice de polidispersão indicaram tamanho de micelas e estabilidade satisfatórias para o sistema em temperatura ambiente e fisiológica. Além disso, o pH das formulações é próximo ao fisiológico, tornando-a compatível com a via de administração pretendida.

A temperatura de gelificação e viscosidade foram testados em condições de diluição, cisalhamento e diferentes temperaturas, que simularam o olho humano com a obtenção de resultados satisfatórios e que permitiram a escolha de uma formulação ideal. A técnica de microscopia de luz polarizada permitiu a visualização de micelas arredondadas na temperatura ambiente e uma complexa trama polimérica na temperatura de gelificação, comportamento bastante distinto em relação à FC. Além disso, micrografias obtidas por crio-MET evidenciaram a dinâmica das micelas de K407 em conter o fármaco hidrofóbico em seu centro, bem como possibilitou cálculo do tamanho de partículas com maior precisão. Por meio da análise de FTIR concluiu-se que os componentes do sistema são compatíveis entre si, sem reações ou incompatibilidades inesperadas.

No teste de liberação *in-vitro* observou-se que o perfil de liberação de F6 é controlado, semelhante ao perfil de outras formulações descritas na literatura com liberação acumulada de aproximadamente 52% em 24 horas, que ainda pode se estender. Também, o mecanismo de liberação principal do fármaco é a difusão entre as cadeias poliméricas, assim como se espera de sistemas gelificantes *in-situ*. Pelos resultados de penetração ocular, apenas uma pequena fração (0,11%) foi capaz de atravessar a córnea durante um período de 24 horas.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E EFICÁCIA DO SISTEMA GELIFICANTE *IN-SITU* CONTENDO ÁCIDO HIALURÔNICO E INDOMETACINA

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Materiais

A indometacina (IND) foi adquirida da Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brazil) e o HA, na forma de Hialuronato de Sódio (8 a 200 KDa), foi obtido da Contipro® (República Tcheca). O Kollidon 407 (K407) foi gentilmente cedido pela BASF® (São Paulo – Brasil) e a água ultrapura utilizada durante os processos foi produzida por sistema Milli-Q® (Millipore, Massachusetts, EUA). A formulação comercial (FC) utilizada: um colírio contendo indometacina a 0,1% p/v, foi adquirido da Chauvin - Bausch Lomb (Montpellier, França). Ainda, hidróxido de sódio, cloreto de sódio, fosfato de sódio bibásico anidro e fosfato de potássio monobásico anidro foram obtidos pela Synth (Brasil). Além disso, fluoresceína sódica 1,0% foi adquirida pela Ophthalmos® (São Paulo, Brasil), cloridrato de cetamina (Dopalen®, Ceva, Brasil) cloridrato de xilazina (Xilazin®, Syntec, Brasil) e cloridrato de proximetacaína (Anestalcon, Novartis – Brasil). Todos os outros produtos químicos e reagentes utilizados no estudo eram de grau analítico.

1.2 Animais

Foram utilizados 15 coelhos machos da raça Nova Zelândia, com idade entre 2 e 3 meses e peso aproximado de 2,0 – 3,0 Kg, obtidos na Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa (Igarapé, MG, Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o período do experimento. A priori, ocorreu um período de adaptação de análise clínico-veterinária de 15 dias, em que foram mantidos em ciclo de claro/escuro de 12 horas com água e ração *ad libitum*. O estudo foi devidamente aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) sob o número nº 028/2021.

1.3 Teste de biocompatibilidade ocular (HET-CAM)

A biocompatibilidade ocular da formulação otimizada (F6) foi avaliada por meio do ensaio em membrana corioalantóica (CAM) de embriões de galinha da espécie *Gallus domesticus*. Foram incubados 30 ovos (10 para cada componente testado) em uma chocadeira automatizada (Premium Ecológica, Brasil) a 37 ± 1 °C e

60 ± 1% de umidade relativa por 7 dias. No oitavo dia a casca dos ovos foi aberta adjacente à câmara de ar e a membrana interna foi cuidadosamente removida com o auxílio de pinças e umidificação com PBS, sem interferir na delicada membrana corioalantóica dos ovos.

Posteriormente, foram aplicados 100 µL na superfície da CAM de cada um dos seguintes componentes: (1) solução salina (NaCl 0,9% p/v) como controle negativo; (2) NaOH 0,1 M como controle positivo; (3) F6. Após a aplicação, cada um dos ovos foi monitorado individualmente em estereomicroscópio nos períodos de 0; 0,5; 2 e 5 minutos. Fotos foram obtidas de cada um destes momentos para avaliação da biocompatibilidade.

Os efeitos imediatos de hiperemia, hemorragia e coagulação foram avaliadas em cada um dos tempos. A intensidade das reações foi avaliada de forma semiquantitativa em uma escala de 0 (nenhuma reação) e 3 (reação intensa). O índice de irritação ocular (IIO) foi calculado conforme a equação:

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

O termo *h* se refere ao tempo em segundos do início da hemorragia, *l* à lise e *c* ao tempo da coagulação. A seguinte classificação foi utilizada para avaliação dos componentes testados:

- IIO ≤ 0,9: não irritante
- 0,9 < IIO ≤ 4,9: moderadamente irritante
- 4,9 < IIO ≤ 8,9: irritante
- 8,9 < IIO ≤ 21: severamente irritante

1.4 Indução de lesão química alcalina na córnea

A indução de lesão química alcalina em animais frequentemente é executada utilizando-se um papel de filtro embebido em NaOH, que é posicionado de maneira centralizada na córnea. A concentração do agente alcalino as dimensões do papel

de filtro e o tempo de exposição variam com a intensidade da lesão proposta e o objetivo final do estudo. Lesões mais graves, as quais precisam de meses para serem totalmente recuperadas, utilizam concentrações maiores de NaOH (2 M) e tempo de contato próximo a 120 segundos (GAO et al., 2016; KANG et al., 2019). Objetiva-se neste estudo compreender a recuperação tecidual na fase imediata (< 7 dias) da lesão alcalina, por isso, optou-se por utilizar a concentração de 1 M, tempo de exposição de 30 segundos e diâmetro de 10 mm do papel de filtro.

Após a aclimatação, todos os animais foram submetidos a indução de lesão química alcalina em seu olho direito. Anteriormente a exposição, todos os animais estavam sob anestesia geral, induzida por 50 mg/kg de cloridrato de cetamina e 15 mg/kg de cloridrato de xilazina, administrados intramuscularmente, assim como anestesia local com instilação de cloridrato de proximetacaína no olho direito.

Para cada animal um papel de filtro foi colocado em solução de NaOH (1 M) com auxílio de uma pinça durante 30 segundos, com remoção do excesso ao findar do tempo. O papel embebido foi posicionado na porção central da córnea durante 30 segundos e removido gentilmente. Imediatamente após a remoção do papel de filtro os olhos foram irrigados com solução salina estéril por 5 minutos para remoção de todos os resíduos químicos restantes.

Posteriormente os animais foram aleatoriamente designados para três grupos: (1) Grupo não-tratado (NT); (2) F6; (3) Formulação Comercial (FC). Para os grupos tratados realizou-se a instilação de 100 µL a cada 24 horas, iniciado a partir da lesão. Os olhos contralaterais dos animais foram considerados o grupo controle para as análises realizadas.

1.5 Acompanhamento da regeneração da córnea

O acompanhamento da recuperação epitelial da córnea foi realizado instilando uma gota de fluoresceína no olho lesionado sob a iluminação de luz azul-cobalto de uma lâmpada de fenda (Apramed HS5, Brasil) e fotografias foram obtidas. A área da lesão foi medida e comparada entre os grupos através do software ImageJ (Versão 1.49; National Institutes of Health, EUA). A progressão da recuperação do estroma foi pautado no sistema de classificação da opacidade da

córnea (**Tabela 6**) conforme já realizado na literatura (GOSWAMI et al., 2019). Os acompanhamentos, além da avaliação inicial, foram realizados no 1º, 3º, 5º e 7º dias após a indução da lesão alcalina.

Tabela 6 - Score de opacidade da córnea.

Score	Definição
0	Córnea transparente
1	Perda mínima da transparência
2	Perda moderada de transparência (íris e pupila visíveis)
3	Perda severa da transparência da córnea (íris ou pupila visíveis)
4	Perda difusa da transparência (íris e pupila não visíveis)

1.6 Tomografia de coerência óptica (OCT)

Utilizou-se o equipamento Spectralis HRA+OCT (Heidelberg Engineering, Alemanha) para obtenção de imagens da estrutura da córnea dos animais. Foram obtidas imagens volumétricas do centro da lesão química, calculando-se a espessura total do tecido e sua aparência nos intervalos pré-lesão, 0, 1, 3, 5, 7 dias após a indução da lesão no olho direito dos animais. O olho contralateral foi utilizado como grupo controle.

1.7 Histologia

Após 7 dias da indução da lesão química alcalina os animais foram anestesiados e eutanasiados com sobredose de tiopental sódico (90 mg/Kg). Seus

olhos foram enucleados e fixados em solução de Davidson (duas partes de formalina tamponada com fosfato neutro, três partes de etanol 95%, uma parte de ácido acético glacial e três parte de água ultrapura) por 24 horas. Posteriormente, os olhos foram mantidos em etanol 70% por mais 24 horas. Ao final deste período, os olhos foram cortados de forma sagital, embebidos em parafina, e cortes de 4 μm realizados no tecido. Finalmente os tecidos foram corados com hematoxilina/eosina e a análise das lâminas se deu em microscópio ótico (Zeiss®, Model Axio Imager M2).

1.8 Análise estatística

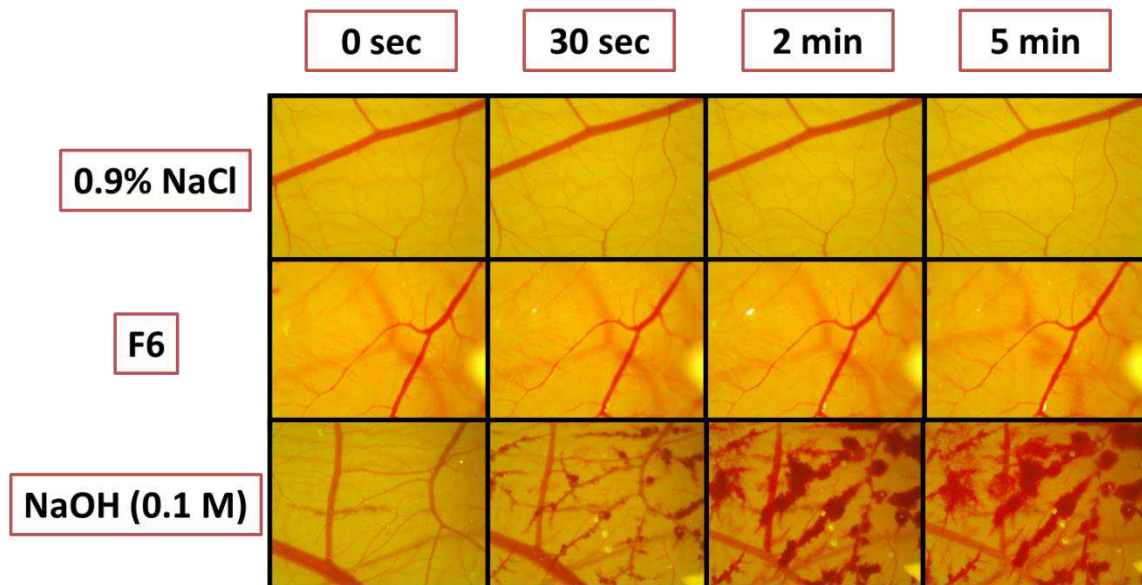
Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e foram analisados por meio da análise de variância *two-way* (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 8.4.3 (San Diego, Califórnia, EUA).

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Teste de biocompatibilidade ocular (HET-CAM)

A biocompatibilidade da formulação F6 foi testada frente ao controle negativo (solução NaCl 0,9%) e ao controle positivo (NaOH 0,1 M). Na **Figura 27** são exibidas as fotos obtidas para cada grupo testado nos diferentes tempos, variando de 0 até 5 minutos.

Figura 27 - Imagens representativas do teste de HET-CAM durante 5 minutos, entre os grupos testados (n = 10).



Observa-se que não houve qualquer evento de hiperemia, hemorragia ou coagulação para a formulação F6. Esse achado vai de encontro com as evidências da literatura, visto que os poloxâmeros (K407) são notoriamente atóxicos e exibem perfil de segurança adequado para o segmento anterior, assim como o HA que é uma molécula endógena do organismo, e naturalmente, atóxica (LIAO et al., 2005). Conforme já mencionado anteriormente a IND é segura para ser utilizada em formulações de uso ocular (GAYNES; FISCELLA, 2002), sobretudo, em uma formulação em que ela está protegida do meio externo por micelas, conforme demonstrado nos estudos de microscopia de luz polarizada e criomicroscopia descritas neste trabalho.

Conforme esperado o grupo correspondente ao controle negativo (solução salina) não demonstrou qualquer evento que remetesse a toxicidade aguda, ao passo que o controle positivo (NaOH 1 M) efetivamente teve ocorrência de hiperemia, hemorragia e coagulação. Os resultados de todos os grupos são apresentados na forma de *score* conforme a **Tabela 7**.

Tabela 7 - Resultados do teste HET-CAM. Os resultados são mostrados como média \pm desvio padrão (n = 10).

Grupo testado	IIO	Classificação de irritação
Controle negativo (NaCl)	$\leq 0,9 \pm 0,0$	Não irritante
F6	$\leq 0,9 \pm 0,0$	Não irritante
Controle positivo (NaOH)	$16,84 \pm 0,29$	Severamente irritante

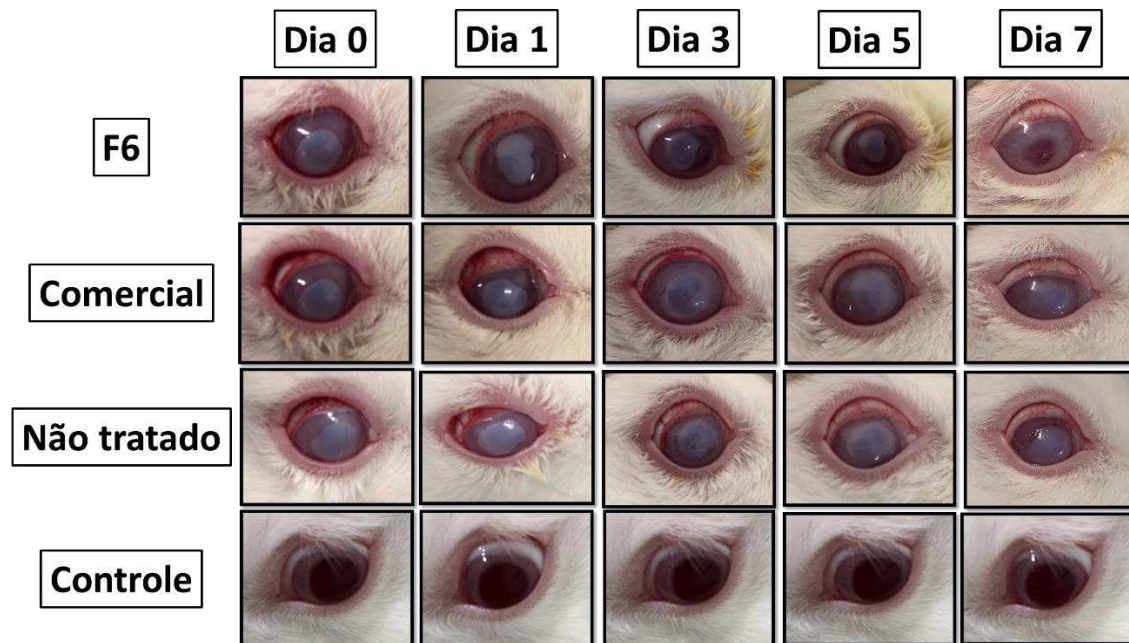
2.2 Indução de lesão alcalina e recuperação da lesão

A utilização de coelhos como modelo animal em doenças oculares é frequente, considerando as similaridades em dimensões estruturais da córnea com os humanos (JUE; MAURICE, 1986), assim como na dinâmica de movimentação celular, padrão de cicatrização e transformação celular no estroma da córnea (STEPP et al., 2011). O tamanho do globo ocular e a área disponível facilitam a visualização de alterações superficiais e realização de testes diagnósticos, como a marcação com fluoresceína (HUANG et al., 2021).

As fotos do “dia 0” na **Figura 28** demonstram êxito na indução do modelo de lesão química alcalina na metodologia proposta, com região opaca de aproximadamente 10 mm, circular e bem delimitada ao papel de filtro inicial. A ausência da necrose de tecidos vizinhos indica que a etapa de remoção do agente com PBS (pH 7,4) e normalização da superfície córnea foi bem-sucedida na contenção inicial. Além disso, não há envolvimento do limbo ou conjuntiva na lesão, portanto, pode ser classificada como lesão de grau I na escala Dua. Com isso, garante-se um bom prognóstico (DUA et al., 2020). Os resultados obtidos no desenvolvimento do presente modelo convergem com resultados obtidos na

literatura, em que a concentração de 1 M e o tempo de contato de 30 segundos foram satisfatórios para compreensão da fase imediata de recuperação da córnea (BASHKARAN et al., 2011).

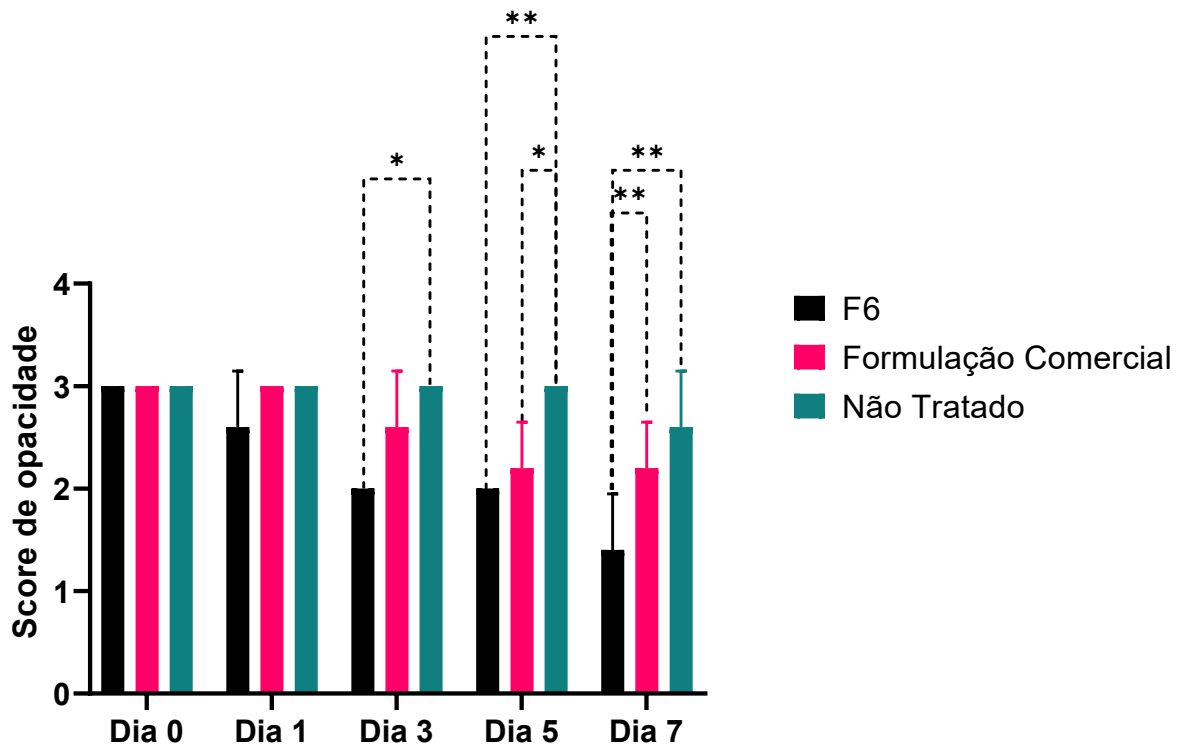
Figura 28 - Acompanhamento de opacidade da córnea entre os grupos, após indução de lesão alcalina (n = 5).



Conforme mencionado, a opacidade da córnea corresponde ao dano no estroma, ou seja, o agente alcalino teve exposição suficiente para remover a camada epitelial, invadir porções mais internas do tecido e, com isso, acontece a precipitação de componentes proteoglicanos, resultando na opacidade da córnea. Utilizando o sistema de score da opacidade de córnea entende-se que inicialmente todos os grupos (n = 5) estavam na mesma classificação com perda severa da transparência e íris/pupila parcialmente visíveis. No terceiro dia após a lesão identificou-se diferença significativa entre os grupos, pois o grupo tratado com “F6” resultou em score médio de 2 ± 0 , diferindo da FC ($p = 0,0154$) e do grupo NT ($p < 0,0001$) (**Figura 29**). No 5º dia os grupos F6 e FC tiveram resultados estatisticamente relevantes em relação ao NT ($p < 0,0001$ e $p = 0,0008$ respectivamente). Finalmente no sétimo dia F6 apresentou maior potencial na redução de opacidade em relação a FC ($p = 0,0008$) e NT ($< 0,0001$), com score médio de $1,4 \pm 0,54$. Em outras palavras, a opacidade média dos animais

pertencentes ao grupo F6 estava quase normalizada ao final do estudo de 7 dias, assim como em outros estudos identificados na literatura que demonstraram acentuada redução de opacidade no mesmo período (GOSWAMI et al., 2019; GRONKIEWICZ et al., 2017)

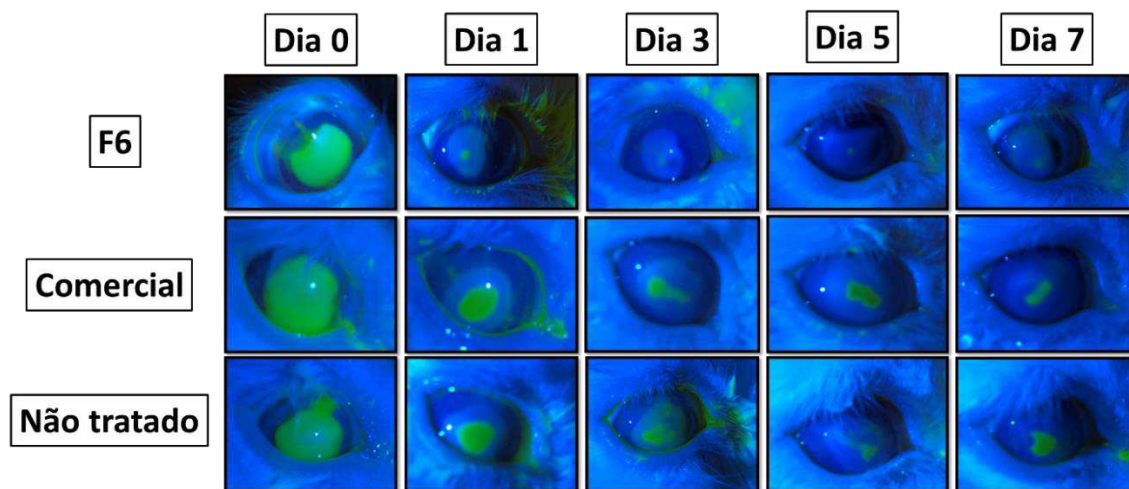
Figura 29 - Comparação do score de opacidade entre os grupos. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão (n = 5). As comparações entre as médias foram feitas por ANOVA *two way*, e posterior teste de Bonferroni (*post-hoc*). Houve diferença significativa entre F6 e os demais grupos tratados no terceiro (*p < 0,05), quinto (**p < 0,01 e *p < 0,05) e sétimo (**p < 0,01) dias. O nível de significância considerado de *p < 0,05.



A instilação de colírios de fluoresceína é amplamente descrita nos estudos científicos e empregada na prática clínica com intuito de verificar a lesão do epitélio na superfície ocular, explicada pela intensa coloração verde fluorescente sob a luz de cobalto azul. Apesar disso, até o momento seu exato mecanismo de ação não foi completamente elucidado sendo que as hipóteses mais aceitas se relacionam ao acúmulo de fluoresceína nos espaços intercelulares. Ainda, é descrito na literatura fluorescência presente, em menor escala, para córneas integras, relacionando-se a outro mecanismo, de incorporação intracelular pelas células do epitélio (BEGLEY et al., 2019). Contudo, a instilação de colírios de fluoresceína é considerada uma ferramenta bastante útil na compreensão do reparo celular na camada epitelial da córnea de forma rápida e barata.

Na **Figura 30** nota-se que com o passar dos dias a lesão de todos os grupos se reduz, de forma centrípeta. Esse achado se relaciona perfeitamente com o mecanismo descrito de recuperação do epitélio da córnea, no qual durante a fase inicial aguda da lesão de células da região periférica migram para o centro da lesão com o objetivo de cobrir toda a superfície desnuda de epitélio (teoria XYZ) (DUA; GOMES; SINGH, 1994).

Figura 30 – Fotos do acompanhamento de reepitelização por meio da instilação de fluoresceína sódica em luz cobalto (n = 5).



Na **tabela 8** é evidenciada a porcentagem de redução do tamanho da lesão em relação ao tamanho inicial, de acordo com o tempo, para cada um dos grupos. De modo geral, a porcentagem média de redução do tamanho de lesão foi maior nos animais tratados com F6, se comparados com FC e NT. Contudo, diferença estatística relevante foi identificada apenas no terceiro dia entre os grupos F6 e FC ($p = 0,0023$). A ausência de diferença estatística entre os grupos no período avaliado provavelmente está relacionada a variabilidade dos animais, visto que os desvios padrões foram relativamente elevados, em especial no primeiro dia após a lesão. Além disso, a fluoresceína pode marcar tecidos recém formados, gerando multiplicidade na interpretação dos resultados (MESSNER et al., 2019).

Tabela 8 - Comparação entre as porcentagens de redução da área lesada nos diferentes grupos (n = 5). Os resultados são expressos como média e desvio padrão. A comparação entre as médias foi feita por ANOVA two way seguido de Bonferroni (post-hoc). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos, com nível de significância de $p < 0,05$.

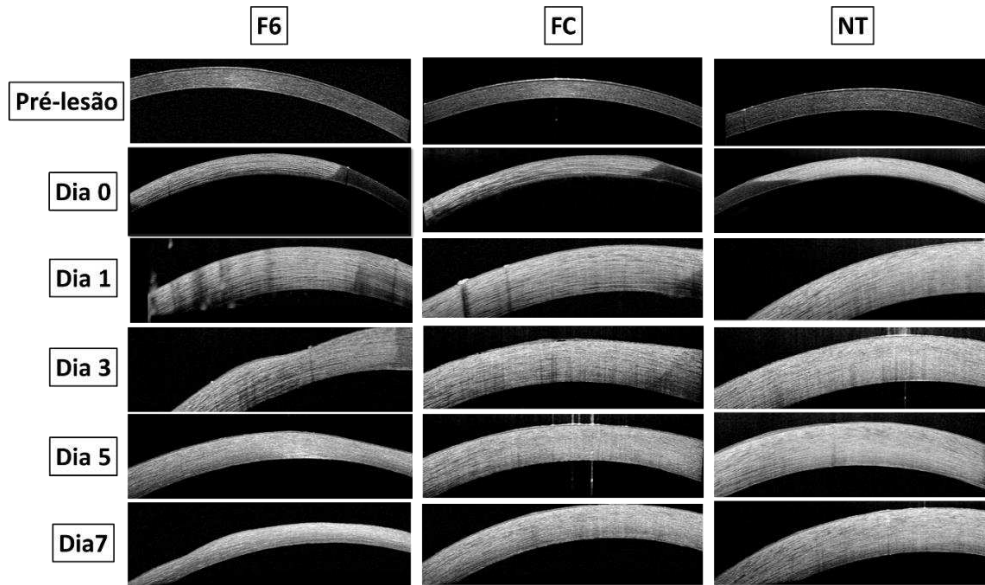
Dias após a lesão	Porcentagem de redução da área lesada		
	F6	FC	NT
Dia 1	79 ± 21	85 ± 4	76 ± 10
Dia 3	94 ± 6 ^a	75 ± 8 ^b	86 ± 7
Dia 5	94 ± 4	90 ± 7	89 ± 8
Dia 7	98 ± 2	88 ± 1	86 ± 1

2.3 Tomografia de coerência óptica (OCT)

O OCT é uma técnica não invasiva capaz de rapidamente identificar diferentes tipos de lesão oculares em distintas camadas do olho humano, e por isso, oferece mais informações do que outros exames menos sofisticados, como a marcação com fluoresceína ou avaliação ocular por lâmpada de fenda (MESSNER et al., 2019).

Foram feitas tomografias da córnea dos animais antes da indução de lesão alcalina, momentos após a indução e acompanhamento no 1º, 3º, 5º e 7º dias pós-indução. Essas imagens estão demonstradas na **figura 31**. Visualmente na córnea pré-lesão é possível identificar camadas bem definidas do epitélio, estroma com fibras horizontais, homogêneas e bem-organizadas, e o endotélio.

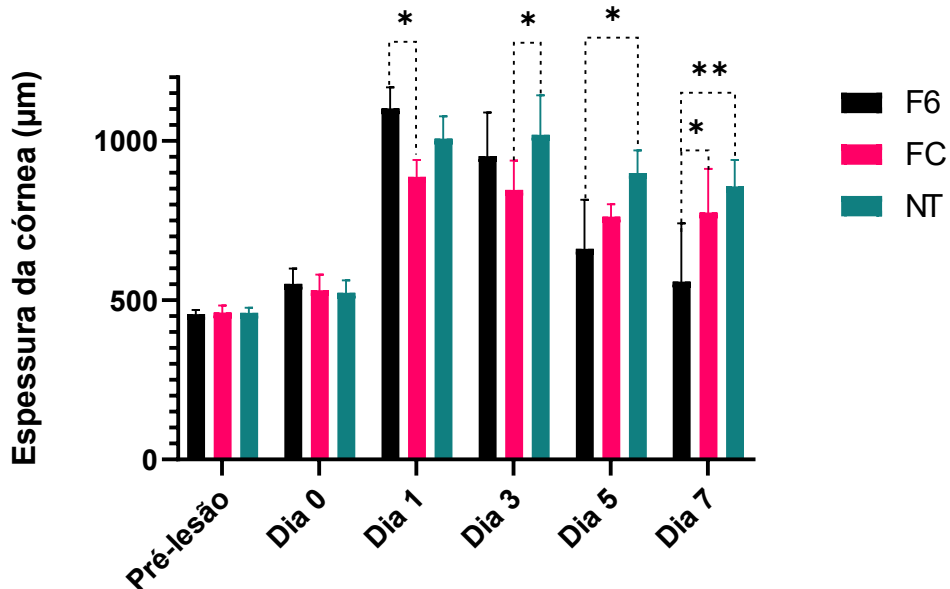
Figura 31 - Imagens de tomografia ocular referentes aos grupos ao longo do período estudado.



Após a lesão alcalina há formação de zonas hiper refletivas em toda a área observada. Esse fato é explicado pela poderosa capacidade de penetração de agentes alcalinos, mediante a saponificação de ácidos graxos presentes na membrana celular epitelial. Dessa forma, as estruturas celulares contidas no estroma são rompidas e há coagulação de componentes extracelulares do estroma (proteoglicanos), resultando em opacidade da córnea, macroscopicamente. Além disso, nota-se um sensível aumento da espessura da córnea devido a lesão, que pode atingir valores até 1,5 vezes maiores em relação a uma córnea sem alterações (SPÖLER; SCHRAGE; KURZ, 2022).

Foram feitas medidas da espessura da córnea entre os grupos como indicativo da recuperação da lesão e os dados estão na **figura 32**. Não houve diferença estatística entre as espessuras de córnea anteriormente a lesão e momentos após a lesão (Dia 0). Observou-se que no “Dia 1” a espessura média da córnea do grupo tratado com F6 sofreu o maior aumento ($1102 \pm 66,22 \mu\text{m}$), com diferença estatística relevante em relação ao grupo FC ($887,6 \pm 52,54$, $p = 0,0013$). No terceiro dia, o grupo F6 apresentou redução da espessura média ($952 \pm 137,57 \mu\text{m}$), porém sem diferença real com os demais grupos. Houve apenas diferença entre os grupos FC e NT ($p = 0,0117$), indicando que a IND pode ter algum efeito relevante na fase inicial da recuperação tecidual.

Figura 32 - Diferenças na espessura da córnea entre os grupos estudados durante a primeira semana após a lesão. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=5). A comparação foi feita por ANOVA *two way* com teste de Bonferroni (post-hoc). Foram identificadas diferenças com níveis de significância * $p < 0,05$ entre F6 e NT no quinto dia e ** $p < 0,01$ entre F6 e os demais grupos no sétimo dia. O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$.



Nos dois últimos dias do experimento a espessura média dos animais tratados com F6 diminuiu de maneira drástica. No quinto dia houve diferença entre F6 e NT ($p = 0,003$). No sétimo dia a espessura média da córnea dos animais tratados com F6 foi de $558,2 \pm 182,8 \mu\text{m}$ e houve diferença estatisticamente significativa com ambos os grupos comparados ($p = 0,0011$ para FC e $p = <0,0001$ para NT). Esse achado se correlaciona com as tomografias obtidas, que apresentaram um aspecto de melhor recuperação visualmente, se aproximando uma córnea normal do grupo controle (espessura média de $456,4 \pm 13,37 \mu\text{m}$), assim como no score de opacidade.

O mesmo perfil de aumento na espessura da córnea e posterior redução em modelo de lesão alcalina já foi identificado em um trabalho em que se utilizou um filme ocular de ácido hialurônico. A espessura média de $779 \mu\text{m} \pm 70 \mu\text{m}$ foi atingida após 14 dias, portanto, houve redução menos eficiente se comparada ao presente estudo (GRIFFITH et al., 2018). Hipoteticamente, o movimento de aumento inicial da espessura e posterior redução mais acentuada se relaciona a ação do HA na multiplicação/migração celular no epitélio e produção de proteoglicanos no estroma.

O perfil de hiper refletividade ainda se manteve nas tomografias pois seria necessário um período maior para visualizar normalização do tecido por se tratar de uma lesão de complexa resolução (KETHIRI et al., 2021), contudo, não foram identificadas irregularidades acentuadas na superfície da córnea, tampouco inclusões intraepiteliais, que corresponderiam a complexo prognóstico (VELEVSKA; DUMA; TRPEVSKA, 2015).

Os resultados encontrados no OCT e exames clínicos (*score* de opacidade e teste de fluoresceína) na melhora da lesão ocular se relacionam com os mecanismos bioquímicos do HA e IND.

Estudos realizados na década de 90 com formulações tópicas contendo 1 e 2% de HA demonstraram que a recuperação de lesões alcalinas em coelhos eram aceleradas em todos os níveis do tecido, e provavelmente relacionadas a um efeito antiinflamatório na fase inicial de recuperação, prevenindo uma cascata de lise celular por células polimorfonucleares (CHUNG; FAGERHOLM; LINDSTROM, 1989; CHUNG; PARK; PAEK, 1999). Posteriormente, estudos *in-vitro* concluíram que o HA possui importante papel na migração de células do epitélio da córnea, resultantes da ligação com o receptor transmembrana CD44 (GOMES et al., 2004). Ademais, o HA se liga a outros receptores celulares (*Toll-like* 4 e RHAMM) que estimulam funções de diferenciação celular e resolução da inflamação (NAOR, 2016). Tais receptores estão amplamente presentes na superfície ocular em condições inflamatórias.

Também foram realizados estudos de formulações tópicas contendo ácido hialurônico de concentrações variadas (0,1% a 0,4%) nos quais concluiu-se que a ligação HA-CD44 promoveu aumento da migração celular para cobertura da lesão, assim como houve promoção da multiplicação celular. Além disso, esse efeito que resulta em melhor e mais rápida cobertura da área lesionada é concentração-dependente (CHEN et al., 2021; GRONKIEWICZ et al., 2017). Outro estudo concluiu que aproximadamente 90% da lesão recuperou-se em 7 dias com a utilização de HA na forma de gel (YANG et al., 2010). Reepitelização satisfatória em 14 dias também foi obtida em filmes contendo HA tiolado em modelo animal, verificados pelo teste de fluoresceína e redução da opacidade da córnea (GRIFFITH et al., 2018).

Formulações contendo dexametasona, nimesulida e antiinflamatórios naturais (oriundos do mel de abelha e aloe vera) evidenciaram a importância da presença de

antinflamatórios no processo de reparo celular. Redução do edema geral na superfície ocular, efeitos antioxidantes importantes na manutenção da integridade celular e redução de células polimorfonucleares, são alguns dos efeitos relatados pelos estudos na literatura (ATIBA et al., 2015; BASHKARAN et al., 2011; CHEN et al., 2021; GOSWAMI et al., 2022). Portanto, a presença de IND na formulação apresentou efeito semelhante aos relatados, no estroma da córnea

Os fatores de crescimento epidérmico (EGF), transformador α e β e de fibroblastos (FCF-a e FCF-b) são alguns dos componentes que têm sua produção aumentada quando células da superfície ocular são lesadas. São responsáveis por mediar sinalização entre células, estimular a proliferação, migração e adesão celular, assim como pela produção de material extracelular (LJUBIMOV et al., 2016). Muitos desses fatores estão presentes no filme lacrimal e dependem de uma superfície homogênea para o contato com a córnea. Desse modo, a estabilização do filme lacrimal promovida pelo HA contido na formulação pode ter contribuído para o aumento do nível de fatores de crescimento na superfície da córnea e resposta de reparo adequada, como já demonstrado em outro estudo (GRONKIEWICZ et al., 2017).

As características de F6 de um fluido não-newtoniano, a mucoadesividade inerente do HA e a capacidade de formar um gel mediante aumento da temperatura (próximo a 34 °C) são fatores importantes que aumentam o tempo de residência da formulação no local de ação. Esse aumento auxilia na manutenção da concentração local dos componentes, assim como na lubrificação da superfície ocular e conseqüentemente no reparo da lesão (BASHKARAN et al., 2011). O perfil de liberação controlada de IND, com *busrt inicial* e liberação sustentada por mais de 24 horas, conforme demonstrado neste trabalho também pode ter papel importante na melhora do perfil de recuperação da lesão.

2.4 Histologia

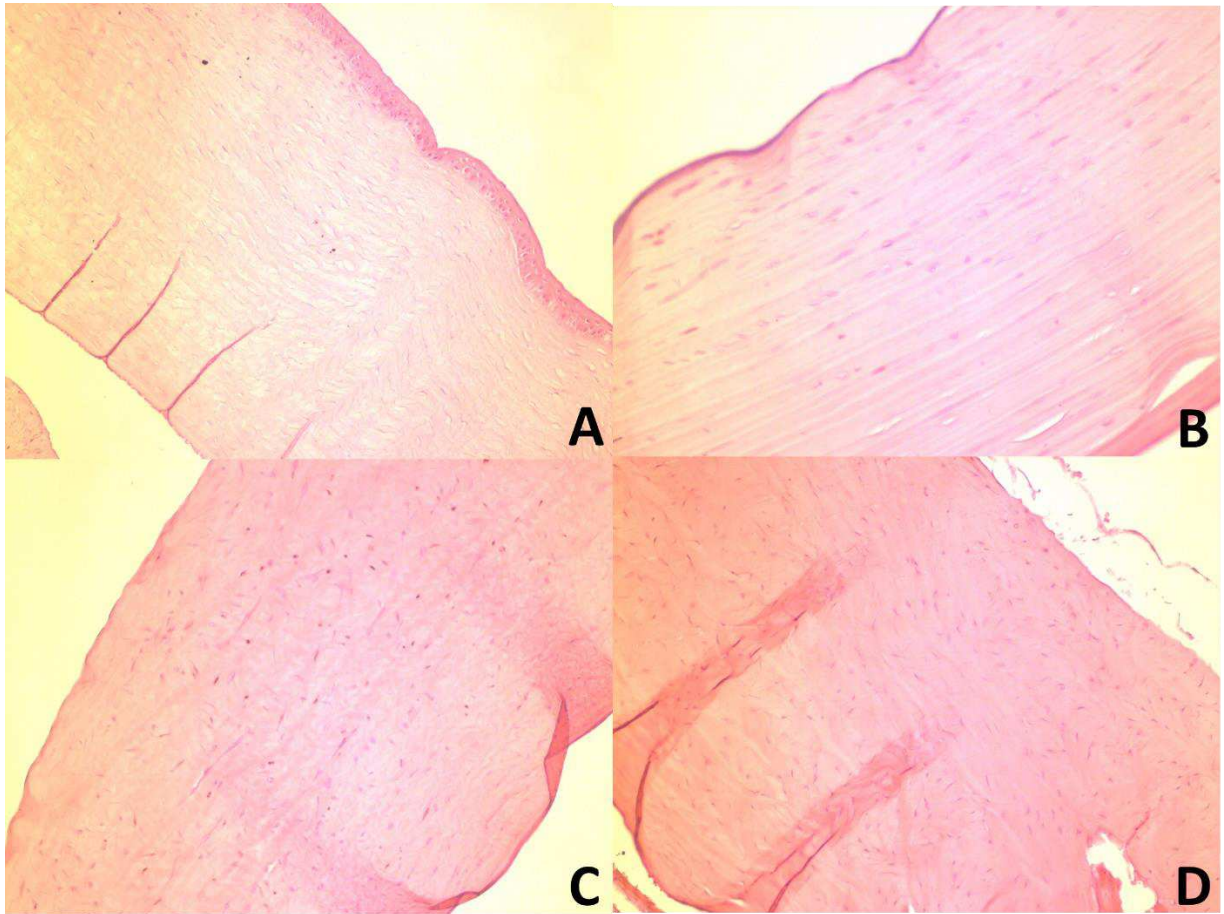
Após uma semana de acompanhamento do experimento, os animais de todos os grupos foram eutanasiados, os olhos conservados e produzidas lâminas de histologia que estão mostradas na figura 33. Na **figura 33-A** é demonstrada a configuração da córnea sem qualquer alteração obtida do olho esquerdo dos

animais. Nela é possível notar distintas camadas de células no epitélio, organização das lamelas de colágeno no estroma direcionadas horizontalmente e presença de queratócitos de aspecto fisiológico (núcleo fusiforme e alongado). Além disso, uma fina camada de endotélio está presente e as transições entre as camadas são bastante discretas (LEE ANN, 2012).

Na figura **33-B** é mostrada a lâmina do grupo tratado com F6, na qual se pode notar uma fina camada de epitélio sem clara distinção entre as células. Além disso, os queratócitos do estroma apresentam-se com núcleos mais arredondados, contudo algum aspecto fusiforme é mantido. As fibras de colágeno organizam-se de forma horizontal e pode-se notar diferença entre a espessura dessas. As figuras **33-C e 33-D** representam os grupos FC e NT, respectivamente. Não se nota camada de epitélio bem formada e tampouco organização das fibras de colágeno no estroma. Os fibroblastos estão dispersos de modo aleatório sem a presença de espaços vacuolizados, que representam os proteoglicanos. Tais evidências indicam que os animais tratados com F6 tiveram recuperação tecidual com melhor qualidade e melhor velocidade, assim como identificado em outro estudo com ácido hialurônico (YANG et al., 2010).

De modo geral, em todos os grupos não se identifica presença de células inflamatórias, provavelmente pelo fato de a lesão induzida não ser tão abrasiva e intensa. Só são identificados em lesões alcalinas de maior intensidade geradas com a utilização de NaOH 2 M, conforme descreve o trabalho publicado por BASHKARAN e colaboradores (2011). O mesmo conceito se aplica para neovascularização que é ausente nas lâminas montadas.

Figura 33. Fotografias de lâminas da lesão alcalina coradas com hematoxilina/eosina obtidas no microscópio dos grupos controle (A), F6 (B), FC (C) e NT (D), no aumento de 10x.



3. CONCLUSÃO

A formulação F6 não demonstrou qualquer reação que pudesse ser associada a irritação ocular no teste de HET-CAM, confirmando que os componentes utilizados na formulação são seguros para administração ocular. O modelo de lesão alcalina proposto obteve êxito em induzir lesão na córnea de forma homogênea entre os animais e os olhos afetados puderam ser avaliados durante todo o período proposto.

Na avaliação da opacidade da córnea encontrou-se redução significativa a partir do 3º após a lesão nos animais tratados com F6, quando comparados com FC e NT. Além disso, a partir do 5º dia houve diferença efetiva na espessura da córnea avaliado por meio de OCT. Contudo, não houve efetiva correlação com os resultados da instilação de fluoresceína, que avalia o estado do epitélio superficial.

Análises histológicas confirmaram os resultados satisfatórios de F6 por demonstrar melhorada organização tecidual no estroma da córnea, assim como reepitelização acelerada. Os mecanismos biológicos de controle da inflamação, indução de migração/proliferação celular do HA, assim como aumentada retenção da formulação por suas propriedades de gelificação e viscosidade são os aparentes motivos para os resultados. Assim, é possível sugerir que o sistema gelificante *in-situ* (F6) aumentou de forma significativa a recuperação tecidual após lesão alcalina da córnea de forma segura.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

No presente trabalho foi desenvolvido um sistema gelificante *in-situ* contendo um polímero da classe dos poloxâmeros (K407), ácido hialurônico e indometacina, para o reparo de lesão alcalina. De posse dos resultados apresentados até o momento, é possível indicar que a formulação desenvolvida é estável, segura e seu perfil de liberação, acompanhado em ensaios *in-vitro* durante 24 horas, é satisfatório. A estrutura nanométrica foi visualizada por diferentes técnicas de microscopia, inclusive em sua forma liofilizada. Com base nos testes *in-vivo* a formulação mostrou-se útil na recuperação da lesão na córnea, em comparação aos grupos controle, refletindo em uma estrutura tecidual mais organizada e próxima da fisiológica.

Baseado nos resultados obtidos, propõe-se como perspectivas futuras:

- Investigar de forma aprofundada os mecanismos bioquímicos em que a formulação atua (envolvimento de receptor CD44, fatores de crescimento, citocinas específicas).
- Desenvolvimento de método cromatografia com sensibilidade suficiente para a quantificação de IND nos diferentes tecidos oculares, elucidando sua distribuição.
- Realizar testes com concentrações distintas de HA em modelos de lesão química mais severos.
- Avaliar a viabilidade e perfil de segurança da plataforma desenvolvida para aplicações intravítreas.
- Estudo da forma liofilizada do sistema gelificante e os efeitos da reconstituição desse sistema na capacidade de gelificação e liberação do fármaco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-SHAMAT, Mohamad A.; CALVO-CASTRO, Jesus; STAIR, Jacqueline L.; COOK, Michael T. Modifying the Properties of Thermogelling Poloxamer 407 Solutions through Covalent Modification and the Use of Polymer Additives. **Macromolecular Chemistry and Physics**, EUA, v. 220, 2019. DOI: 10.1002/macp.202000178.
- ADU-FRIMPONG, Michael; WEI, Chunmei; WANG, Qilong; WENG, Wen; WEI, Qiuyu; XIE, Yujiao; ADU-, Michael. The characterisation , pharmacokinetic and tissue distribution studies of TPGS modified myricetrin mixed micelles in rats. **Journal of Microencapsulation**, EUA, v. 36, n. 3, p. 1–13, 2019. DOI: 10.1080/02652048.2019.1622606.
- AGRAWAL, Ashish Kumar; DAS, Manasmita; JAIN, Sanyog. In situ gel systems as ‘ smart ’ carriers for sustained ocular drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, Reino Unido, v. 9, n. 4, p. 383–402, 2012. DOI: 10.1517/17425247.2012.665367.
- AHUJA, Munish; DHAKE, Avinash S.; SHARMA, Surendra K.; MAJUMDAR, Dipak K. Review Article Topical Ocular Delivery of NSAIDs. **The AAPS Journal**, EUA, v. 10, n. 2, p. 229–241, 2008. DOI: 10.1208/s12248-008-9024-9.
- AKKARI, Alessandra C. S. et al. Poloxamer 407 / 188 binary thermosensitive hydrogels as delivery systems for in fi ltrative local anesthesia : Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation. **Materials Science & Engineering C**, Amsterdã, v. 68, p. 299–307, 2016. DOI: 10.1016/j.msec.2016.05.088. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.088>.
- ALBANO, Kivia Mislaine. **Comportamento Reológico De Géis De Amido De Mandioquinha Salsa (Arracacia Xanthorrhiza B) Comportamento Reológico De Géis De Amido De Mandioquinha Salsa (Arracacia Xanthorrhiza B)**. 2012. 137p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2012.
- ALMEIDA, Hugo; AMARAL, Maria Helena; LOBA, Paulo; LOBO, Manuel Sousa. In situ gelling systems: a strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations. **Drug Discovery Today**, Amsterdã, v. 19, n. 4, p. 400–412, 2014. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.10.001.
- AMMAR, H. O.; SALAMA, H. A.; GHORAB, M.; MAHMOUD, A. A. Development of dorzolamide hydrochloride in situ gel nanoemulsion for ocular delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Reino Unido, v. 36, n. 11, p. 1330–1339, 2010. DOI: 10.3109/03639041003801885.
- ANDONOVA, Velichka; PETROVA, Nadia; GEORGIEV, G. Indomethacin nanoparticles for applications in liquid ocular formulations. **Folia Medica**, Itália, v. 44, n. 1, p. 76–82, 2013. DOI: 10.2478/folmed-2013-0009.
- ARAÚJO, Patricia Rocha De et al. In vivo study of hypericin-loaded poloxamer-based mucoadhesive in situ gelling liquid crystalline precursor system in a mice model of vulvovaginal candidiasis. **Medical Mycology**, Oxford, v. 0, p. 1–7, 2021. DOI: 10.1093/mmy/nyab006.

ATCHISON, David; SMITH, George. **Optics of the Human Eye**. 1 ed ed., Edimburgo: Elsevier Science Limited, 2000. DOI: 10.1016/b978-0-7506-3775-6.x5001-9.

ATIBA, Ayman; WASFY, Tamer; ABDO, Walied; GHONEIM, Ahmed; KAMAL, Tarek; SHUKRY, Mustafa. Aloe vera gel facilitates re-epithelialization of corneal alkali burn in normal and diabetic rats. **Clinical Ophthalmology**, Londres, v. 9, p. 2019–2026, 2015. ISBN: 0018883664. DOI: 10.2147/OPHTH.S90778.

BADAWI, Alia A.; EL-LAITHY, Hanan M.; QIDRA, Riad K. El; MOFTY, Hala El; EL, Mohamed. Chitosan Based Nanocarriers for Indomethacin Ocular Delivery. **Arch Pharm Res**, Suíça, v. 31, n. 8, p. 1040–1049, 2008. DOI: 10.1007/s12272-001-1266-6.

BALOGLU, Esra; KARAVANA, Sinem Yaprak; SENYIGIT, Zeynep Ay; GUNERI, Tamer. Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base. **Pharmaceutical Development and Technology**, Reino Unido, v. 16, n. June 2010, p. 627–636, 2011. DOI: 10.3109/10837450.2010.508074.

BARADARAN-RAFFI, Alireza; ESLANI, Medi; HAQ, Zeeshan; SHIRZADEH, Ebrahim; HUVARD, Micheal J.; DJALILIAN, Ali R. Current and Upcoming Therapies for Ocular Surface Chemical Injuries. **The Ocular Surface**, Chicago, v. 15, n. 1, p. 48–64, 2017. DOI: 10.1016/j.jtos.2016.09.002.

BARANOWSKI, Przemys B.; GAJDA, Maciej; PLUTA, Janusz. Ophthalmic Drug Dosage Forms: Characterisation and Research Methods. **The Scientific World Journal**, Londres, n. 2014:861904, p. 1–14, 2014.

BASHKARAN, Karuppanan; ZUNAINA, Embong; BAKIAH, Shaharuddin; SULAIMAN, Siti Amrah; SIRAJUDEEN, Kns; NAIK, Venkatesh. Anti-inflammatory and antioxidant effects of Tualang honey in alkali injury on the eyes of rabbits: experimental animal study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, Reino Unido, v. 11, n. 90, p. 2–11, 2011. DOI: 10.1186/1472-6882-11-90.

BEGLEY, Carolyn; CAFFERY, Barbara; CHALMERS, Robin; SITU, Ping; SIMPSON, Trefford; NELSON, J. Daniel. Review and analysis of grading scales for ocular surface staining. **Ocular Surface**, Amsterdã, v. 17, n. 2, p. 208–220, 2019. DOI: 10.1016/j.jtos.2019.01.004.

BERMUDEZ, J. M.; GRAU, R. Thermosensitive poloxamer-based injectables as controlled drug release platforms for veterinary use: Development and in-vitro evaluation. **International Research Journals**, Sapele, v. 1, n. 6, p. 109–118, 2016.

BIZRAH, Mukhtar; YUSUF, Ammar; AHMAD, Sajjad. An update on chemical eye burns. **Eye**, Suíça, v. 33, p. 1362–1377, 2019. DOI: 10.1038/s41433-019-0456-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41433-019-0456-5>.

CAMPOS, Carla Freitas; JORGE, Torrecilhas Adriana; TALIERI, Ivia Carmen; VICENTI, Felipe Antônio Mendes; TOLEDO-PIZA, Evandro De; LAUS, José Luiz. Ocular alkali lesions in dogs . Acetylcysteine and blood serum effects Lesões oculares por álcali em cães . Efeitos da acetilcisteína e do soro sanguíneo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, p. 36–44, 2003.

CHEN, Tzu-yang; TSENG, Ching-li; LIN, Chih-an; LIN, Hua-yang; VENKATESAN,

Parthiban; LAI, Ping-shan. Effects of Eye Drops Containing Hyaluronic Acid-Nimesulide Conjugates in a Benzalkonium Chloride-Induced Experimental Dry Eye Rabbit Model. **Pharmaceutics**, Basel, v. 13, n. 1366, p. 1–17, 2021.

CHOLKAR, Kishore; DASARI, Supriya Reddy. **Eye: anatomy, physiology and barriers to drug delivery**. EUA : Woodhead Publishing Limited, 2013.

CHUNG, Jang-Huyn; FAGERHOLM, Per; LINDSTROM, Bo. Hyaluronate in Healing of Corneal Alkali Wound in the Rabbit. **Exp. Eye Res**, Amsterdã, v. 48, p. 569–575, 1989.

CHUNG, Jang-hyun; PARK, Yoo-kyung; PAEK, Soo-min. Effect of Na-Hyaluronan on Stromal and Endothelial Healing in. **Ophthalmic Research**, Basel, v. 31, p. 432–439, 1999.

DAVIES, Nigel M. Biopharmaceutical Considerations in Topical Ocular Drug Delivery. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Austrália, v. 27, n. March, p. 558–562, 2000.

DE ARRUDA MELLO FILHO, Paulo Augusto; MAIA, Maurício; RODRIGUES, Eduardo Buchelle; FARAH, Michel Eid. Farmacologia ocular aplicada no tratamento de doenças do vítreo, retina e coróide. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 73, n. 3, p. 294–299, 2010. DOI: 10.1590/S0004-27492010000300018.

DE OLIVEIRA, Davi Antunes. **Microscopia Óptica de Parâmetro de Ordem em Fases nemáticas**. 2011. 143p. Tese (Doutorado em Física) - Faculdade de Física Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

DESTRUEL, Pierre-louis et al. Novel in situ gelling ophthalmic drug delivery system based on gellan gum and hydroxyethylcellulose: Innovative rheological characterization , in vitro and in vivo evidence of a sustained precorneal retention time. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdã, v. 574, p. 1–47, 2019. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118734.

DOBRO, Megan J.; MELANSON, Linda A.; JENSEN, Grant J.; MCDOWALL, Alasdair W. Plunge Freezing for Electron Cryomicroscopy. *In: **Methods in Enzymology Cryo-EM, Part A Sample Preparation and Data Collection***. 1. ed. Amsterdã: Elsevier Inc., 2010. v. 481p. 63–82. DOI: 10.1016/S0076-6879(10)81003-1. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)81003-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(10)81003-1).

DUA, H. S.; GOMES, J. A. P.; SINGH, A. Corneal epithelial wound healing. **Br J Ophthalmol**, Reino Unido, v. 78, n. 5, p. 401–408, 1994. DOI: 10.1136/bjo.78.5.401.

DUA, Harminder S. The conjunctiva in corneal epithelial wound healing. **Br J Ophthalmol**, Reino Unido, p. 1407–1411, 1998.

DUA, Harminder S.; SHU, Darren; TING, Jeng; AL, Ahmed; DALIA, Saadi. Chemical eye injury : pathophysiology , assessment and management. **Eye**, EUA, v. 34, p. 2001–2019, 2020. DOI: 10.1038/s41433-020-1026-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41433-020-1026-6>.

DUMORTIER, Gilles; GROSSIORD, Jean Louis; AGNELY, Florence; CHAUMEIL, Jean Claude. Expert Review A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**, Basel, v. 23, n. 12, p. 2709–2728, 2006. DOI: 10.1007/s11095-006-9104-4.

ESLANI, Medi; BARADARAN-RAFII, Alireza; AHMAD, Sajjad. Cultivated Limbal and Oral Mucosal Epithelial Transplantation. **Seminars in Ophthalmology**, EUA, v. 27, n. 3–4, p. 80–93, 2012. DOI: 10.3109/08820538.2012.680641.

ESLANI, Medi; BARADARAN-RAFII, Alireza; MOVAHEDAN, Asadolah; DJALILIAN, Ali R. The ocular surface chemical burns. **Journal of Ophthalmology**, Londres, v. 2014, n. 2014:196827, p. 1–9, 2014. DOI: 10.1155/2014/196827.

EWING, Andrew V; CLARKE, Graham S.; KAZARIAN, Sergei G. Stability of indomethacin with relevance to the release from amorphous solid dispersions studied with ATR-FTIR spectroscopic imaging. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdã, v. 60, p. 64–71, 2014. DOI: 10.1016/j.ejps.2014.05.001.

FAIRLEY, Nichole; HOANG, Bryan; ALLEN, Christine. Morphological Control of Poly (ethylene glycol) - block -poly (ϵ -caprolactone) Copolymer Aggregates in Aqueous Solution. **Biomacromolecules**, EUA, v. 9, p. 2283–2291, 2008.

FORUSHANI, Roya Heydari; HASSANI, Kamran; IZADI, Farhad. Steady State Heat Analysis of the Eye Using Finite Element Method. **Biomedical Research**, Índia, v. 23, n. 1, p. 99–104, 2012.

GAO, Minghong; SANG, Wei; LIU, Fuying; YU, Hai; ZHOU, Runhai; BELIN, Michael Wellington; ZLOTY, Peter; CHEN, Yingxin. High MMP-9 Expression May Contribute to Retroprosthetic Membrane Formation after KPro Implantation in Rabbit Corneal Alkali Burn Model. **Journal of Ophthalmology**, Reino Unido, v. 2016:10942, p. 1–8, 2016. DOI: 10.1155/2016/1094279.

GARALA, Kevin; JOSHI, Parth; SHAH, Malay; RAMKISHAN, A.; PATEL, Jaydeep. Formulation and evaluation of periodontal in situ gel. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, Bangalore, v. 3, n. 1, p. 29–41, 2013. DOI: 10.4103/2230-973X.108961.

GAYNES, Bruce I.; FISCELLA, Richard. Topical Nonsteroidal Anti-Inflammatory A Safety Review. **Drug safety**, Suíça, v. 25, n. 4, p. 233–250, 2002.

GHEZZI, M.; PEScina, S.; PADULA, C.; SANTI, P.; FAVERO, E. Del; CANTÙ, L.; NICOLI, S. Polymeric micelles in drug delivery : An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions. **Journal of Controlled Release**, EUA, v. 332, p. 312–336, 2021. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.02.031.

GIULIANO, Elena; PAOLINO, Donatella; CRISTIANO, Maria Chiara; FRESTA, Massimo; COSCO, Donato. Rutin-loaded poloxamer 407-based hydrogels for in situ administration: Stability profiles and rheological properties. **Nanomaterials**, Basel, v. 10, n. 6, p. 3–5, 2020. DOI: 10.3390/nano10061069.

GIULIANO, Elena; PAOLINO, Donatella; FRESTA, Massimo; COSCO, Donato. Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels: An Overview. **Pharmaceutics**, Basel, v. 10, n. 159, p. 1–26, 2018. DOI: 10.3390/pharmaceutics10030159.

GOMES, J. A. P.; AMANKWAH, R.; POWELL-RICHARDS, A.; DUA, H. S. Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells in vitro. **British Journal of Ophthalmology**, Londres, v. 88, n. 6, p. 821–825, 2004. DOI: 10.1136/bjo.2003.027573.

GOSWAMI, Dinesh G.; KANT, Rama; AMMAR, David A.; KUMAR, Dileep; ENZENUER, Robert W.; PETRASH, J. Mark; TEWARI-SINGH, N.; AGARWAL, Rajesh. Acute corneal injury in rabbits following nitrogen mustard ocular exposure. **Experimental and Molecular Pathology**, Holanda, v. 110, n. Junho, p. 104275, 2019. DOI: 10.1016/j.yexmp.2019.104275.

GOSWAMI, Dinesh G.; MISHRA, Neha; KANT, Rama; AGARWAL, Chapla; AMMAR, David A.; PETRASH, J. Mark; TEWARI-SINGH, Neera; AGARWAL, Rajesh. Effect of dexamethasone treatment at variable therapeutic windows in reversing nitrogen mustard-induced corneal injuries in rabbit ocular in vivo model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Holanda, v. 437, n. 115904, p. 1–11, 2022. DOI: 10.1016/j.taap.2022.115904. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.115904>.

GRIFFITH, Gina L.; WIROSTKO, Barbara; LEE, Hee Kyoung; CORNELL, Lauren E.; MCDANIEL, Jennifer S.; ZAMORA, David O.; JOHNSON, Anthony J. Treatment of corneal chemical alkali burns with a crosslinked thiolated hyaluronic acid film. **Burns**, Holanda, v. 44, n. 5, p. 1179–1186, 2018. DOI: 10.1016/j.burns.2018.01.016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2018.01.016>.

GRONKIEWICZ, Kristina M.; GIULIANO, Elizabeth A.; SHARMA, Ajay; MOHAN, Rajiv R. Effects of topical hyaluronic acid on corneal wound healing in dogs: a pilot study. **Veterinary Ophthalmology**, v. 20, n. 2, p. 123–130, 2017 a. DOI: 10.1111/vop.12379.

HERSH, Peter S.; RICE, Beverly A.; BAER, John C.; PETER, A.; LYNCH, Samuel E.; MCGUIGAN, Lorraine J. B.; FOSTER, Stephen. Topical Nonsteroidal Agents and Corneal Wound Healing. **Arch Ophthalmol**, EUA, v. 108, n. April, p. 577–583, 1990.

HIPPALGAONKAR, Ketan; ADELLI, Goutham R.; HIPPALGAONKAR, Kanchan; REPKA, Michael A.; MAJUMDAR, Soumyajit. Indomethacin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, EUA, v. 29, n. 2, p. 216–228, 2013 a. DOI: 10.1089/jop.2012.0069.

HOARE, Todd R.; KOHANE, Daniel S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymer**, Holanda, v. 49, n. 8, p. 1993–2007, 2008. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.01.027. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2008.01.027>.

HSIEH, Hao-ying; LIN, Wei-yang; LEE, An Li; LI, Yi-chen; CHEN, Yi-jane; CHEN, Cheng; ID, Tai-horng Young. Hyaluronic acid on the urokinase sustained release with a hydrogel system composed of poloxamer 407 : HA / P407 hydrogel system for drug delivery. **PLOS**, São Francisco, v. 11, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0227784. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0227784>.

HUANG, Wei; TOURMOUZIS, Konstantinos; PERRY, Henry; HONKANEN, Robert; RIGAS, Basil. Animal models of dry eye disease: Useful, varied and evolving (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, Grécia, v. 22, n. 6, p. 1–10, 2021. DOI: 10.3892/etm.2021.10830.

HUI, Jun; JEREMY, Sze; LOVE, Christopher A. Biotechnological production of hyaluronic acid : a mini review. **3 Biotech**, Berlim, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2016. DOI: 10.1007/s13205-016-0379-9.

IMANISHI, Jiro; KAMIYAMA, Kenji; IGUCHI, Ikuo; KITA, Maszaku; SOTOZONO, Chie; KINOSHITA, Shigeru. Growth Factors: Importance in Wound Healing and Maintenance of Transparency of the Cornea. **Progress in Retinal and Eye Research**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 113–129, 2000.

JANAGAM, Dileep R.; WU, Linfeng; LOWE, Tao L. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Holanda, v. 122, p. 31–64, 2017. DOI: 10.1016/j.addr.2017.04.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.04.001>.

JANAS, Christine; MOSTAPHAOUI, Zouhair; SCHMIEDERER, Ludwig; BAUER, Johann; WACKER, Matthias G. Novel polymeric micelles for drug delivery: Material characterization and formulation screening. **International Journal of Pharmaceutics**, Holanda, v. 509, n. 1–2, p. 197–207, 2016. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.05.029. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.05.029>.

JUE, Bill; MAURICE, David M. The mechanical properties of the rabbit and human cornea. **Journal of Biomechanics**, EUA, v. 19, n. 10, p. 847–853, 1986. DOI: 10.1016/0021-9290(86)90135-1.

KANG, Yanwei; LI, Shaowei; LIU, Chang; LIU, Mintian; SHI, Shuai; XU, Man; HE, Jingliang; ZHANG, Tao. A rabbit model for assessing symblepharon after alkali burn of the superior conjunctival sac. **Scientific Reports**, EUA, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-50286-x.

KETHIRI, Abhinav Reddy; SINGH, Vijay Kumar; DAMALA, Mukesh; BASU, Sayan; RAO, Ch Mohan; BOKARA, Kiran Kumar; SINGH, Vivek. Long term observation of ocular surface alkali burn in rabbit models: Quantitative analysis of corneal haze, vascularity and self-recovery. **Experimental Eye Research**, Holanda, v. 205, n. February, p. 1–11, 2021. DOI: 10.1016/j.exer.2021.108526. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108526>.

KUCKELKORN, Ralf; KOTTEK, Alexander. Poor prognosis of severe chemical and thermal eye burns: the need for adequate emergency care and primary prevention. **Int Arch Occup Environ Health**, Suíça, v. 67, p. 281–284, 1995.

KUMAR, Thilek. ..; BHARATHI, D.; BALASUBRAMANIAM, J.; KANT, S.; PANDIT, J. .. Ph-Induced in-Situ Gelling Systems of Indomethacin for Sustained Ocular Delivery. **Indian Journal of Pharmaceutical Sci**, Índia, v. 67, n. 3, p. 327–333, 2003.

KUNO, Noriyuki; FUJII, Shinobu. Recent Advances in Ocular Drug Delivery Systems. **Polymers**, Basel, n. Figure 1, p. 193–221, 2011. DOI: 10.3390/polym3010193.

LAM, Yeng-ming; GOLDBECK-WOOD, Gerhard. Direct visualisation of micelles of Pluronic block copolymers in aqueous solution by cryo-TEM. **Phys. Chem. Chem. Phys**, Reino Unido, v. 1, p. 3331–3334, 1999.

LAURA, C. E.; BORGES, Antonio C.; OLIVEIRA, Marcelo G. De; FARIAS, Marcelo A. De. MethodsX Visualization of supramolecular structure of Pluronic F127 micellar hydrogels using cryo-TEM. **MethodsX**, Holanda, v. 7, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1016/j.mex.2020.101084. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101084>.

LEE ANN, Remington A. **Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System**.

3. ed., EUA: Elsevier, 2012. DOI: 10.1016/C2009-0-56108-9.

LEE, Jong Soo; KIM, Young Hi; PARK, Young Min. The Toxicity of Nonsteroidal Anti-inflammatory Eye Drops against Human Corneal Epithelial Cells in Vitro. **Ophthalmology**, EUA, v. 30, n. 15, p. 1856–1864, 2015.

LI, Jianyu; MOONEY, David J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. **Nature Reviews Materials**, EUA, v. 1, n. 12, p. 1–18, 2016. DOI: 10.1038/natrevmats.2016.71. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>.

LIAO, Yong-hong; JONES, Stuart A.; FORBES, Ben; MARTIN, Gary P.; BROWN, Marc B. Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery. **Drug Delivery**, Reino Unido, v. 12, p. 327–342, 2005. DOI: 10.1080/10717540590952555.

LJUBIMOV, Alexander V; SAGHIZADEH, Mehrnoosh; PROGRAM, Eye; ANGELES, Los. Progress in corneal wound healing. **Prog Retin Eye Res.**, Reino Unido, v. 49, p. 17–45, 2016. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.07.002.Progress.

LOBENBERG, Raimar; AMIDON, Gordon L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdã, v. 50, p. 3–12, 2000.

LYNCH, Courtney R.; KONDIAH, Pierre P. D.; CHOONARA, Yahya E.; DU TOIT, Lisa C.; ALLY, Naseer; PILLAY, Viness. Hydrogel Biomaterials for Application in Ocular Drug Delivery. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Itália, v. 8, n. Março, p. 1–18, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00228.

MANSOUR, Mai; MANSOUR, Samar; MORTADA, Nahed D.; ABD ELHADY, Seham S. Ocular poloxamer-based ciprofloxacin hydrochloride in situ forming gels. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Londres, v. 34, n. 7, p. 744–752, 2008. DOI: 10.1080/03639040801926030.

MAYOL, Laura; QUAGLIA, Fabiana; BORZACCHIELLO, Assunta; AMBROSIO, Luigi; ROTONDA, Maria I. L. A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: Rheological, mucoadhesive and in vitro release properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Holanda, v. 70, n. 1, p. 199–206, 2008. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.04.025.

MAZET, Roseline; YAM, Josias B. G.; WOUESSIDJEW, Denis; CHOISNARD, Luc; ANNABELLE, G. Recent Advances in the Design of Topical Ophthalmic Delivery Systems in the Treatment of Ocular Surface Inflammation and Their Biopharmaceutical Evaluation. **Pharmaceutics**, Reino Unido, v. 12, n. 570, p. 55, 2020.

MEHANNA, Mohammed Maher; EL-KADER, Nouran Abd; SAMAHA, Magda Wadih. Liposomes as potential carriers for ketorolac ophthalmic delivery: formulation and stability issues. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 53, n. 2, p. 1–10, 2017.

MESSNER, Alina et al. Characterization of dry eye disease in a mouse model by optical coherence tomography and fluorescein staining. **Biomedical Optics Express**, EUA, v. 10, n. 9, p. 4884, 2019. DOI: 10.1364/boe.10.004884.

MÜLLER-LIERHEIM, Wolfgang G. K. Why chain length of hyaluronan in eye drops matters. **Diagnosics**, Reino Unido, v. 10, n. 8, p. 1–32, 2020. DOI: 10.3390/diagnostics10080511.

NAOR, David. Interaction Between Hyaluronic acid and its receptors (Cd44 , rHaMM) regulates the activity of inflammation and Cancer. **Frontiers in Immunology**, Suíça, v. 7, n. February, p. 10–13, 2016. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00039.

NEERVANNAN, Seshadri; KOMPELLA, Uday B. **Ophthalmic Product Development from Bench to Bedside**. 37. ed. Chicago: AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series, 2021. 642 p.

NIE, Shufang; HSIADO, Wendy WL; PAN, Weisan; YANG, Zhijun. Thermoreversible Pluronic ® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel : in vitro drug release , cell cytotoxicity , and uptake studies. **International Journal of Nanomedicine**, Reino Unido, v. 6, p. 151–166, 2011. DOI: 10.2147/IJN.S15057.

OLIVEIRA, Matheus Batista De; SANTOS, Renata Souza; BRANDÃO, Raúl Fábio Freire. Uso de soro autólogo como adjuvante no tratamento de úlcera de córnea em equino. **Pubvet**, Maringá, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2019.

OLIVEIRA, Rummenigge et al. Treatment for chemical burning using liquid crystalline nanoparticles as an ophthalmic delivery system for pirfenidone. **International Journal of Pharmaceutics**, EUA v. 568, n. June, p. 118466, 2019. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118466. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118466>.

PAN, Nicole Caldas; CRISTINA, Hanny; PEREIRA, Braga; LOURDES, Maria De; FLORA, Ana; VASCONCELOS, Dalberto; ANTONIA, Maria; COLABONE, Pedrine. Improvement Production of Hyaluronic Acid by Streptococcus zooepidemicus in Sugarcane Molasses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, EUA, v. 182, n. 1, p. 276–293, 2016. DOI: 10.1007/s12010-016-2326-y. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-016-2326-y>.

PANDIT, J. K.; BHARATHI, D.; SRINATHA, A.; RIDHURKAR, D. N.; SINGH, S. Long acting ophthalmic formulation of indomethacin: Evaluation of alginate gel systems. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Índia, v. 69, n. 1, p. 37–40, 2007. DOI: 10.4103/0250-474X.32105.

PATEL, Ashaben; CHOLKAR, Kishore; AGRAHARI, Vibhuti; MITRA, Ashim K. Ocular drug delivery systems: An overview. **World Journal of Pharmacology**, EUA, v. 2, n. 2, p. 1–35, 2013. DOI: 10.5497/wjp.v2.i2.47.

PEREIRA DA SILVA, Bruna. **Micropartículas de Alginato Obtidas Por Spray Drying Para Liberação Modificada de Indometacina**. 2013. 87p. (Dissertação) Faculdade de Farmácia. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

PEREIRA GARRASTAZU, Gabriela; DIMER ANVERSA, Frantiescoli; GUTERRES STANISÇUAKI, Sílvia; KECHINSKI PEREIRA, Carolina; GRANADA EICHELBERGER, Jonas; CARDOZO MEDEIROS SÉRGIO, Nilo. Formulation and Characterization of Poloxamer 407: Thermoreversible Gel Containing Polymeric Microparticles and Hyaluronic Acid. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 36, n. 8, p. 1121–1125, 2013.

PONTES, Kelly Cristine de Sousa; BORGES, Andrea Pacheco Batista; ELEOTÉRIO, Renato Barros; FAVARATO, Lukiya Silva Campos; DUARTE, Tatiana Schmitz. Processo de reparação de lesões da córnea e a membrana amniótica na oftalmologia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 12, p. 2120–2127, 2011. DOI: 10.1590/s0103-84782011001200014.

QIAN, Yong; WANG, Fengzhen; LI, Rui; ZHANG, Qing; XU, Qunwei. Preparation and evaluation of in situ gelling ophthalmic drug delivery system for methazolamide. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Reino Unido, v. 36, n. 11, p. 1340–1347, 2010. DOI: 10.3109/03639041003801893.

RAGHAVAN, Srinivasa R.; CIPRIANO, Bani H. Gel Formation: Phase Diagrams Using Tabletop Rheology And Calorimetry. *In: **Molecular Gels: Materials with Self-Assembled Fibrillar Networks***. 1. ed. Holanda: Springer, 2005. p. 233–244.

RODRIGUES, Bomfim; BRAVO, Renata; CASTILHO, Rachel Oliveira; YOSHIDA, Maria Irene; JOSE, Anderson; CARDOSO, Nascimento; ODI, Simone; FARACO, Augusto Gomes. Bimatoprost-Loaded Ocular Inserts as Sustained Release Drug Delivery Systems for Glaucoma Treatment: In Vitro and In Vivo Evaluation. **PLoS ONE**, EUA, v. 9, n. 4, p. 1–11, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0095461.

RUPPERT, S. ...; HAWN, T. ...; ARRIGONI, A.; WIGHT, T. ...; BOLLYKY, P. ... Tissue integrity signals communicated by high-molecular weight hyaluronan and the resolution of inflammation. **Immunol Res.**, EUA, v. 58, n. 0, p. 186–192, 2014. DOI: 10.1007/s12026-014-8495-2.Tissue.

RUSSO, Eleonora; VILLA, Carla. Poloxamer Hydrogels for Biomedical Applications. **Pharmaceutics**, Reino Unido, v. 11, n. 671, p. 1–17, 2019.

SALZILLO, Rosanna; SCHIRALDI, Chiara; CORSUTO, Luisana; D'AGOSTINO, Antonella; FILOSA, Rosanna; DE ROSA, Mario; LA GATTA, Annalisa. Optimization of hyaluronan-based eye drop formulations. **Carbohydrate Polymers**, Holanda, v. 153, p. 275–283, 2016. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.07.106. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.106>.

SCHRAGE, N. F.; LANGEFELD, S.; ZSCHOCKE, J.; KUCKELKORN, R.; REDBRAKE, C.; REIM, M. Eye burns: an emergency and continuing problem. **Burns**, Holanda, v. 26, p. 689–699, 2000.

SHARMA, Namrata; KAUR, Manpreet; AGARWAL, Tushar; SANGWAN, Virender S.; VAJPAYEE, Rasik B. Treatment of acute ocular chemical burns. **Survey of Ophthalmology**, Holanda, v. 63, n. 2, p. 214–235, 2018. DOI: 10.1016/j.survophthal.2017.09.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2017.09.005>.

SHARMA, P.; NEGI, P.; MAHINDROO, N. Recent advances in polymeric drug delivery carrier systems. **Advances in Polymers for Biomedical Applications**, Reino Unido, v. 24, n. 12, p. 369–388, 2018.

SINGH, Rashmi; GUPTA, Noopur; VANATHI, M.; TANDON, Radhika. Corneal transplantation in the modern era. **Indian J Med Res**, Índia, v. 150, n. Julho, p. 7–22, 2019. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR.

SLAVIN, Paul A.; SHEEN, David B.; SHEPHERD, Evelyn E. A.; SHERWOOD, John N.; FEEDER, Neil; DOCHERTY, Robert; MILOJEVIC, Snezana. Morphological

evaluation of the α -polymorph of indomethacin. **Journal of Crystal Growth**, EUA, v. 239, p. 300–305, 2002.

SOLIMAN, Karim; JONES, David; SOLIMAN, Karim A.; ULLAH, K.; SHAH, A.; JONES, David S.; SINGH, Thakur R. R. Poloxamer-based in situ gelling thermoresponsive systems for ocular drug delivery applications. **Drug Delivery Today**, EUA, v. 00, n. 00, p. 1–12, 2019. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.05.036.

SOLTANI, Behzad; NABIPOUR, Hafezeh; NASAB, Navid Ahmadi. Fabrication , controlled release and kinetic studies of indomethacin — Layered zinc hydroxide nanohybrid and its effect on viability of HFFF2 Fabrication , controlled release and kinetic studies of indomethacin — Layered zinc hydroxide nanohybrid and its. **Journal of Dispersion Science and Technology**, Reino Unido, v. 2691, n. October, p. 1–25, 2017. DOI: 10.1080/01932691.2017.1388178.

SPÖLER, Felix; SCHRAGE, Norbert F.; KURZ, Heinrich. Dynamic analysis of chemical eye burns using high- resolution optical coherence tomography. **Journal of Biomedical Optics**, EUA, v. 12, p. 1–6, 2022. DOI: 10.1117/1.2768018.

SRIDHAR, Mittanamalli S. Anatomy of cornea and ocular surface. **BMC Ophthalmology**, Suíça, v. 66, n. 2, p. 190–194, 2017. DOI: 10.4103/ijo.IJO.

STANZIONE, Antonella; POLINI, Alessandro; PESA, Velia La; ROMANO, Alessandro; QUATTRINI, Angelo; GIGLI, Giuseppe; MORONI, Lorenzo; GERVASO, Francesca. Development of Injectable Thermosensitive Chitosan-Based Hydrogels for Cell Encapsulation. **Applied sciences**, Reino Unido, v. 10, n. 6550, p. 1–14, 2020.

STEPP, Mary Ann; ZIESKE, James D.; TRINKAUS-RANDALL, Vickery; KYNE, Birana; PAL-GHOSH, Sonali; TADVALKAR, Gauri; PAJOOHESH-GANJO, Ahdeah. Wounding the Cornea to Learn How it Heals. **Exp Eye Res.** 2014, EUA, v. 72, n. 2, p. 181–204, 2011. DOI: 10.1016/j.exer.2014.02.007.Wounding.

VELEVSKA, Magdalena Antova; DUMA, Hristijan; TRPEVSKA, Natasha. Evaluation of corneal changes in chemical burns with anterior segment optical coherence tomography. **South-East European Journal of Ophthalmology**, Kosovo, v. 1, n. 1, p. 1–3, 2015.

VELLUTO, Diana; DEMURTAS, Davide; HUBBELL, Jeffrey A. PEG- b -PPS Diblock Copolymer Aggregates for Hydrophobic Drug Solubilization and Release: Cyclosporin A as an Example. **Molecular Pharmaceutics**, Reino Unido, v. 5, n. 4, p. 632–642, 2008.

WAGONER, Michael D. Chemical Injuries of the Eye: Current Concepts in Pathophysiology and Therapy. **Surv Ophthalmol**, EUA, v. 41, n. 4, p. 276–313, 1997.

WILSON, Steven E.; MOHAN, Rahul R.; MOHAN, Rajiv R.; AMBRO, Renato; HONG, Jongwook; LEE, Jongsoo. The Corneal Wound Healing Response: Cytokine-mediated Interaction of the Epithelium , Stroma , and Inflammatory Cells. **Progress in Retinal and Eye Research**, EUA, v. 20, n. 5, p. 625–637, 2001.

YANG, Cuixia et al. The High and Low Molecular Weight Forms of Hyaluronan Have Distinct Effects on CD44 Clustering. **The Journal of Biological Chemistry**, EUA, v. 287, n. 51, p. 43094–43107, 2012. DOI: 10.1074/jbc.M112.349209.

YANG, Guanghui; ESPANDAR, Ladan; MAMALIS, Nick; PRESTWICH, Glenn D. A cross-linked hyaluronan gel accelerates healing of corneal epithelial abrasion and alkali burn injuries in rabbits. **Veterinary Ophthalmology**, EUA, v. 13, n. 3, p. 144–150, 2010.. DOI: 10.1111/j.1463-5224.2010.00771.x.

YOON, Jinny J.; ISMAIL, Salim; SHERWIN, Trevor; YOON, Jinny J.; ISMAIL, Salim; SHERWIN, Trevor. Limbal stem cells : Central concepts of corneal epithelial homeostasis Limbal stem cells : Central concepts of corneal epithelial homeostasis. **World Journal of Stem Cells**, Califórnia, v. 26, n. 6, p. 391–403, 2016. DOI: 10.4252/wjsc.v6.i4.391.

ANEXOS

Anexo I: Parecer favorável para ensaio *in-vivo* sob nº 028/2021, emitido pelo CEUA (FUNED)



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS


Certificamos que o projeto intitulado "Colírio a base de hidrogel contendo indometacina e ácido hialurônico para tratamento tópico de ceratite química: desenvolvimento, caracterização e avaliação.", registrado com o nº 028/2021, sob a responsabilidade de Sílvia Ligório Fialho - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as Resoluções Normativas publicadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Portanto, o projeto foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Fundação Ezequiel Dias, no dia 15/12/2021.

Finalidade	Pesquisa
Vigência da autorização	15/12/2021 a 20/12/2022
Espécie/inhagem/raça	Coelhos Nova Zelândia
Nº de animais	15
Peso/Idade	2-3 meses (2-3 kg)
Sexo	Machos
Origem	DSI-Comércio, Importação e Exportação LTDA Chácara Flor do Vale, Esmeraldas, MG

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste parecer e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-FUNED o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e nas publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008 e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, ou seja, até 20/01/2023.

Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2021.


Clara Guerra Duarte
Coordenadora da CEUA/FUNED

Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira, Belo Horizonte, MG.
CEP 30510-010 Telefone: (31) 3314-4645