

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Janine Braga De Souza

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE
SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO TACROLIMUS EM MODELO
EXPERIMENTAL DA DOENÇA DO OLHO SECO**

Belo Horizonte

2024

Janine Braga De Souza

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE
SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO TACROLIMUS EM MODELO
EXPERIMENTAL DA DOENÇA DO OLHO SECO**

Tese submetida 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 Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior

Coorientadora: Dra. Sílvia Ligório Fialho

Belo Horizonte

2024

S729d Souza, Janine Braga de.
Desenvolvimento, caracterização e avaliação da eficácia de sistemas nanoestruturados contendo tacrolimus em modelo experimental da doença do olho seco [recurso eletrônico] / Janine Braga de Souza. – 2024.
1 recurso eletrônico (157 f. : il.) : pdf

Orientador: Armando Silva Cunha Júnior.
Coorientadora: Sílvia Ligório Fialho.

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

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Nanopartículas – Teses. 2. Ácido hialurônico – Teses. 3. Tacrolimo – Teses. 4. Síndromes do olho seco – Teses. 5. Modelos animais – Teses. 6. Biocompatibilidade – Teses. 7. Polímeros na medicina – Teses. I. Cunha Júnior, Armando Silva. II. Fialho, Sílvia 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

“DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO TACROLIMUS EM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DO OLHO SECO”

JANINE BRAGA DE SOUZA

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

Comissão

Profa. Dra. Jacqueline de Souza
Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Profa. Dra. Ana Carolina Guimarães Ribeiro
Faculdade de Minas - FAMINAS

Dra. Marina França Dias
Fundação Ezequiel Dias - FUNED

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, 1 de março de 2024.

Documento assinado eletronicamente por **Armando da Silva Cunha Junior**,



Membro, em 01/03/2024, às 12:41, 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 **Jacqueline de Souza, Usuária Externa**, em 01/03/2024, às 14:00, 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 **Marina França Dias, Usuária Externa**, em 01/03/2024, às 16:28, 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 **Guilherme Diniz Tavares, Usuário Externo**, em 01/03/2024, às 21:50, 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 **Sílvia Ligório Fialho, Usuário Externo**, em 27/03/2024, às 11:39, 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 **Ana Carolina Guimarães Ribeiro, Usuário Externo**, em 09/05/2024, às 18:37, 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 **3068402** e o código CRC **113B126B**.

Folhas novas no vigor da primavera e folhas secas que fertilizam o chão no descanso do outono. Inspirados pelos ensinamentos da natureza, seus ciclos e resiliência, dedico esse projeto à força e à constância da alma humana em alcançar nossos desejos de ir mais além, o que nos conduz a aprender e desaprender todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Com o coração cheio de alegria e com a consciência de como sou privilegiada pelas pessoas incríveis que fazem parte da minha vida, escrevo meus agradecimentos.

Agradeço a Deus e Santa'Ana por iluminarem meus caminhos.

Aos meus pais, Antônio e Maristela, pela referência de amor, determinação, humildade e por apoiarem todos os meus projetos. Aos meus irmãos, Giane, Gilvan, Jean, Junnyor e aos sobrinhos, Geovanna, Nicole e Gael, por trazerem mais cor e alegrias para os meus dias.

Ao Pedro, meu lovinho, pelo cuidado, amor, compreensão e estímulos constantes. Obrigada pela parceria de vida, pelas contribuições e por deixar tudo mais leve.

Ao professor Dr. Armando da Silva Cunha Junior, pela orientação, pelas trocas riquíssimas e pela oportunidade de expandir os meus horizontes e o pensamento crítico por meio da pesquisa. Obrigada por proporcionar a tranquilidade para continuarmos constantes no propósito.

À Dra. Sílvia Ligório Fialho pela coorientação, ensinamentos e disponibilidade. Obrigada pelas contribuições relevantes e valiosas durante a realização desse projeto.

A todos os integrantes do SDTF/FUNED pelo suporte na execução do trabalho, pela atenção e colaboração fundamentais nesse projeto. Agradeço especialmente à Gabriela por toda dedicação, motivação e empenho nas etapas experimentais.

Aos colegas do LTF 2031 e em especial à Brenda, Thomas, Julia, Michelle, Sarah, Luti e Carolina Nunes por sempre estarem dispostos a ajudar e pelos diálogos sempre calmos e produtivos.

Aos colaboradores do SCBio que forneceram com grande presteza todo o suporte para a realização dos testes *in vivo*, principalmente Dario e Lucas pela atenção e disponibilidade.

A todos os meus familiares, as minhas cunhadas Aline e Kelinha pelo carinho e a minha tia Marli pelo incentivo, gentileza e apoio em Belo Horizonte.

Agradeço também à Magali, ao Antonio e família Seniuk, pelo acolhimento, pelo amor e por serem de diversas formas, facilitadores nesse percurso.

Aos meus amigos, especialmente à Ramatisa, Michelle, Monaliza e Daniela pela amizade e por todo bem que me fazem desde sempre.

À Bruna de Godoy por me auxiliar a manter o equilíbrio, motivação e discernimento em meio a tantos desafios e demandas.

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade. Agradeço também o Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG pela realização das análises de microscopia e à Farmanguinhos, Bloomage e Evonik pela disponibilização de amostras para a realização dos experimentos.

Os meus sinceros e carinhosos agradecimentos a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse gratificante trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

A doença do olho seco (DED) é uma doença multifatorial do filme lacrimal e superfície ocular que causa desconforto, distúrbios visuais e instabilidade do filme lacrimal, com potencial dano à superfície ocular. Diversos estudos tem demonstrado o potencial de uso do tacrolimus (TAC), um fármaco imunossupressor, no tratamento da DED. Devido à baixa biodisponibilidade ocular de fármacos administrados por meio de colírios e considerando a alta prevalência da DED, justifica-se o desenvolvimento de novas opções eficazes e seguras para aumentar o tempo de residência pré-corneal e/ou a capacidade de penetração do fármaco e consequentemente para melhorar o tratamento da referida condição clínica. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi investigar a eficácia de sistemas poliméricos nanoestruturados contendo o TAC e com diferentes cargas superficiais para uso tópico ocular no tratamento da DED. O processo de fabricação da nanopartícula catiônica - NTAC - foi o método de deposição interfacial de polímero pré-formado utilizando como polímero o Eudragit® RL100. A nanopartícula revestida, aniônica - NTAC-HA - foi obtida pela adição de ácido hialurônico, na forma de hialuronato de sódio, à NTAC pela técnica de adsorção de superfície. Diferentes testes de caracterização físico-químicos foram realizados. A NTAC apresentou diâmetro médio de $166,7 \pm 0,29$ nm, índice de polidispersão de $0,061 \pm 0,01$, potencial zeta $+ 63,73 \pm 9,58$ mV e pH = $4,68 \pm 0,09$. Para a NTAC-HA, os valores foram: $227,2 \pm 1,30$ nm; $0,44 \pm 0,01$; $-30,03 \pm 0,55$ mV e $6,17 \pm 0,01$ respectivamente. A eficácia do revestimento foi comprovada pela inversão do potencial zeta da NTAC-HA comparado ao da NTAC. A eficiência de encapsulamento do fármaco na NTAC foi de $91,02\% \pm 0,71$. A caracterização morfológica permitiu que as duas nanoformulações obtidas fossem classificadas como nanocápsulas. Pela interação com a suspensão de mucina 1% foi possível verificar as propriedades mucoadesivas dos polímeros. O potencial de irritação ocular foi verificado pelo teste de membrana córion-alantoide de ovo embrionado (HET-CAM) e pelo teste de Draize (*in vivo*). A NTAC e a NTAC-HA foram classificadas como não irritantes. O modelo experimental de indução da DED foi realizado com o uso de sulfato de atropina 1%. A administração tópica uma vez por dia das nanoformulações, após a confirmação da indução e durante sete dias aumentou a produção de lágrimas, reestabeleceu a estabilidade do filme lacrimal e a integridade da camada epitelial das córneas dos animais. Assim, os resultados demonstraram o potencial uso das nanopartículas desenvolvidas no tratamento da DED.

Palavras-chave: nanopartículas catiônicas; nanopartículas aniônicas; ácido hialurônico; sistema coloidal híbrido; doença do olho seco; modelo animal; mucoadesão; estudos de biocompatibilidade ocular.

ABSTRACT

Dry eye disease (DED) is a multifactorial disease of the tears and ocular surface that results in symptoms of discomfort, visual disturbance, and tear film instability with potential damage to the ocular surface. Several studies have demonstrated the potential use of the immunomodulator tacrolimus (TAC) in dry eye treatment. Due to the low ocular bioavailability of drugs administered by eye drops and the high prevalence of DED disease, the development of new safe options to increase precorneal time and/or drug penetration is justified. Thus, the goal of this project was to investigate the efficacy of nanostructured polymeric systems containing TAC with opposite superficial surfaces for the topical ocular treatment of DED. The manufacturing process of the NTAC nanoparticle was by interfacial deposition of preformed polymer method. The polymer used was Eudragit® RL100. The coated (anionic) nanoparticles with hyaluronic acid (NTAC-HA) were prepared by the surface adsorption technique from preformed NTAC. Various physical characterization tests were performed. For NTAC, the particle size was 166.7 ± 0.29 nm, the polydispersibility index was 0.061 ± 0.01 , zeta potential was $+63.73 \pm 9.58$ mV and pH = 4.68 ± 0.09 . The NTAC-HA results were: 227.2 ± 1.30 nm; 0.44 ± 0.01 ; -30.03 ± 0.55 mV and 6.17 ± 0.01 respectively. The drastic inversion in the nanoparticle surface charge showed that the coating process was successfully and efficiently performed. The encapsulation efficiency of NTAC was $91.02\% \pm 0.71$. The nanoformulations were classified as nanocapsules by morphological analysis. The interaction between the polymers used to prepare the nanostructured systems and the mucin suspension (1%) showed their mucoadhesive properties. The ocular irritation study was performed using the Hen's egg chorioallantoic membrane test (HET-CAM) and the Draize test (in vivo), and both nanoformulations were classified as non-irritating. The in vivo DED model was chemically induced using atropine sulfate. Topical application of NTAC and NTAC-HA, after DED diagnostic confirmation, once a day for seven days, restored tear volume back to baseline, film stability and repaired damaged epithelial cells. Therefore, these findings clearly illustrate the potential of these nanoparticles for DED treatment.

Key-words: cationic polymeric nanoparticles; anionic nanoparticles; hyaluronic acid; hybrid colloidal systems; dry eye disease; animal model; mucoadhesion; biocompatibility studies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma das etapas da pesquisa.	26
Figura 2 - Representação esquemática das estruturas do olho divididas nas partes anterior e posterior.	28
Figura 3 - Representação dos componentes da unidade funcional da glândula lacrimal incluindo a regulação neural.(1) Impulsos transmitidos da córnea e da conjuntiva através de nervos aferentes sensoriais são recebidos no sistema nervoso central para estimular (2) nervos simpáticos e parassimpáticos eferentes que inervam os componentes celulares da glândula lacrimal (células epiteliais acinares e ductais), resultando em (3) secreção de fluido lacrimal contendo proteínas, eletrólitos e água que é entregue à superfície ocular através do sistema de dutos e posteriormente drenada pelo sistema de drenagem.	31
Figura 4 - Ciclo vicioso inflamatório na doença do olho seco. O ciclo vicioso inflamatório associado ao olho seco é resultante da hiperosmolaridade e instabilidade lacrimal que ativam vias de sinalização de estresse nas células da superfície ocular, liberação de citocinas (indução de marcadores inflamatórios) que causam danos à córnea, conjuntiva e glândula lacrimal. Fatores intrínsecos e extrínsecos provocam danos à superfície ocular o que pode resultar em um agravamento progressivo dos sintomas da doença do olho seco.	34
Figura 5 - Fórmula estrutural do tacrolimus.	38
Figura 6 - Representação esquemática dos principais interferentes na biodisponibilidade de fármacos após a administração tópica no segmento anterior do olho.	40
Figura 7 - Representação esquemática das diferenças entre as nanocápsulas e nanoesferas. .	44
Figura 8 - Fórmula estrutural do polímero Eudragit® RL100 (A) e unidade monomérica (B).	47
Figura 9 - Preparo de nanocápsulas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado.	64
Figura 10 - Formulação desenvolvida de nanopartículas contendo tacrolimus - NTAC.	64
Figura 11 - Formulação revestida com o ácido hialurônico – NTAC-HA desenvolvida a partir da NTAC.	65
Figura 12 - Distribuição de tamanho por intensidade da formulação polimérica nanoestruturada de tacrolimus (NTAC) após o preparo.	66
Figura 13 - Distribuição de tamanho por intensidade da formulação polimérica nanoestruturada de tacrolimus revestida com 0.3% de ácido hialurônico na forma de hialuronato de sódio (NTAC-HA) após o preparo.	68

Figura 14 - Distribuição do potencial zeta da formulação polimérica nanoestruturada de tacrolimus (NTAC) após o preparo.	69
Figura 15 - Distribuição do potencial zeta da formulação polimérica nanoestruturada de tacrolimus revestida com 0.3% de ácido hialurônico na forma de hialuronato de sódio (NTAC-HA) após o preparo.....	70
Figura 16 - Fotomicrografias de microscopia eletrônica de transmissão dos sistemas poliméricos nanoestruturados demonstrando o formato esférico bem definido e a evidência de formação de nanocápsulas. (A) - Formulação NTAC; (B) Formulação NTAC-HA. Barra da escala A.1; B.1: 200 nm (×43,000) e A.2; B.2: 100 nm (×87,000).	72
Figura 17 - Cromatogramas obtidos para a avaliação da seletividade do método analítico para quantificação de tacrolimus na formulação polimérica. (A) - solução padrão de tacrolimus (100 µg/mL); (B) - solução diluente (Acetonitrila:Metanol – (90:10)); (C) – fase móvel (Metanol:Solução de ácido fosfórico 0,1% (v/v) pH 2,5 (80:20)); (D) - Placebo (nanopartícula vazia); (E) - Placebo fortificado a 100% do fármaco.	74
Figura 18 - Curva analítica obtida na avaliação da linearidade.....	76
Figura 19 - Gráfico de resíduos da regressão.	76
Figura 20 - Resultados das medidas de potencial zeta da NTAC, da suspensão de mucina 1% e das misturas entre a suspensão de mucina 1% e NTAC (1:1; 1:2; 1:3). (T1) – leitura após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente e (T=60 min) - leitura após 60 minutos de incubação à temperatura ambiente. * Diferença estatística (P<0,05) entre NTAC e as outras amostras; ** diferença estatística (P<0,05) entre a suspensão de mucina 1% e as outras amostras; ns diferença não significativa.	78
Figura 21 - Resultados das medidas de potencial zeta da NTAC-HA, da suspensão de mucina 1% e das misturas entre a suspensão de mucina 1% e NTAC-HA (1:1; 1:2; 1:3). (T1) – leitura após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente e (T = 60 min) – leitura após 60 minutos de incubação à temperatura ambiente. *diferença estatística (P<0,05) entre NTAC-HA e as outras amostras; **diferença estatística (P<0,05) entre a suspensão de mucina 1% e as outras amostras; ns diferença não significativa.	79
Figura 22 - Perfil de transmissão da formulação NTAC – Lote 1, armazenada em temperatura ambiente - 22 °C . (A) Tempo 0 - logo após o preparo da formulação; (B) Tempo 1 - após 30 dias; (C) Tempo 2 – após 60 dias; (D) após 90 dias. Os perfis de transmissão foram nulos, ou seja, não houve variação maior que ±2% durante toda a leitura. A linha vertical pontilhada representa o menisco da amostra.....	84

Figura 23 - Perfil de transmissão da formulação NTAC – Lote 2, armazenada sob a condição de 40°C e 75% umidade relativa (A) Tempo 0 - logo após o preparo da formulação; (B) Tempo - após 30 dias; (C) Tempo 2 – após 60 dias; (D) após 90 dias. Os perfis de transmissão foram nulos, ou seja, não houve variação maior que $\pm 2\%$ durante toda a leitura. A linha vertical pontilhada representa o menisco da amostra.	85
Figura 24 - Perfil de transmissão da formulação NTAC – Lote 3, armazenada sob a condição de refrigeração – 2-8°C. (A) Tempo 0 - logo após o preparo da formulação; (B) Tempo - após 30 dias; (C) Tempo 2 – após 60 dias; (D) após 90 dias. Os perfis de transmissão foram nulos, ou seja, não houve variação maior que $\pm 2\%$ durante toda a leitura. A linha vertical pontilhada representa o menisco da amostra.	86
Figura 25 - Perfil de variação de retroespalhamento (ΔBS) da formulação NTAC – Lote 1, armazenada em temperatura ambiente - 22 °C. (A) Tempo 0 - logo após o preparo da formulação; (B) Tempo 1 - após 30 dias; (C) Tempo 2 – após 60 dias; (D) após 90 dias. O ΔBS foi $< 10\%$	88
Figura 26 - Perfil de variação de retroespalhamento (ΔBS) da formulação NTAC – Lote 2, sob a condição de 40°C e 75% umidade relativa . (A) Tempo 0 - logo após o preparo da formulação; (B) Tempo - após 30 dias; (C) Tempo 2 – após 60 dias; (D) após 90 dias. O ΔB foi $< 10\%$. .	89
Figura 27 - Perfil de variação de retroespalhamento (ΔBS) de tacrolimus sob a condição de refrigeração – 2-8°C (Nanopartícula Lote 3). (A) Tempo 0 - logo após o preparo da formulação; (B) Tempo - após 30 dias; (C) Tempo 2 – após 60 dias; (D) após 90 dias. O ΔB foi $< 10\%$	90
Figura 28 - Perfil de transmissão da formulação NTAC - HA, armazenada sob a condição de refrigeração (2 - 8°C). (A) Tempo 0 - logo após o preparo da formulação; (B) Tempo - após 30 dias; (C) Tempo 2 – após 60 dias; (D) após 90 dias. Os perfis de transmissão foram nulos, ou seja, não houve variação maior que $\pm 2\%$ durante toda a leitura. A linha vertical pontilhada representa o menisco da amostra.	94
Figura 29 - Perfil de variação de retroespalhamento (ΔBS) da formulação NTAC - HA, armazenada sob a condição de refrigeração (2 - 8°C). (A) Tempo 0 - logo após o preparo da formulação; (B) Tempo - após 30 dias; (C) Tempo 2 – após 60 dias; (D) após 90 dias.	95
Figura 30 - Definição de efeitos vasculares.	101
Figura 31 - Catarata incipiente e uveíte detectada na avaliação clínica realizada antes do início do teste de Draize no olho direito de um dos animais do estudo. Para esse animal, a formulação nanoestruturada foi administrada no olho esquerdo.	110

Figura 32 - Imagens obtidas por Tomografia de Coerência Óptica (OCT) antes e após 72 horas da instilação das formulações poliméricas de tacrolimus. Grupo Controle – sem administração das formulações poliméricas; Grupo NTAC – instilação de dose única (0,1 mL) da formulação polimérica nanoestruturada NTAC; Grupo NTAC-HA – instilação de dose única (0,1 mL) da formulação polimérica nanoestruturada revestida NTAC-HA..... 111

Figura 33 - Resultados das medidas da espessura total da córnea antes (T=0) e após 72 horas da instilação das formulações poliméricas nanoestruturadas de tacrolimus (T=2) . Grupo Controle – sem administração das formulações poliméricas; Grupo NTAC – instilação de dose única (0,1 mL) da formulação polimérica nanoestruturada NTAC; Grupo NTAC-HA – instilação de dose única (0,1 mL) da formulação polimérica nanoestruturada revestida NTAC-HA. 112

Figura 34 - Cortes histológicos das córneas extraídas após 72 horas do início do teste. (A) Grupo Controle – sem administração das formulações poliméricas; (B) Grupo NTAC – instilação de dose única (0,1 mL) da formulação polimérica nanoestruturada NTAC; (C) Grupo NTAC-HA – instilação de dose única (0,1 mL) da formulação polimérica nanoestruturada revestida NTAC-HA..... 113

Figura 35 - Representação gráfica do teste de Schimer (I) em milímetros (mm) para o grupo modelo de olho seco não tratado e para os grupos tratados com a formulação NTAC e NTAC-HA nos tempos T0 (início do experimento), T7 (sétimo dia de indução) e T14 (tempo final do experimento). Dados representam a média ± desvio de quatro coelhos com o total de oito olhos. Houve redução dos valores após sete dias de indução com sulfato de atropina. O grupo tratado com a NTAC demonstrou resultados ligeiramente melhores que a NTAC-HA no aumento da secreção lacrimal. 123

Figura 36 - Representação gráfica do teste de ruptura lacrimal em segundos para o grupo modelo de olho seco não tratado e para os grupos tratados com as formulações NTAC e NTAC - HA nos tempos T0 (início do experimento), T7 (sétimo dia de indução) e T14 (tempo final do experimento). Dados representam a média ± desvio de quatro coelhos com o total de oito olhos. *Diferença estatística (P<0,05) entre o TBUT do grupo não tratado e o tratado com a NTAC; **diferença estatística (P<0,05) entre o TBUT do grupo não tratado e o tratado com a NTAC - HA; ns diferença não significativa. 128

Figura 37 - Imagens obtidas por Tomografia de Coerência Óptica (OCT) o grupo modelo de olho seco não tratado (A) e para os grupos tratados com a formulação NTAC (B) e NTAC-HA (C) nos tempos T0 (início do experimento) , T7 (sétimo dia de indução) e T14 (tempo final do experimento). Dados representam a média ± desvio de quatro coelhos com o total de oito olhos.

Setas indicam a ação do sulfato de atropina na desestruturação da integridade da camada epitelial. 130

Figura 38 - Cortes histológicos das córneas extraídas após 14 dias de teste. (A) Grupo Controle – sem administração das formulações poliméricas; (B) Modelo de olho seco não tratado (C) Grupo NTAC; (D) Grupo NTAC-HA. Barra da escala A.1; B.1; C1; D1: 60 μm ($\times 10$) e A.2; B.2; C2; D2: 30 μm ($\times 20$). As setas indicam alterações na camada epitelial e perda celular devido à indução do olho seco..... 133

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais características das estruturas do segmento anterior do bulbo ocular. .	29
Quadro 2 - Composição final em % m/v dos constituintes da formulação polimérica NTAC.	55
Quadro 3 - Método cromatográfico para quantificação de tacrolimus.....	59
Quadro 4 - Correspondências do tempo acelerado e do tempo real (TAA = 20 °C , TRT 40°C / 75% UR).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diâmetro e distribuição de tamanho das formulações poliméricas nanoestruturadas de tacrolimus revestidas com ácido hialurônico na forma de hialuronato de sódio (NTAC-HA), em diferentes proporções.....	67
Tabela 2 - Resultados da avaliação das premissas dos resíduos da regressão.....	75
Tabela 3 - Resultados dos parâmetros físico-químicos utilizados para a avaliação da estabilidade da formulação NTAC em diferentes condições de armazenamento. Cada resultado representa a média de três leituras realizadas pelo equipamento e está expresso como média±desvio padrão (DP) . Para os resultados do estudo de estabilidade acelerada T1 = 4 meses; T2 = 8 meses e T3 = 12 meses de estabilidade real. * P<0,005	81
Tabela 4 - Resultados dos parâmetros físico-químicos utilizados para a avaliação da estabilidade da formulação NTAC-HA sob refrigeração (2 - 8°C). Cada resultado representa a média de três leituras realizadas pelo equipamento e está expresso como média±desvio padrão (DP) * P<0,005.....	91
Tabela 5 - Relação dos escores das reações observadas no teste HET-CAM com a classificação da irritação.	102
Tabela 6 - Parâmetros e escores do teste de Draize para avaliação da severidade das lesões oculares.....	104
Tabela 7 - Relação da pontuação total média das alterações observadas no teste de irritação ocular aguda (teste de Draize) com a classificação da irritação.	105
Tabela 8 - Constituição da solução de Davidson utilizada para fixação histológica.....	106
Tabela 9 - Resultados do teste em membrana córion-alantoide de ovo embrionado (HET-CAM) das formulações poliméricas nanoestruturadas de tacrolimus (NTAC e NTAC-HA).	108
Tabela 10 - Resultados do teste de Schimer (I) em milímetros (mm) para o grupo modelo de olho seco não tratado e para os grupos tratados com a formulação NTAC e NTAC-HA nos tempos T0 (início do experimento), T7 (sétimo dia de indução) e T14 (tempo final do experimento). Dados representam a média±desvio de quatro coelhos com o total de oito olhos.	121
Tabela 11 - Análise visual das alterações oculares durante o período de experimentação. ..	122
Tabela 12 - Resultados do teste de ruptura lacrimal em segundos (s) para o grupo modelo de olho seco não tratado e para os grupos tratados com a formulação NTAC e NTAC-HA nos tempos T0 (início do experimento), T7 (sétimo dia de indução) e T14 (tempo final do	

experimento. Dados representam a média \pm desvio de quatro coelhos com o total de oito olhos.

..... 125

Tabela 13 - Padrões do TBUT/ aparência do filme lacrimal com o uso de lâmpada de fenda para o grupo modelo de olho seco não tratado e para os grupos tratados com a formulação NTAC e NTAC-HA nos tempos T0 (início do experimento), T7 (sétimo dia de indução) e T14 tempo final do experimento). Seta indica alguns pontos/área de quebra. 127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variância
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais (do inglês - <i>American Society for Testing and Materials</i>)
DAD	Detector de Arranjo De Diodos
DED	Doença do Olho Seco
DEQ	Questionário de Olho Seco (do inglês - <i>Dry Eye Questionnaire</i>)
DEWS	<i>Dry Eye Workshop Group</i>
DP	Desvio Padrão
EE%	Eficiência De Encapsulamento
FDA	<i>Food And Drug Administration</i>
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
HA	Ácido Hialurônico na Forma de Hialuronato de Sódio
HET-CAM	Teste De Ovo De Galinha-Teste Da Membrana Corioalantóica (do inglês - <i>Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane</i>)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IS	Índice de Severidade
ISO	Organização Internacional para Padronização (do inglês - <i>International Organization for Standardization</i>)
IP	Índice de Polidispersão
MAS	Pontuação Média Máxima (do inglês <i>Maximum Average Score</i>)
NTAC	Nanopartículas Contendo o Fármaco Tacrolimus
NTAC - HA	Nanopartículas Contendo o Fármaco Tacrolimus Revestida com Ácido Hialurônico na Forma de Hialuronato de Sódio
OSDI	Índice Da Doença Da Superfície Ocular (do inglês <i>Ocular Surface Disease Index</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
p/v	Peso por Volume
rpm	Rotação por minuto
T	Tempo
TAC	Tacrolimus
OCT	Tomografia de Coerência Óptica (do inglês - <i>Optical Coherence Tomography</i>)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USA	<i>United States of America</i>
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
v/v	Volume por Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

nm	Nanômetro
mV	Milivolt
mOsm	Miliosmol
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
UR	Umidade relativa
°C	Graus <i>Celsius</i>
μL	Microlitro
MDa	Megadalton
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA.....	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	Contextualização dos conceitos relacionados aos aspectos oculares.....	28
2.1.1	Anatomia do segmento anterior do bulbo ocular.....	28
2.1.2	Importância do filme lacrimal no segmento anterior do olho	30
2.2	Aspectos gerais e patofisiologia da doença do olho seco	32
2.2.1	Desafios no diagnóstico da doença do olho seco	34
2.2.2	Desafios no tratamento da doença do olho seco.....	36
2.3	Tacrolimus e o seu uso <i>off label</i> para o tratamento de doenças oftalmológicas.....	37
2.4	Novas estratégias para formulação (veiculação) de fármacos de uso oftálmico no segmento anterior do olho	39
2.4.1	Fatores interferentes para a efetiva biodisponibilidade de fármacos após a administração tópica no segmento anterior do olho	39
2.4.2	Nanotecnologia como estratégia para veiculação de fármacos de uso oftálmico	41
2.4.2.1	Fundamentos físico-químicos e propriedades gerais de nanossistemas para entrega ocular	43
2.4.2.2	Utilização de polímeros mucoadesivos nos sistemas de entrega de fármacos de uso oftálmico	45
3	OBJETIVOS	50
3.1	OBJETIVO GERAL	51
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO TACROLIMUS (NTAC; NTAC-HA)	53
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.1.1	Materiais	54

4.1.2	Equipamentos	54
4.1.3	Métodos	55
4.1.3.1	Desenvolvimento e preparo dos sistemas poliméricos nanoestruturados contendo tacrolimus.....	55
4.1.3.1.1	Revestimento com ácido hialurônico das nanoformulações poliméricas contendo tacrolimus.....	56
4.1.3.2	Caracterização físico-química dos sistemas poliméricos nanoestruturados ...	56
4.1.3.2.1	Diâmetro e distribuição de tamanho.....	56
4.1.3.2.2	Avaliação da carga da superfície.....	57
4.1.3.2.3	Medida de pH.....	57
4.1.3.2.4	Morfologia.....	57
4.1.3.2.5	Eficiência de encapsulação.....	58
4.1.3.2.6	Avaliação da propriedade de mucoadesão	60
4.1.3.2.7	Estudos iniciais de estabilidade física dos sistemas poliméricos nanoestruturados	61
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.2.1	Desenvolvimento e preparo dos sistemas poliméricos nanoestruturados contendo o fármaco tacrolimus.....	63
4.2.2	Caracterização físico-química dos sistemas poliméricos nanoestruturados	65
4.2.2.1	Diâmetro e distribuição de tamanho	66
4.2.2.2	Avaliação da carga de superfície	68
4.2.2.3	Medida de pH.....	71
4.2.2.4	Morfologia	72
4.2.2.5	Eficiência de encapsulação	73
4.2.2.6	Avaliação da propriedade de mucoadesão	77
4.2.2.7	Estudos iniciais de estabilidade física dos sistemas poliméricos nanoestruturados	79
4.2.2.7.1	Estudos de estabilidade da formulação NTAC	80

4.2.2.7.2	Estudos de estabilidade da formulação NTAC-HA	91
4.3	CONCLUSÕES	96
5	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO OCULAR DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO TACROLIMUS (NTAC; NTAC-HA)	98
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS	99
5.1.1	Materiais	99
5.1.2	Equipamentos	99
5.1.3	Animais.....	99
5.1.4	Métodos	100
5.1.4.1	Avaliação do perfil de toxicidade dos sistemas poliméricos nanoestruturados 100	
5.1.4.1.1	Avaliação da toxicidade pelo teste em membrana córion-alantoide de ovo embrionado (método <i>in vitro</i>).....	100
5.1.4.1.2	Avaliação da toxicidade pelo teste ocular de Draize (método <i>in vivo</i>)	103
5.1.4.1.3	Testes complementares para verificação de alterações na estrutura da córnea 105	
5.1.4.1.3.1	Técnica de Tomografia de Coerência Óptica (OCT)	105
5.1.4.1.3.2	Histologia	106
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
5.2.1	Avaliação da toxicidade pelo teste em membrana córion-alantoide de ovo embrionado (método <i>in vitro</i>).....	107
5.2.2	Avaliação da toxicidade pelo teste ocular de Draize (método <i>in vivo</i>)	109
5.2.3	Testes complementares para verificação de alterações na estrutura da córnea	110
5.2.3.1	Técnica de Tomografia de Coerência Óptica (OCT).....	110
5.2.3.2	Histologia.....	112
5.3	CONCLUSÕES	114
6	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO TACROLIMUS (NTAC; NTAC-HA) EM MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL DE INDUÇÃO DA DOENÇA DO OLHO SECO.....	116

6.1	MATERIAIS E MÉTODOS	117
6.1.1	Materiais	117
6.1.2	Equipamentos	117
6.1.3	Animais.....	117
6.1.4	Métodos	118
6.1.4.1	Avaliação da eficácia do tacrolimus nos sistemas poliméricos nanoestruturados	118
6.1.4.1.1	Desenvolvimento experimental do modelo da doença do olho seco em coelhos	118
6.1.4.1.2	Confirmação do diagnóstico do modelo induzido da doença do olho seco em coelhos e avaliação da eficácia do tacrolimus nos sistemas nanoestruturados.....	118
6.1.4.1.2.1	Avaliação/medida da produção de lágrimas (Teste de Schirmer).....	119
6.1.4.1.2.2	Teste de ruptura lacrimal (break-up time).....	119
6.1.4.1.3	Testes complementares para avaliação de danos à superfície ocular e da eficácia do tacrolimus nos sistemas nanoestruturados	119
6.1.4.1.3.1	Técnica de Tomografia de Coerência Óptica (OCT).....	119
6.1.4.1.3.2	Histologia	120
6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
6.2.1	Desenvolvimento experimental do modelo da doença do olho seco em coelhos	120
6.2.2	Confirmação do diagnóstico do modelo de indução da doença do olho seco em coelhos e avaliação da eficácia do tacrolimus nos sistemas nanoestruturados.....	121
6.2.2.1	Avaliação/medida da produção de lágrimas (Teste de Schirmer)	121
6.2.2.2	Teste de ruptura lacrimal (break-up time)	124
6.2.3	Testes complementares para avaliação de danos à superfície ocular e da eficácia do tacrolimus nos sistemas nanoestruturados	129
6.2.3.1	Técnica de Tomografia de Coerência Óptica (OCT).....	129
6.2.3.2	Histologia.....	132
6.3	CONCLUSÕES	137

7	CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	138
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
	ANEXOS	156

1 INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

As doenças oculares são um grande problema de saúde pública e impactam significativamente a qualidade de vida, o estado psicológico e as oportunidades educacionais e profissionais dos pacientes (PAULSEN *et al.*, 2014; MORTHEM *et al.*, 2021). Dados da Organização Mundial da Saúde informam que globalmente mais de 2.2 bilhões de pessoas possuem algum tipo de deficiência visual e pelo menos 1 bilhão de pessoas não possuem acesso aos serviços oftalmológicos e vivem desnecessariamente com a visão comprometida (WHO, 2023). Dentre as condições clínicas de alta prevalência mundial e que possui um ritmo acelerado de crescimento, destaca-se a doença do olho seco (do inglês *dry eye disease* - DED). De acordo com estudos epidemiológicos realizados globalmente, a prevalência da síndrome de olho seco varia de 5 a 50% (STAPLETON *et al.*, 2017). Estima-se que cerca de 344 milhões de pessoas são direta ou indiretamente afetadas pela DED (ZHMUD *et al.*, 2023). A etiopatologia da doença é variada e está associada à fatores imunológicos, genéticos, terapêuticos, hormonais e ambientais (NELSON *et al.*, 2017; CRAIG *et al.*, 2017).

De acordo com a Sociedade de Superfície Ocular e Filme Lacrimal, e o *Dry Eye Workshop (Tear Film and Ocular Surface Society and Dry Eye Workshop - TFOS DEWS II)*, a doença do olho seco é uma doença multifatorial da superfície ocular, caracterizada pela perda da homeostase do filme lacrimal e acompanhada de sintomas oculares, em que a instabilidade e hiperosmolaridade do filme lacrimal, inflamação e danos da superfície ocular e anormalidades neurosensoriais desempenham papéis etiológicos (NELSON *et al.*, 2017; CRAIG *et al.*, 2017). As terapias utilizadas para o tratamento da doença do olho seco incluem lágrimas artificiais, anti-inflamatórios, uso de lentes de contato, oclusão de pontos lacrimais e diversas técnicas cirúrgicas (JONES *et al.*, 2017). Entretanto, não há um algoritmo direto para o estabelecimento do protocolo terapêutico visto que a DED abrange muitas condições subjacentes e mecanismos fisiopatológicos diferentes. A terapia é complexa e deve ser determinada de acordo com a causa, severidade e, de paciente para paciente (NELSON *et al.*, 2017). Nesse sentido, justifica-se e faz-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias eficazes e de baixo custo para contribuir no gerenciamento/manejo do tratamento da DED (FONSECA *et al.*, 2010; NELSON *et al.*, 2017; LV *et al.*, 2024).

O tacrolimus é um imunossupressor utilizado nos casos de rejeição de transplantes. Diversos estudos clínicos têm sido realizados para avaliar a efetividade do tacrolimus no tratamento de doenças oculares mediadas por reações imunológicas (BERTELMANN, 2004; ZHAI *et al.*, 2011; SHOUGHY, 2017; MOAWAD *et al.*, 2022). Entretanto, devido à alta hidrofobicidade, alta massa molecular (804,03 g/mol), e baixa solubilidade aquosa do fármaco, a biodisponibilidade ocular é limitada (ZENG *et al.*, 2016; KOVAČEVIĆA; MÜLLERA;

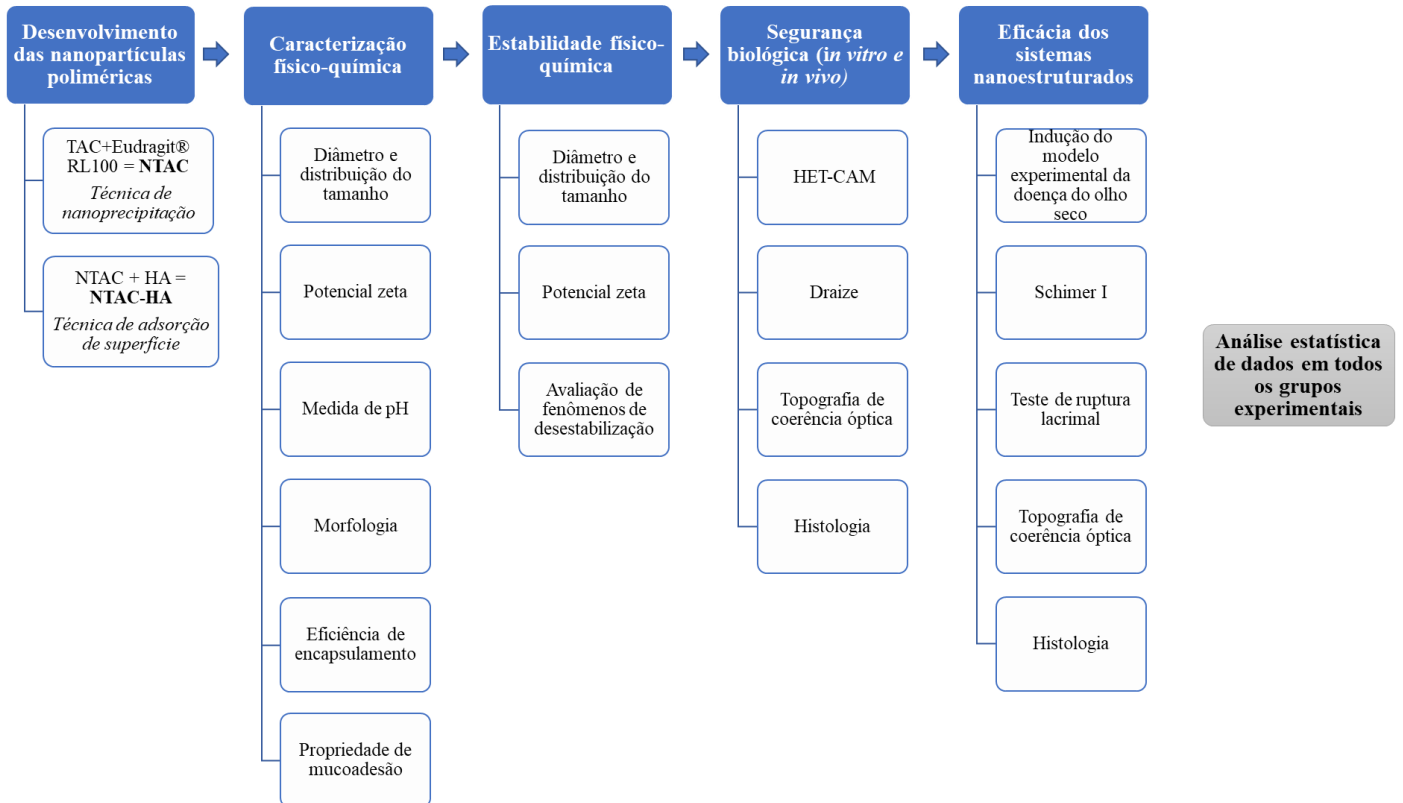
KECKC, 2020). Além disso, acrescenta-se como fatores interferentes após a administração tópica de fármacos no segmento anterior do olho, a drenagem lacrimal, o filme lacrimal, o ato de piscar e as barreiras anatômicas oculares incluindo a córnea e as barreiras conjuntivais (SWETLEDGE *et al.*, 2021). Novas abordagens para aumentar a biodisponibilidade ocular de fármacos administrados pela via tópica tem sido extensamente investigadas (WENG *et al.*, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2021; AMRUTKAR; PATIL, 2023). São estratégias que podem reduzir a degradação, aumentar o tempo de residência na superfície ocular, melhorar a interação com o epitélio corneano e conjuntival e conseqüentemente, a biodisponibilidade ocular dos fármacos (REIMONDEZ-TROITIÑO *et al.*, 2015; ONUGWU *et al.*, 2023). Uma das abordagens é o uso da nanotecnologia para desenvolver sistemas de entrega adaptados para superar as barreiras associadas aos olhos (REIMONDEZ-TROITIÑO *et al.*, 2015; AMRUTKAR; PATIL, 2023). As nanopartículas possuem como vantagens, dentre os demais sistemas nanoestruturados, o alto potencial de escalabilidade, baixa toxicidade, alta compatibilidade, maior estabilidade química e método de fabricação simples e econômico (KHAN, *et al.*, 2019; ONUGWU *et al.*, 2023). Além disso, as nanopartículas constituídas de polímeros mucoadesivos, tem demonstrado resultados promissores no tratamento da doença do olho seco e de outras doenças oftalmológicas (CASTRO *et al.*, 2020; DAVE *et al.*, 2021; BURHAN *et al.*, 2021).

Assim, considerando a alta prevalência da DED, seu impacto na função visual dos pacientes e a necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias para entrega de fármacos no local alvo no olho e com baixa/não frequentes aplicações, o presente estudo tem como objetivo desenvolver dois sistemas nanoestruturados, classificados como nanopartículas poliméricas, eficazes e seguros para uso tópico, no tratamento da DED. Um dos sistemas, consistirá de cargas positivas, pelo o uso do Eudragit® RL 100, que é um polímero reconhecido pela segurança e tolerância ocular e que tem sido estudado como estratégia em nanocarreadores oftálmicos (PIGNATELLO; BUCOLO; PUGLIS, 2002; KATARA; MAJUMDAR, 2013). O outro, com um caráter de potencial tecnológico, será um sistema coloidal híbrido, com carga superficial negativa, resultado do revestimento da nanopartícula pré-formada de Eudragit® RL100, com o ácido hialurônico, na forma de hialuronato de sódio, um polissacarídeo natural, biocompatível e biodegradável (FALLACARA *et al.*, 2018). A proposta e a inovação desse trabalho é a obtenção de dados, escassos na literatura, para avaliar os efeitos de sistemas nanoestruturados com diferentes propriedades eletrostáticas, em relação à segurança biológica e efetividade, em modelo animal, induzido com a DED e a obtenção de formulações simples,

de baixo custo, estáveis e interessantes para a transferência do projeto para aplicação no mercado farmacêutico como potenciais formulações de tratamento da DED.

O resumo do desenho experimental pode ser verificado pelo fluxograma apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma das etapas da pesquisa.



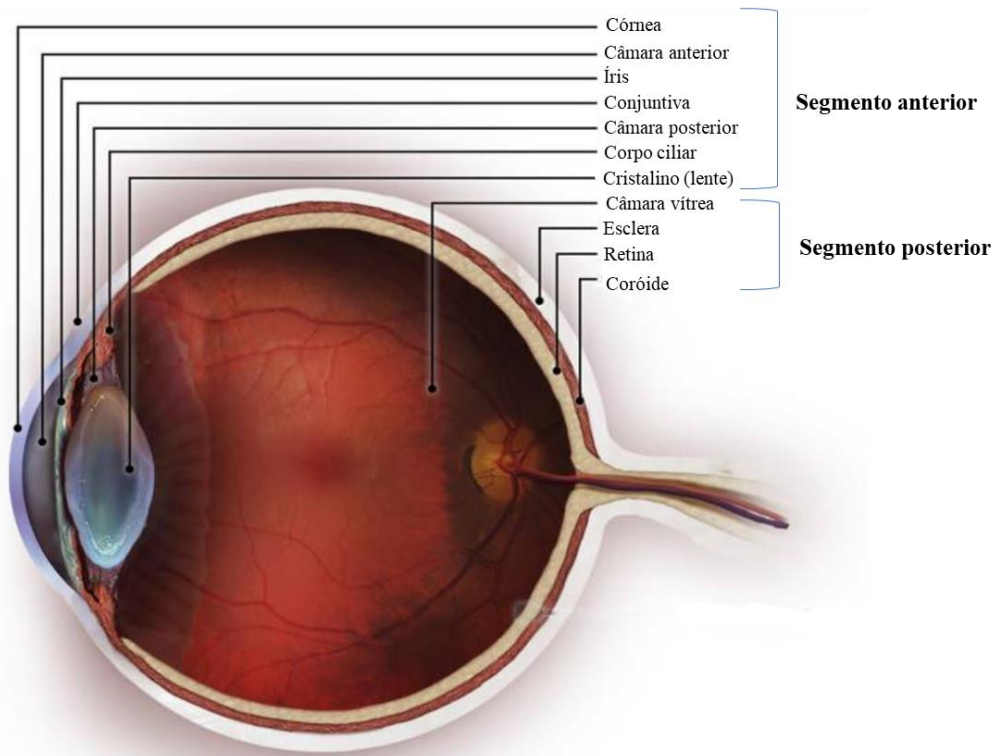
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Contextualização dos conceitos relacionados aos aspectos oculares

2.1.1 Anatomia do segmento anterior do bulbo ocular

O olho humano é responsável pelo início do processo visual, captando a luz refletida pelos objetos e transformando-a em sinais elétricos que podem ser reconhecidos e processados pelo cérebro. É um órgão de estrutura globular, composto por diferentes estruturas e tecidos, estruturados em duas partes principais: segmento anterior e posterior (Figura 2) (PUTZ, 2001). As duas partes possuem várias barreiras biológicas para proteger o olho de substâncias estranhas (WENG *et al.*, 2017).

Figura 2 - Representação esquemática das estruturas do olho divididas nas partes anterior e posterior.



Fonte: Adaptado de SWETLEDGE *et al.*, 2021

O segmento anterior é a parte do globo ocular anterior à lente (cristalino) e é composto pela córnea, conjuntiva, íris, lente (cristalino), corpo ciliar e a porção anterior da esclera. É ainda dividido em duas câmaras, a anterior (entre a superfície posterior da córnea e a íris) e a posterior (entre a superfície posterior da córnea e a íris), que são conectadas pela abertura da pupila e preenchidas com humor aquoso secretado pelos processos ciliares. O humor aquoso auxilia na refração do olho, fornece nutrientes para o cristalino e a córnea, mantém a pressão intraocular e é substituído/renovado várias vezes ao dia (PUTZ 2001; WENG *et al.*, 2017;

JANAGAM; WU; LOWE, 2017 ; ALMEIDA *et al.*, 2021; SWETLEDGE *et al.*, 2021). As principais características das principais estruturas do segmento anterior estão descritas no Quadro 1 (PUTZ, 2001; ORÉFICE; PEREIRA; MANUSUR, 2006) .

Quadro 1 - Principais características das estruturas do segmento anterior do bulbo ocular.

Estrutura	Principais características
Córnea	<ul style="list-style-type: none"> • Tecido transparente e avascular, composta por cinco camadas : epitélio (função barreira hidrofílica); membrana de Bowman; estroma (função barreira lipofílica); membrana de Descemet; endotélio (função barreira lipofílica). • Principal função: óptica, sendo responsável por cerca de 70% do poder refrativo do olho e principal barreira de proteção à agentes externos.
Conjuntiva	<ul style="list-style-type: none"> • Membrana mucosa transparente que recobre a superfície interna das pálpebras e a esclera anterior • Principal função: Envolvida na formação e manutenção do filme lacrimal e também na proteção da superfície ocular de patógenos ambientais.
Íris	<ul style="list-style-type: none"> • A íris é a porção refletida da túnica vascular e apresenta-se como uma superfície plana com uma abertura central redonda, a pupila. É composta por três camadas: lâmina marginal anterior, estroma e epitélio. • Principal função: A íris controla a quantidade de luz que penetra no olho
Lente (cristalino)	<ul style="list-style-type: none"> • Lente transparente, biconvexa, semi-sólida e avascular, localizada posteriormente à íris e ligada ao corpo ciliar através das zônulas • Principal função: reflexo de acomodação
Corpo ciliar	<ul style="list-style-type: none"> • Estende-se desde à íris, fazendo parte do ângulo camerular, anteriormente, até a ora serrata, posteriormente. • Principal função: os processos ciliares são responsáveis pela formação do humor aquoso e pelo processo de acomodação.

Fonte: PUTZ, 2001; ORÉFICE; PEREIRA; MANUSUR, 2006

A parte posterior é composta pela câmara vítrea, retina, coróide e porção posterior da esclera. O humor vítreo é um hidrogel, formado por fibras de colágeno, ácido hialurônico e

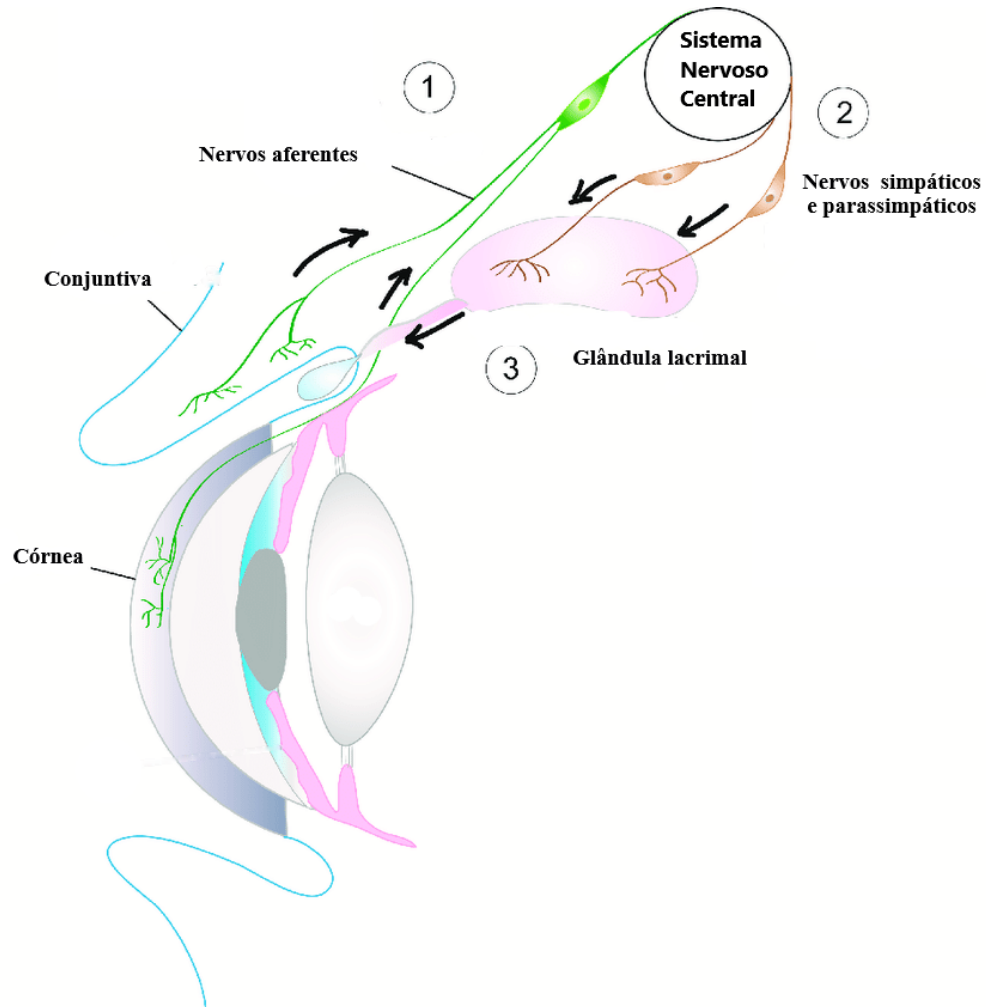
água. Ele permite que a luz chegue à retina e que os alimentos se difundam desde o corpo ciliar até a retina (PUTZ, 2001; WENG *et al.*, 2017; JANAGAM; WU; LOWE, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2021; SWETLEDGE *et al.*, 2021).

2.1.2 Importância do filme lacrimal no segmento anterior do olho

O filme lacrimal é a interface entre o epitélio da superfície ocular e o meio ambiente e é produzido pelos tecidos epiteliais e glandulares (córnea, conjuntiva bulbar e palpebral e glândulas palpebrais lacrimais e acessórias), considerados como a unidade lacrimal (ROLANDO; ZIERHUT, 2001; SWEENEY; MILLAR; RAJU, 2013; YAZDANI, 2019). A unidade lacrimal também possui um componente neural que consiste na ativação via estímulos dos nervos sensoriais aferentes da córnea e conjuntiva que se projetam através do sistema nervoso central para estimular os nervos parassimpáticos e simpáticos eferentes que inervam a glândula lacrimal, as células secretoras da glândula lacrimal e os ductos excretórios da glândula lacrimal e então induzem a secreção do fluido da glândula lacrimal para a superfície ocular e que posteriormente é drenada através do sistema de drenagem lacrimal (Figura 3) (DARTT, 2009; WILLCOX *et al.*, 2017). A disfunção de qualquer componente da unidade funcional lacrimal pode alterar a qualidade ou quantidade das lágrimas e resultar em condições clínicas oftalmológicas (PUTZ, 2001; ROLANDO; ZIERHUT, 2001; PFLUGFELDER; STERN, 2020).

A composição do filme lacrimal é complexa e é constituída de três camadas classificadas como lipídica, aquosa e mucosa e que incluem como componentes água, eletrólitos, proteínas, lipídeos, mucinas (WILLCOX *et al.*, 2017; PFLUGFELDER; STERN, 2020). O volume de lágrimas em um olho normal é de aproximadamente 6 μL com a possibilidade de armazenamento temporário no saco lacrimal de cerca de 30 μL (ALDRICH *et al.*, 2013) O pH médio é de 7,35 (faixa 7,3 - 7,7) e filme lacrimal possui uma fina espessura de aproximadamente 7,5 μm (PUTZ, 2001; AULTON; TAYLOR, 2016; WILLCOX *et al.*, 2017).

Figura 3 - Representação dos componentes da unidade funcional da glândula lacrimal incluindo a regulação neural. (1) Impulsos transmitidos da córnea e da conjuntiva através de nervos aferentes sensoriais são recebidos no sistema nervoso central para estimular (2) nervos simpáticos e parassimpáticos eferentes que inervam os componentes celulares da glândula lacrimal (células epiteliais acinares e ductais), resultando em (3) secreção de fluido lacrimal contendo proteínas, eletrólitos e água que é entregue à superfície ocular através do sistema de dutos e posteriormente drenada pelo sistema de drenagem.



Fonte: Adaptado de DARTT 2009 e MASLI; DARTT, 2020

O filme lacrimal possui várias funções importantes para a manutenção do metabolismo ocular, dentre elas: a óptica que promove a regularidade da superfície corneana, proteção do epitélio da superfície ocular contra agentes ambientais, como poluentes, micróbios e condições ambientais adversas como baixa umidade; lubrificação da superfície da córnea e conjuntiva, prevenindo danos nas células epiteliais; fornecer nutrientes à córnea e além disso, inibir o desenvolvimento de micro-organismos na conjuntiva e na córnea pelo fluxo mecânico e pela ação antimicrobiana do fluido lacrimal pelas enzimas, imunoglobulinas e leucócitos. Portanto, a manutenção da estabilidade do filme lacrimal é essencial para a manutenção do conforto, saúde e qualidade da visão (PUTZ, 2001; PFLUGFELDER; STERN, 2020). A estabilidade

lacrimal requer uma interação dinâmica entre os principais constituintes da lágrima, principalmente pela camada lipídica (monomolecular e secretada pelas glândulas Meibomius) e pela camada mucosa composta pelas glicoproteínas (PUTZ, 2001; WILLCOX *et al.*, 2017). A instabilidade do filme lacrimal é a característica principal da disfunção/deficiência lacrimal e, por isso, testes para medidas da instabilidade são clinicamente importantes tanto para o diagnóstico como na avaliação de tratamentos para os estados de olho seco (SWEENEY; MILLAR; RAJU, 2013).

A doença do olho seco é a mais frequente alteração da fisiologia do filme lacrimal e é o foco desse trabalho. Essas alterações também estão presentes em patologias congênitas (exemplo: hipoplasia ou aplasia da glândula lacrimal) e adquiridas (exemplos: fibrose pulmonar, alterações) que causam déficit de secreção ou aumento de evaporação. Além disso, fatores ambientais como aumento da temperatura ambiente, exposição a aparelhos de ar condicionado e diminuição da umidade promovem evaporação mais rápida. Acrescenta-se que também podem existir estados hiper-secretórios resultantes de estímulos mecânicos e emocionais e que também há a interferência dos agentes irritativos como fumaça e substâncias alergênicas (PUTZ, 2001).

2.2 Aspectos gerais e patofisiologia da doença do olho seco

A doença do olho seco (DED), também conhecida como ceratoconjuntivite seca, síndrome do olho seco ou síndrome da lágrima disfuncional é uma doença de grande prevalência mundial e trata-se de um grande problema de saúde pública (JAVADI; FEIZI, 2011; LIN; YIU, 2014; YAMAGUCHI, 2018). De acordo com estudos epidemiológicos realizados globalmente, a prevalência da síndrome de olho seco varia de 5 a 50% (STAPLETON *et al.*, 2017). Estima-se que cerca de 344 milhões de pessoas são direta ou indiretamente afetadas pela DED (ZHMUD *et al.*, 2023).

De acordo com a Sociedade de Superfície Ocular e Filme Lacrimal, e o *Dry Eye Workshop (Tear Film and Ocular Surface Society and Dry Eye Workshop - TFOS DEWS II)*, a nova definição da doença do olho seco (DED) a caracteriza como uma doença multifatorial da superfície ocular, caracterizada pela perda da homeostase do filme lacrimal e acompanhada de sintomas oculares, em que a instabilidade e hiperosmolaridade do filme lacrimal, inflamação e danos da superfície ocular e anormalidades neurosensoriais desempenham papéis etiológicos (CRAIG *et al.*, 2017; NELSON *et al.*, 2017).

A etiopatologia da doença é variada e está associada à fatores imunológicos, genéticos, terapêuticos, hormonais e ambientais (SULLIVAN *et al.*, 2017; CRAIG *et al.*, 2017). A DED é frequentemente maior em mulheres do que em homens, devido às questões hormonais e as diferenças se tornam mais significativas com a idade (STAPLETON *et al.*, 2017). O uso de lentes de contato e tempo excessivo de uso de telas (computadores/celulares) também são fatores interferentes. Alguns estudos tem demonstrado a alta prevalência da DED durante a pandemia de COVID-19 devido ao tempo prolongado de exposição às plataformas digitais e a diminuição do ato de piscar os olhos (MCDONALD *et al.*, 2016; EZINNE *et al.*, 2023; ABERAME *et al.*, 2023).

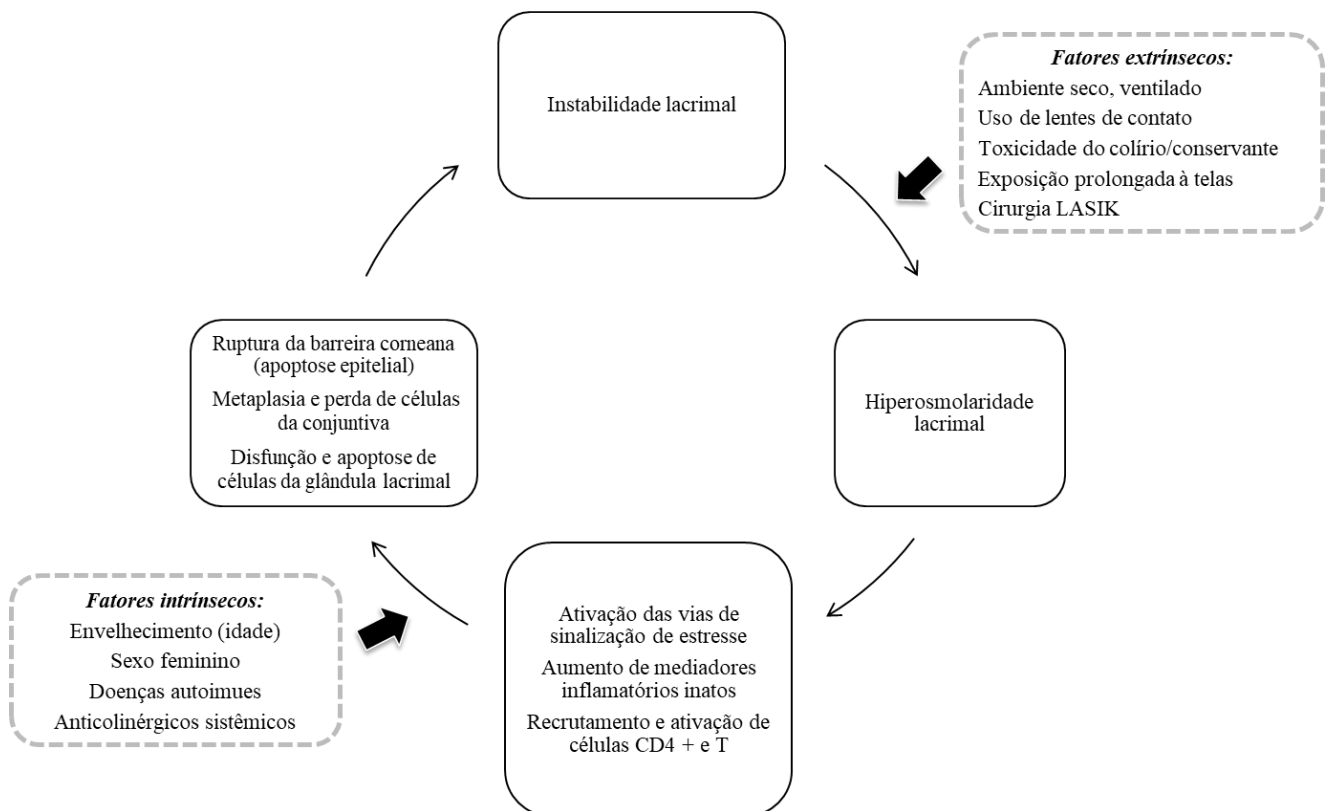
Os sintomas típicos da doença incluem vermelhidão, secura, desconforto, coceira, queimação, irritação, dor, fotofobia e sensação de corpo estranho acompanhados por uma visão turva ou dupla (PAULSEN *et al.*, 2014; STAPLETON *et al.*, 2017). Esse quadro sintomático pode impactar significativamente na qualidade de vida relacionada à saúde das pessoas, incluindo o aumento do risco de surgimento de desordens mentais como a depressão e a ansiedade (PAULSEN *et al.*, 2014; BARABINO *et al.*, 2016; MORTHEM *et al.*, 2021).

A DED é dividida em duas categorias básicas: olho seco por deficiência aquosa e olho seco evaporativo apesar de também ser possível formas híbridas da doença (CRAIG *et al.*, 2017; NELSON *et al.*, 2017). A por deficiência aquosa é subdividida em síndrome do olho seco de *Sjogren* (subdividia em primária e secundária) e síndrome do olho seco *não-Sjogren*, relacionada à deficiência da glândula lacrimal, a obstrução do ducto lacrimal, a hiposecreção reflexa e ao uso de medicamentos sistêmicos. O olho seco evaporativo é subdividido entre desordens com mecanismos intrínsecos (como a disfunção das glândulas de Meibômio, desordens da abertura palpebral, ou redução do piscar) e desordens com mecanismos extrínsecos (como deficiência de vitamina A ou uso de lentes de contato). Essas divisões, em conjunto com os fatores ambientais, devem ser utilizadas na identificação da causa do olho seco em cada paciente (CRAIG *et al.*, 2017).

De maneira geral, o “ciclo vicioso inflamatório” atua como fator principal na DED (BAUDOUIN *et al.*, 2007; NELSON *et al.*, 2017), independente da categoria (deficiência aquosa e/ou olho seco evaporativo), e é composto resumidamente pela hiperosmolaridade lacrimal que é a alteração da composição da lágrima pelo aumento na concentração de solutos e ocorre no olho seco, pela redução do volume da fração aquosa, o que resulta em lubrificação inadequada na superfície ocular e danos à superfície ocular (MARQUES *et al.*, 2015; NELSON *et al.*, 2017). O aumento da osmolaridade da lágrima resulta em diferenciação anormal, perda acelerada das células epiteliais, indução de marcadores inflamatórios, instabilidade do filme

lacrimal, o que resulta em pontos secos na córnea e na conjuntiva. Essa sequência de eventos resulta em um ciclo contínuo que provoca o agravamento progressivo dos sintomas da doença do olho seco e torna o tratamento ainda mais desafiador (FONSECA *et al.*, 2010; MARQUES *et al.*, 2015; NELSON *et al.*, 2017; PFLUGFELDER; DE PAIVA, 2017). Acrescenta-se que o ciclo pode ser iniciado e amplificado por fatores intrínsecos e extrínsecos (Figura 4). Nesse sentido, é necessário a rápida busca por atendimento oftalmológico adequado para implementação de estratégias de tratamento adequadas para interromper esse ciclo (RHEE; MAH, 2017).

Figura 4 - Ciclo vicioso inflamatório na doença do olho seco. O ciclo vicioso inflamatório associado ao olho seco é resultante da hiperosmolaridade e instabilidade lacrimal que ativam vias de sinalização de estresse nas células da superfície ocular, liberação de citocinas (indução de marcadores inflamatórios) que causam danos à córnea, conjuntiva e glândula lacrimal. Fatores intrínsecos e extrínsecos provocam danos à superfície ocular o que pode resultar em um agravamento progressivo dos sintomas da doença do olho seco.



Fonte: Adaptado de PFLUGFELDER; DE PAIVA, 2017 e YAMAGUCHI, 2018

2.2.1 Desafios no diagnóstico da doença do olho seco

O diagnóstico da DED ainda é um desafio, visto que não há um critério uniforme de diagnóstico e um teste padrão ouro atualmente estabelecido. Acrescenta-se ainda que a

sensibilidade e especificidade dos testes disponíveis podem variar significativamente de acordo com as características do paciente, gravidade da doença e de que a avaliação clínica isolada dos sintomas não é considerada adequada para o processo de confirmação da doença visto que pode haver variação dos sintomas entre os pacientes e que eles são similares aos encontrados em outras condições oftalmológicas (LIN; YIU, 2014; WOLFFSOHN *et al.*, 2017).

Dessa maneira, os sintomas e sinais clínicos são avaliados por combinações de testes diagnósticos (TAVARES *et al.*, 2010; LIN; YIU, 2014; WOLFFSOHN *et al.*, 2017). A bateria de testes recomendados *Dry Eye Workshop (Tear Film and Ocular Surface Society and Dry Eye Workshop - TFOS DEWS II)* incluem exames clínicos e testes de diagnósticos, como o teste de ruptura lacrimal, teste de osmolaridade e testes para verificação de dano à superfície ocular (WOLFFSOHN *et al.*, 2017).

O uso de questionários para identificar a frequência dos sintomas da doença, avaliar fatores ambientais e qualidade de vida relacionada à visão é uma prática bem estabelecida na clínica médica pela facilidade da implementação e é o método utilizado para o *screening* inicial. Entretanto, ainda não há um questionário padronizado e harmonizado para o diagnóstico da DED (TAVARES *et al.*, 2010; LIN; YIU, 2014; WOLFFSOHN *et al.*, 2017). Dentre os mais utilizados, pode ser mencionado o Índice Da Doença Da Superfície Ocular (*Ocular Surface Disease Index - OSDI*) e o Questionário de Olho Seco (*Dry Eye Questionnaire - DEQ-5*) (WOLFFSOHN *et al.*, 2017). Resultados de DEQ-5 ≥ 6 ou OSDI ≥ 13 corroboram para a realização de outros testes não invasivos. Assim, na sequência e considerando a definição da DED, a avaliação da estabilidade do filme lacrimal é altamente recomendada (LIN; YIU, 2014; WOLFFSOHN *et al.*, 2017). O teste de ruptura lacrimal (*break-up test - TBUT*) com o uso da fluoresceína é considerado o método padrão para essa análise (SWEENEY; MILLAR; RAJU, 2013; TSUBOTA *et al.*, 2017). O valor de referência de TBUT para o diagnóstico da DED é um tempo de quebra menor que 10 segundos (WOLFFSOHN *et al.*, 2017). A avaliação da osmolaridade para verificação do equilíbrio entre a produção lacrimal, evaporação, drenagem e absorção também é realizada (MARQUES, *et al.*, 2015). O teste é geralmente realizado com o auxílio de equipamentos que avaliam a impedância elétrica do filme lacrimal como por exemplos o osmômetro Tearlab Osmolarity System® e valores maiores que 308 mOsm/L são relacionados à doença (MARQUES, *et al.*, 2015; WOLFFSOHN *et al.*, 2017). Os danos à superfície ocular são verificados pela coloração com corantes como a fluoresceína e lisamina verde (WOLFFSOHN *et al.*, 2017).

Outros testes atualmente disponíveis incluem, o teste de Schirmer para medida da produção lacrimal, topografia de coerência óptica do filme lacrimal, microscopia confocal,

citologia de impressão (BARROS *et al.*, 2001; WOLFFSOHN *et al.*, 2017). Também podem ser encontrados no mercado dispositivos para avaliação de biomarcadores inflamatórios na superfície ocular como o InflammDry® para detecção das metaloproteinases da matriz (MMP-9) e o TearScan™, kit de diagnóstico da lactoferrina (DESCHAMPS; BAUDOUIN, 2013; WOLFFSOHN *et al.*, 2017; SUÁREZ-CORTÉS; MERINO-INDA; BENITEZ-DEL-CASTILLO, 2022). É importante ressaltar que processos inflamatórios podem ocorrer em outras doenças oculares ou sistêmicas (WOLFFSOHN *et al.*, 2017).

Além disso, na literatura podem ser encontrados relatos de exames promissores em diversos estágios de desenvolvimento para o uso no diagnóstico da doença (WOLFFSOHN *et al.*, 2017; SUÁREZ-CORTÉS; MERINO-INDA; BENITEZ-DEL-CASTILLO, 2022).

2.2.2 Desafios no tratamento da doença do olho seco

O foco da farmacoterapia da DED consiste no tratamento da inflamação e na restauração da homeostase do filme lacrimal, envolvendo diretamente a quebra do círculo vicioso da doença (COLLIGRIS, *et al.* 2014; NELSON *et al.*, 2017; JONES *et al.*, 2017).

O subcomitê de tratamento *Dry Eye Workshop (Tear Film and Ocular Surface Society and Dry Eye Workshop - TFOS DEWS II)*, desenvolveu uma abordagem “passo a passo” com recomendações para o gerenciamento e tratamento da DED, que varia desde o fornecimento de informações educacionais ao paciente até o uso de medicações tópicas e sistêmicas (JONES *et al.*, 2017). Entretanto, as orientações não são um algoritmo direto porque a DED é uma condição complexa, com etiologia multifatorial, que varia tanto na gravidade quanto em suas características, de paciente para paciente (NELSON *et al.*, 2017; JONES *et al.*, 2017).

As opções terapêuticas tradicionais utilizadas nos casos de insuficiência lacrimal incluem os substitutos lacrimais artificiais, como os lubrificantes oculares em diferentes preparações e viscosidades, agentes osmóticos, os osmoprotetores e os antioxidantes. Ainda são utilizados os substitutos lacrimais biológicos (soro autólogo), os agentes mucolíticos e técnicas cirúrgicas como a oclusão dos pontos lacrimais. E os tratamentos para os casos de anormalidades da pálpebra, incluem os antibióticos tópicos, uso de lentes de contato e tratamentos físicos como a luz pulsada (JONES *et al.*, 2017).

Os casos mais complexos da DED são tratados com anti-inflamatórios (não hormonais, corticosteroides), ciclosporina A e com antimicrobianos tópicos, como a tetraciclina e seus análogos (JONES *et al.*, 2017). Em relação à ciclosporina A, o seu tópico, na forma de emulsão e na concentração de 0,05% (Restasis®) foi aprovado em 2003 para o tratamento dos casos

moderados a severos da DED. Entretanto, devido à baixa biodisponibilidade ocular, várias estratégias tem sido investigadas para melhorar a efetividade do tratamento (WU *et al.*, 2013; LALLEMAND *et al.*, 2017). Além disso, são relatados efeitos adversos como hiperemia conjuntival, sensação de queimadura ocular, dor nos olhos e visão embaçada com o uso da ciclosporina A, que provocam a descontinuação do tratamento pelos pacientes (O'NEIL *et al.*, 2019).

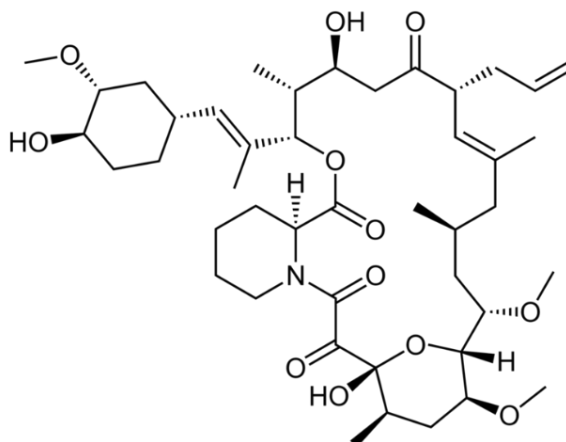
Também pode ser incluído, devido as evidências do papel da dieta no estado de hidratação do paciente, a suplementação com ácidos graxos essenciais, antioxidantes e lactoferrina. Ainda vale ressaltar, que o uso de produtos naturais e a acupuntura também são alternativas suplementares utilizadas no tratamento da doença (JONES *et al.*, 2017).

Apesar da ampla variedade de opções terapêuticas, o tratamento da DED ainda é desafiador e deve ser estabelecido de acordo com os perfis individuais de características e respostas de cada paciente (FONSECA *et al.*, 2010; CRAIG *et al.*, 2017; JONES *et al.*, 2017). Todos esses pontos estão também associados à um alto encargo econômico para os pacientes, para o sistema de saúde e para a sociedade como resultado de custos médicos diretos relacionados às frequentes consultas médicas, às terapias farmacológicas e procedimentos cirúrgicos e aos e custos indiretos devido à perda de dias de trabalho e redução produtividade (MCDONALD *et al.*, 2016). Assim, é imprescindível a busca por novas opções terapêuticas tópicas eficazes e de baixo custo para contribuir no manejo do crescente número de portadores DED (FONSECA *et al.*, 2010; NELSON *et al.*, 2017; LV *et al.*, 2024).

2.3 Tacrolimus e o seu uso *off label* para o tratamento de doenças oftalmológicas

O tacrolimus, também conhecido como FK506, é uma lactona macrolídea hidrofóbica derivada da fermentação da bactéria do *Streptomyces tsukubaensis* (GARCIA *et al.*, 2004; JONES *et al.*, 2017). Possui massa molecular de 804,02 g/mol e estrutura química $C_{44}H_{69}NO_{12}$ (USP, 2014). A fórmula estrutural da referida substância está representada na Figura 5.

Figura 5 - Fórmula estrutural do tacrolimus.



Fonte: PubChem Tacrolimus

O tacrolimus é solúvel em solventes como metanol, acetona, etanol, propano-2-ol, acetato de etila, acetonitrila, dietiléter, cloreto de metileno, clorofórmio, moderadamente solúvel em hexano e éter de petróleo e praticamente insolúvel em água (aproximadamente 1-2µg/mL) (TAMURA *et al.*, 2001; HABIB; KALSHETTI, 2021; GARG; GARG, 2022). Em relação a classificação biofarmacêutica, o tacrolimus é um fármaco classe II, sendo, portanto, de alta permeabilidade ($\log P$ 3.96 ± 0.83) e baixa solubilidade (TAMURA *et al.*, 2001; GARCIA *et al.*, 2004; ; GARG; GARG, 2022). O fármaco está disponível na forma de cápsula para uso oral, para prevenir a rejeição de vários órgãos transplantados e na forma de pomada (uso tópico), nas concentrações de 0,03% ou 0,1%, com o nome comercial de Protopic®, para o tratamento de dermatite atópica (GARCIA *et al.*, 2004; ZHAI *et al.*, 2011).

O mecanismo de ação do tacrolimus é semelhante ao do imunossupressor ciclosporina A, fármaco aprovado e atualmente utilizado para o tratamento dos casos moderados a severos da DED. Os referidos fármacos são classificados como inibidores da transcrição do primeiro sinal para ativação do linfócito T, de acordo com o sítio de ação imunorregulatório (GARCIA *et al.*, 2004). Apesar da semelhança no mecanismo de ação, dados na literatura demonstram que a atividade imunossupressora do tacrolimus é 50 a 100 vezes maior que da ciclosporina *in vitro* e 10-20 vezes maior *in vivo* (GOEBEL *et al.*, 2011; ZHAI *et al.*, 2011).

Diversos estudos clínicos têm sido realizados para avaliar a efetividade do tacrolimus no tratamento de doenças oculares mediadas por reações imunológicas (BERTELMANN, 2004; SHOUGHY, 2017; ZHAI *et al.*, 2011). Além disso, devido à semelhança com a ciclosporina A, em relação à atividade imunossupressora, o tacrolimus tópico, na forma de pomada, tem sido utilizado “*off label*”, o seja, para uma indicação/finalidade

diferente da aprovada pelas agências reguladoras, no tratamento de blefarconjuntivite, ceratoconjuntivite, ceratoplastia lamelar profunda e na síndrome do olho seco (LEVINGER *et al.*, 2014; MOSCOVICI *et al.*, 2015; PRADO *et al.*, 2017). Moscovici e colaboradores (2015) demonstraram que os escores de coloração da córnea com fluoresceína e rosa bengala melhoraram estatisticamente após a administração tópica do tacrolimus 0,03%, duas vezes ao dia, em pacientes com a síndrome do olho seco de Sjogren, uma das divisões da DED por deficiência aquosa. Além disso, também é relatado na literatura, um estudo randomizado simples cego em que o uso tópico de uma nanoemulsão de tacrolimus 0,03% demonstrou resultados similares aos encontrados com o uso da emulsão de ciclosporina 0,05% durante seis meses de tratamento em pacientes diagnosticados com o caso grave da doença do olho seco (MOAWAD *et al.*, 2022). Acrescenta-se que também há resultados que demonstram a possibilidade de uso do tacrolimus como alternativa viável para os pacientes com intolerância ou que não possuem resposta adequada ao uso tópico de ciclosporina (LUACES-RODRÍGUEZ *et al.*, 2018).

Entretanto, a administração tópica do tacrolimus é um desafio devido às características intrínsecas do fármaco (alta massa molecular e hidrofobicidade) e pelas barreiras anatômicas do segmento anterior do olho, o que interfere no processo de biodisponibilidade. Nesse sentido, justifica-se a busca por novos sistemas de entrega contendo o fármaco tacrolimus para o tratamento de condições oculares.

2.4 Novas estratégias para formulação (veiculação) de fármacos de uso oftálmico no segmento anterior do olho

2.4.1 Fatores interferentes para a efetiva biodisponibilidade de fármacos após a administração tópica no segmento anterior do olho

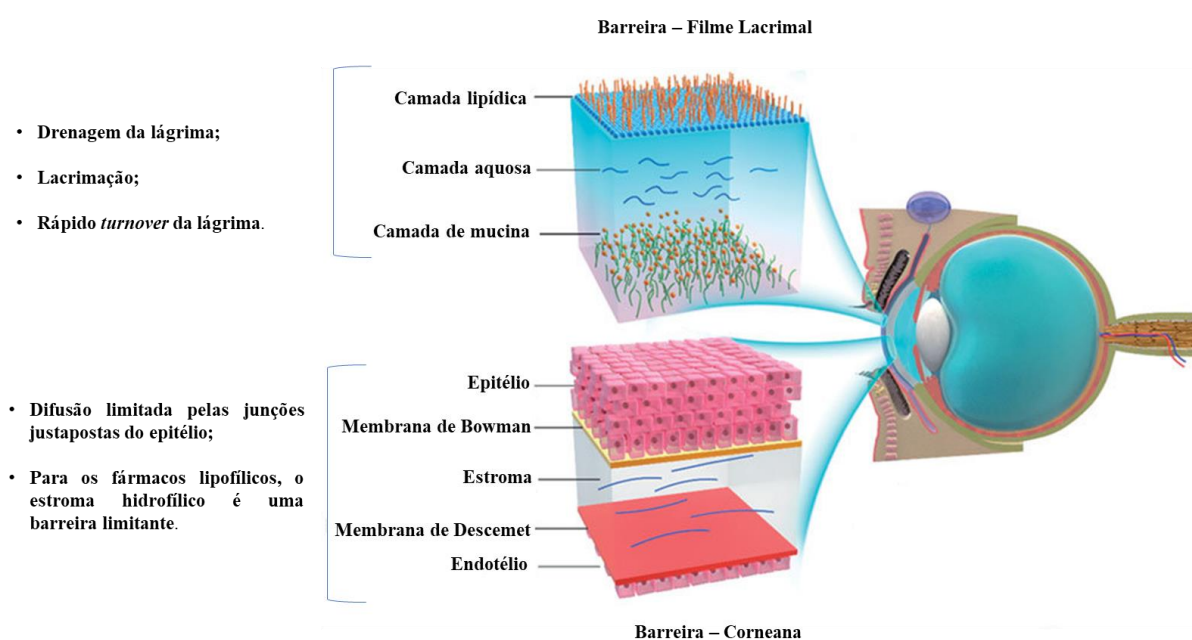
As doenças do segmento anterior incluem a catarata, a doença do olho seco e diversas outras doenças inflamatórias, infecciosas, hereditárias e degenerativas. De acordo com as áreas alvo da terapia, os objetivos da administração de fármacos ao segmento anterior possuem como objetivos principais, melhorar a biodisponibilidade dos fármacos nos tecidos extraoculares para aliviar os sinais e sintomas causados por doenças relacionadas à inflamação da superfície ocular da córnea e da conjuntiva, como síndrome do olho seco e doenças alérgicas e aumentar a biodisponibilidade dos fármacos nos tecidos intraoculares para tratar infecções e doenças

complexas que ameaçam a visão, como glaucoma ou inflamação intraocular (uveíte) (JANAGAM; WU; LOWE, 2017; ONUGWU *et al.*, 2023).

Os colírios, na forma de soluções ou suspensões, representam a principal forma farmacêutica de administração ocular tópica para o tratamento das referidas doenças oculares, principalmente pela conveniência, motivos econômicos, facilidade para a utilização e pela segurança. Entretanto, devido às propriedades intrínsecas do processo de absorção no olho, a biodisponibilidade ocular dos fármacos administrados a partir de colírios é limitada (SILVA-CUNHA, 2003; FULGÊNCIO *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2013; WENG *et al.*, 2017). Apenas aproximadamente 5% dos fármacos administrados por essa via são absorvidos no epitélio da córnea. Neste sentido, para o efetivo tratamento das condições clínicas, é necessário que sejam utilizadas soluções concentradas e administrações frequentes, o que resulta em efeitos indesejáveis proporcionados pela absorção sistêmica dos fármacos via ducto nasolacrimal e epitélio da conjuntiva (WU *et al.*, 2013; FULGÊNCIO *et al.*, 2013; LALLEMAND *et al.*, 2017; JANAGAM; WU; LOWE, 2017).

Dentre os fatores de interferência na biodisponibilidade dos fármacos após a administração ocular tópica, podem ser destacados a drenagem lacrimal, o filme lacrimal, o ato de piscar e as barreiras anatômicas oculares incluindo a córnea e as barreiras conjuntivais (SWETLEDGE *et al.*, 2021) (Figura 6).

Figura 6 - Representação esquemática dos principais interferentes na biodisponibilidade de fármacos após a administração tópica no segmento anterior do olho.



O filme lacrimal é uma película aquosa que se deposita sobre a superfície ocular e é composta por três camadas: lipídica, aquosa e mucosa, cada uma com características e propriedades específicas (PUTZ, 2021). Uma das funções do filme lacrimal é umedecer os tecidos oculares superficiais para evitar o ressecamento e sua alta taxa de renovação, entre 2 e 3 minutos, funciona como uma barreira dinâmica à aderência e penetração de corpos estranhos. O fármaco instilado é lavado e removido em poucos segundos após a sua aplicação pelo ducto nasolacrimal (WENG *et al.*, 2017). Outro fator de grande interferência são as camadas da córnea e da conjuntiva. Estudos farmacocinéticos tem demonstrado que o epitélio e o endotélio da córnea são barreiras para moléculas hidrofílicas e o estroma, uma camada composta principalmente de água e fibrilas de colágeno, são uma barreira para moléculas lipofílicas. A barreira conjuntival é menos eficiente que a barreira promovida pela córnea e a difusão das moléculas é limitada principalmente pelo epitélio conjuntival, composto por células escamosas não queratinizadas, e células caliciformes (PUTZ, 2001; TOMMASO *et al.*, 2011; JANAGAM; WU; LOWE, 2017 ; SWETLEDGE *et al.*, 2021).

Além das limitações impostas pelos mecanismos de defesa do bulbo ocular, as características e propriedades físico-químicas da forma farmacêutica e do fármaco, como solubilidade, estrutura molecular e grau de ionização, também são fatores críticos no processo de absorção das formulações oftálmicas (ALMEIDA *et al.*, 2021).

Diferentes estratégias têm sido desenvolvidas para melhorar o tempo de residência pré-corneal e/ou a capacidade de penetração do fármaco. Dentre as formulações mais relevantes, destacam-se a inclusão de agentes viscosificantes, polímeros com propriedades mucoadesivas, utilização de nanossistemas coloidais, como, nanopartículas lipídicas, lipossomas, dendrímeros, hidrogéis, ciclodextrinas, nanomateriais inorgânicos, nanocristais de fármaco e as nanoemulsões. Outras formas intensamente exploradas incluem os implantes e as nanopartículas poliméricas (TOMMASO *et al.*, 2011; REIMONDEZ-TROITIÑO *et al.*, 2015; AULTON; TAYLOR, 2016; WENG *et al.*, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2021; TANG *et al.*, 2022; ONUGWU *et al.*, 2023).

2.4.2 Nanotecnologia como estratégia para veiculação de fármacos de uso oftálmico

A nanotecnologia exerce versatilidade em aplicações nos mais diversos campos. Em grande parte, é aceito como um campo multidisciplinar, incluindo ciência dos materiais, química, biotecnologia de engenharia, tecnologia da informação, biotecnologia e ciência cognitiva (ORÉFICE; PEREIRA; MANUSUR, 2006; TANG *et al.*, 2022). De acordo a norma

internacional ISO/TR 18401:2017 - *Nanotechnologies*, a nanotecnologia é definida como a aplicação de conhecimento científico para manipular e controlar matéria predominantemente em nanoescala para fazer uso de propriedades e fenômenos dependentes de tamanho e estrutura distintos daqueles associados a átomos ou moléculas individuais, ou extrapolação de tamanhos maiores do mesmo material (ISO/TR 18401:2017). Os nanomateriais fazem parte de um campo altamente tecnológico e com alto potencial de crescimento econômico incluindo a criação de novas oportunidades de trabalho. Estudos demonstram que o mercado para esses materiais podem atingir aproximadamente 100 bilhões de dólares até 2030 (RESEARCH AND MARKETS, 2023).

Apesar de ser uma área de inovação de produtos, a nanotecnologia possui grandes desafios no processo de regularização das formulações nas agências e órgãos reguladores (ALLAN *et al.*, 2021). Ainda não há, devido à alta complexidade de alguns nanomateriais, um guia globalmente harmonizado e padronizado para avaliação das propriedades dos produtos, os riscos para o paciente e para o ambiente, o que dificulta a liberação dos produtos para o mercado. Além disso, a ausência de algumas informações, podem levar a conclusões indevidas de classificação dos nanomateriais como não seguros pelo público (ALLAN *et al.*, 2021; RATHORE; MAHESH, 2021). Até o momento, as principais instruções e definições relacionadas à nanotecnologia podem ser verificadas em regulamentos da União Europeia e da Agência Americana - *Food And Drug Administration* (FDA) (ALLAN *et al.*, 2021).

A nanotecnologia farmacêutica se aplica ao desenvolvimento, à caracterização e à produção de materiais farmacêuticos, estruturas e produtos com dimensões entre 1 e 100nm. Entretanto, essa classificação não é internacionalmente harmonizada principalmente em relação ao tamanho e é usual, encontrar a abordagem de aceitação de 1.000 nm como o limite máximo mais apropriado para a projeção de materiais para serem tratados como nanotecnologia (AULTON; TAYLOR, 2016; TANG *et al.*, 2022; MARTIN *et al.*, 2024). A nanotecnologia então, envolve sistemas na escala nanométrica que geralmente apresenta um revestimento externo que protege o núcleo interno, onde normalmente está a molécula terapêutica ou substância para diagnóstico (SRINIVASARAO; LOHIYA; KATTI, 2019).

Dentre os sistemas coloidais de entrega de fármacos, o desenvolvimento de nanopartículas de uso oftálmico, tem demonstrado como vantagens promissoras, o aumento da concentração do fármaco no local-alvo e do tempo de residência pré-corneal, a redução do efluxo do fármaco dos tecidos oculares, o controle da liberação do fármaco, a diminuição dos efeitos colaterais, pela redução do número de instilações por dia, alinhado à facilidade de

administração como colírio, o que melhora o conforto e a adesão do paciente (TOMMASO *et al.*, 2011; SRINIVASARAO; LOHIYA; KATTI, 2019).

2.4.2.1 Fundamentos físico-químicos e propriedades gerais de nanossistemas para entrega ocular

Dentro do campo oftalmológico, as propriedades das nanopartículas, como hidrofobicidade, tamanho, carga, mucoadesão e ligantes de superfície, bem como a via de administração e o meio de suspensão, afetam a capacidade dessas formulações de superar as barreiras oculares e se distribuir no olho e por isso, devem ser cuidadosamente projetadas. É importante acrescentar que as estratégias relacionadas ao “*safe-by-design*” também devem ser consideradas durante o desenvolvimento para reduzir os riscos associados à introdução de novos nanomateriais e também incluem a avaliação da estabilidade da partícula revestida, genotoxicidade, imunotoxicidade e ecotoxicidade (SOETEMAN-HERNÁNDEZ, *et al.*, 2020; REIJNDERS, 2020; ONUGWU *et al.*, 2023).

O tamanho é um parâmetro essencial para determinar a capacidade de internalização, penetração, biodistribuição e eliminação dos nanomateriais (PHAN; HAES, 2019; TANG *et al.*, 2022). Estudos relatam que sistemas de entregas com tamanho inferior ao ideal, são mais facilmente eliminados pelas barreiras oculares (SRINIVASARAO; LOHIYA; KATTI, 2019).

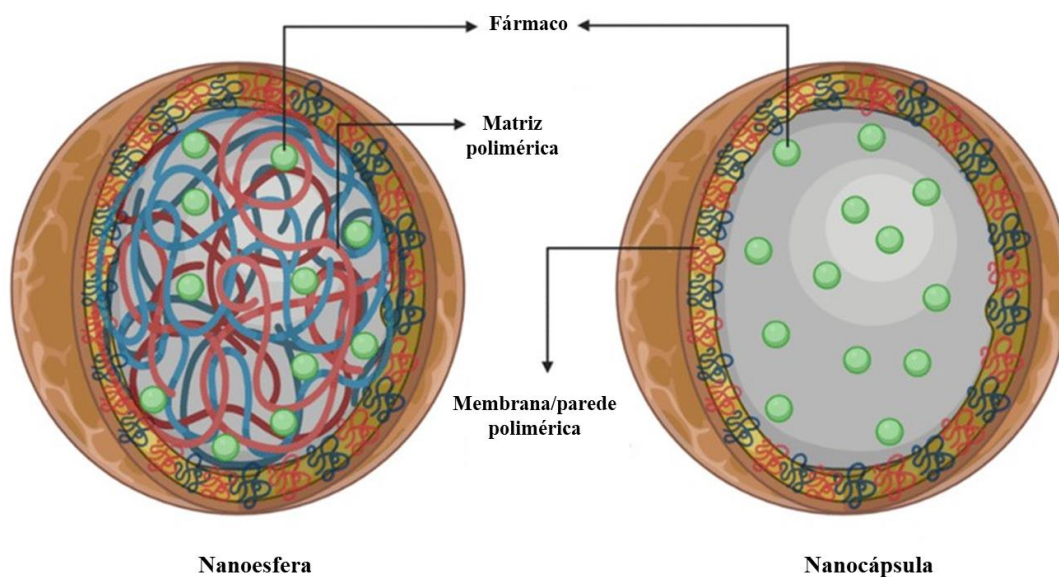
Outro fator de importante relevância para a área de oftalmologia é a exploração das propriedades eletrostáticas nas interações entre os nanobiomateriais com os tecidos oculares (PHAN; HAES, 2019; TANG *et al.*, 2022). Valores altos de potencial zeta ($> \pm 30$ mV) podem promover a estabilização das nanoformulações via repulsão eletrostática (ONUGWU *et al.*, 2023). Além disso, a carga superficial pode influenciar nos locais de entrega e distribuição do fármaco pela interação com superfícies intercelulares ou membranas e na biocompatibilidade da nanopartícula (NAGARWA *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2019; SCHEIVE; YAZDANI; HAJRASOULIHA, 2021; TANG *et al.*, 2022). Acrescenta-se ainda que, as propriedades hidrofílicas, lipofílicas ou anfifílicas inerentes dos nanomateriais podem impactar significativamente na permeabilidade e na difusão das partículas nas diferentes estruturas oculares (TANG *et al.*, 2022).

As nanopartículas são classificadas em várias categorias dependendo da morfologia, tamanho e propriedades químicas (TANG *et al.*, 2022). As nanopartículas poliméricas, fabricadas por polímeros naturais ou sintéticos, são uma das categorias atualmente existentes. Materiais poliméricos são macromoléculas formadas pela união de unidades fundamentais

“meros” repetidas ao longo da cadeia polimérica (ORÉFICE; PEREIRA; MANUSUR, 2006). Diversos estudos tem demonstrado resultados promissores do uso de nanopartículas poliméricas no tratamento da doença do olho seco e de outras doenças oftalmológicas (NAGARWA *et al.*, 2009; KAUR; KAKKAR, 2014; WENG *et al.*, 2017).

As nanopartículas poliméricas são classificadas em dois grupos principais de acordo com a morfologia e arquitetura (organização estrutural): sistemas vesiculares (nanocápsulas) e os matriciais (nanoesferas) (DIMER *et al.*, 2013). Nas nanocápsulas, a molécula biologicamente ativa é contida dentro de uma parede polimérica que circunda o núcleo oleoso, onde o ativo é dissolvido. As nanoesferas, são formadas por uma matriz polimérica densa, e as moléculas do ativo são aprisionadas ou adsorvidas na superfície dessa matriz (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A representação esquemática dessas diferenças podem ser visualizadas na Figura 7.

Figura 7 - Representação esquemática das diferenças entre as nanocápsulas e nanoesferas.



Fonte: Adaptado de BALDIM *et al.*, 2020.

De maneira geral, as nanopartículas poliméricas podem ser fabricadas por duas principais estratégias, dependendo do tipo do fármaco e da via de administração, que seria a dispersão dos polímeros ou a polimerização dos monômeros. As técnicas mais utilizadas para a preparação são a evaporação do solvente, difusão/emulsificação do solvente e nanoprecipitação, também conhecida como deslocamento de solvente e deposição interfacial (REIS *et al.*, 2006; ZIELIŃSKA *et al.*, 2020). Independente do método utilizado, os produtos são geralmente obtidos como suspensões coloidais aquosas (ZIELIŃSKA *et al.*, 2020).

A técnica de nanoprecipitação, foco nesse trabalho, foi desenvolvida e patenteada por FESSI e colaboradores (1989) e consiste na deposição interfacial de um polímero dissolvido em um solvente orgânico sobre uma fase aquosa sob agitação (ZIELIŃSKA *et al.*, 2020). O solvente orgânico pela miscibilidade em água é removido pelo processo de evaporação. O uso de surfactantes, apesar de não requerido para a formação das nanopartículas é frequentemente utilizado para contribuir na estabilidade da suspensão coloidal prevenindo a formação dos fenômenos de instabilização (agregados/coalescência) (CALZONI *et al.*, 2019; ZIELIŃSKA *et al.*, 2020). Esse método pode ser utilizado para a preparação de nanoesferas e de nanocápsulas. Para a obtenção de nanoesferas, o fármaco é dissolvido ou disperso na solução polimérica, e para as nanocápsulas, o fármaco é dissolvido em um óleo que é emulsionado na solução polimérica orgânica antes da dispersão na fase externa da emulsão (ZIELIŃSKA *et al.*, 2020). O objetivo no processo de manufatura é obter uma alta taxa de incorporação, em combinação com uma quantidade razoável de fármaco livre pra obter um nível inicial adequado, assim como uma liberação sustentada durante o tempo de permanência na área pré-corneana (ORÉFICE; PEREIRA; MANUSUR, 2006).

Acrescenta-se ainda que estratégias tem sido desenvolvidas para a formação de sistemas coloidais híbridos, com o revestimento/recobrimento (*coating*) das nanopartículas pré-formadas com polímeros mucoadesivos, como a quitosana, o ácido hialurônico, para também contribuir no aumento da biodisponibilidade oftálmica (LAJAVARDI *et al.*, 2009; ZENG *et al.*, 2016). Essa abordagem tecnológica pode ser realizada por diferentes mecanismos, os quais envolvem interações eletrostáticas ou hidrofóbicas e ligações covalentes entre o polímero de revestimento e as nanoestruturas (LEMARCHAND; GREF; COUVREUR, 2004; MAHALING; KATTI, 2016).

2.4.2.2 Utilização de polímeros mucoadesivos nos sistemas de entrega de fármacos de uso oftálmico

Mucoadesão é a propriedade dos materiais de atrair e aderir às membranas mucosas do corpo humano e é uma alternativa para solucionar limitações relacionadas à administração tópica de fármacos em determinadas regiões, como a ocular, pelo potencial de prolongar o tempo de residência e melhorar a biodisponibilidade de fármacos nos sistemas de entrega (BODDUPALLI *et al.*, 2010; MAHALING; KATTI, 2016; DAVE *et al.*, 2021). O processo de mucoadesão é geralmente dividido em duas etapas principais: a fase de contato, em que ocorre a transferência de água da camada de muco para o polímero, facilitando a interpenetração das

cadeias poliméricas com as glicoproteicas do muco e a etapa da consolidação do fenômeno mucoadesivo, resultante das ligações químicas entre o polímero e o muco. Entretanto, esse mecanismo não é totalmente claro e algumas teorias, dentre elas, a eletrônica, a de adsorção, a do umedecimento, a de difusão e a de fratura tem sido apresentadas para fundamentar o fenômeno de mucoadesão. Além disso, é relatado na literatura a possibilidade da combinação de mais de uma teoria para fundamentar o mecanismo (SMART, 2005; VARUM *et al.*, 2008; WENGSCHECK *et al.*, 2022). Na teoria eletrônica, importante para esse trabalho, a adesão ocorre pela transferência de elétrons entre a membrana da mucosa e o sistema mucoadesivo pelas diferenças nas suas estruturas/cargas eletrônicas e com a consequente formação de uma dupla camada de atração eletrostática (SMART, 2005; BODDUPALLI *et al.*, 2010; DAVIDOVICH-PINHAS; BIANCO-PELED, 2010; DAVE *et al.*, 2021 ; WENGSCHECK *et al.*, 2022).

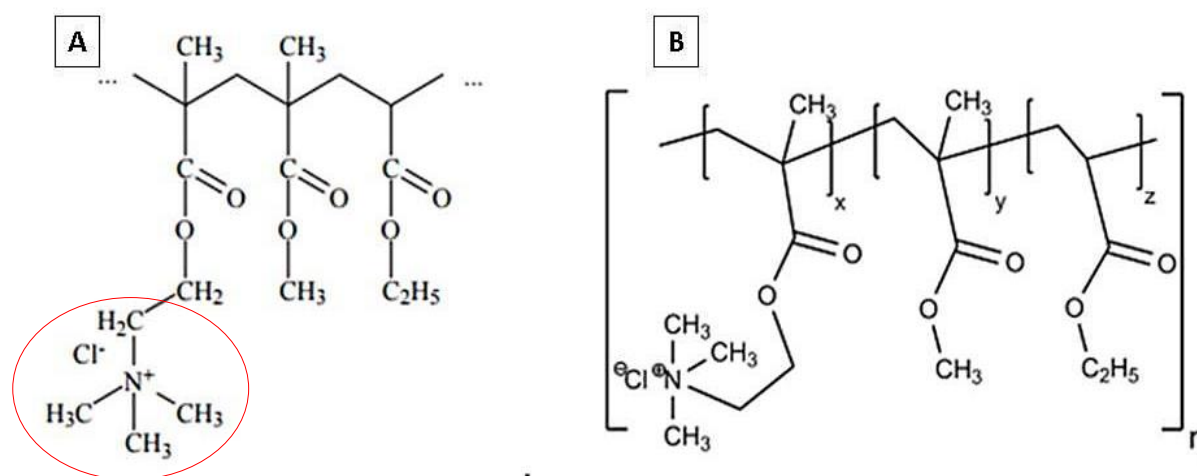
No processo de administração ocular, os polímeros mucoadesivos se ligam e interagem com a camada mucosa do filme lacrimal (BURHAN *et al.*, 2021). Mucinas são glicoproteínas de alta massa molecular compostas por um núcleo de proteico ligado covalentemente às cadeias laterais de carboidratos através de ligações O-glicosídicas (ABLAMOWICZ; NICHOLS, 2016; DAVE *et al.*, 2021). Métodos diretos e/ou indiretos para medir e detectar a interação entre os polímeros e a mucina tem sido explorados, dentre eles, a microscopia de força atômica, medida do potencial zeta e testes reológicos (DAVIDOVICH-PINHAS; BIANCO-PELED, 2010; WOERTZ *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2020).

Estudos tem demonstrado, que o uso de polímeros mucoadesivos, como o Eudragit® RL100 e o ácido hialurônico, nas nanopartículas oftálmicas, além de promover o aumento da capacidade de bioadesão aos tecidos oculares, favorecem a penetração nos tecidos oculares, aumentam a capacidade de encapsulação e protegem o fármaco veiculado à possíveis fatores de degradação o que aumenta a estabilidade da formulação (ALMEIDA *et al.*, 2021; ZHAI *et al.*, 2011; CASTRO *et al.*, 2020).

Os polímeros Eudragit® são referidos como os copolímeros de metacrilato e amônia, sintetizados a partir do ácido acrílico e ésteres de ácido metacrílico, contendo de 8,8 – 12 % de grupos funcionais de amônio quaternário (responsáveis pela permeabilidade do polímero em solução aquosa) e de massa molar de aproximadamente 32000 g/mol (KİLİÇARSLAN, BAYKARA, 2004; THAKRAL; THAKRAL; MAJUMDAR, 2013). A fórmula estrutural do polímero pode ser verificada na Figura 8. Diversos estudos tem demonstrado o comportamento favorável de utilização do Eudragit® RL100 para uso tópico ocular, considerando a segurança, a carga positiva e o perfil de liberação de formulações oculares preparadas com esse polímero

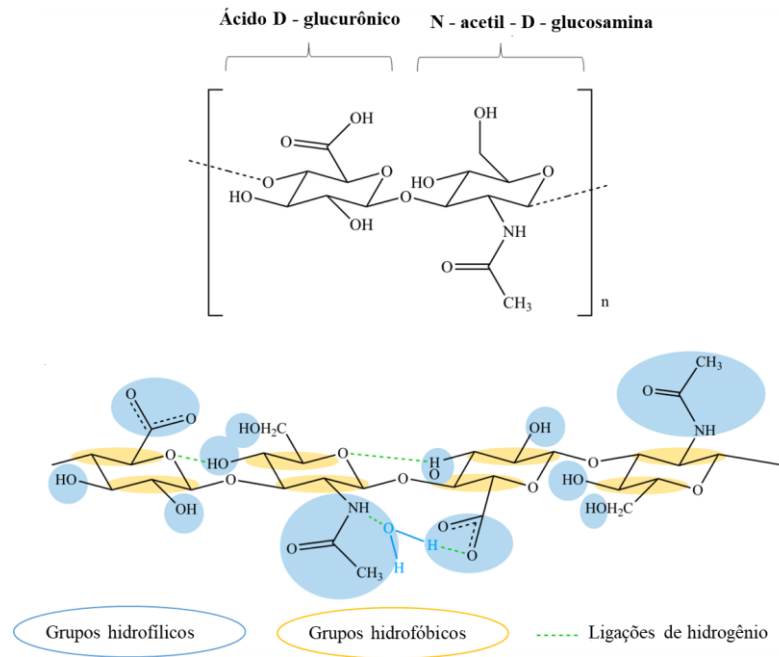
(PIGNATELLO; BUCOLO; PUGLIS, 2002; UBRICH *et al.* 2005; DAS; SURESH; DESMUKH, 2010; KATARA; MAJUMDAR, 2013; CASTRO *et al.*, 2020). Uma das características principais desse polímero é o seu comportamento pH – independente e por isso é altamente explorado como estratégia para liberação sustentada/controlada de fármacos (KAUR *et al.*, 2018).

Figura 8 - Fórmula estrutural do polímero Eudragit® RL100 (A) e unidade monomérica (B).



Fonte: THAKRAL; THAKRAL; MAJUMDAR, 2013 e CASTRO, 2016.

O ácido hialurônico (HA) é um polissacarídeo altamente hidrofílico, aniônico, constituído por longas cadeias de unidades dissacarídicas repetidas de ácido glucurônico e N-acetil -D-glucosamina conectadas por ligações glicosídicas (WU *et al.*, 2013; FALLACARA *et al.*, 2018). A fórmula estrutural da referida substância, com a indicação das regiões hidrofílicas e hifrofóbicas da molécula, está representada na Figura 9.

Figura 9 - Fórmula estrutural do ácido hialurônico.

Fonte: Adaptado de FALLACRA *et al.*, 2018 e BAYER, 2020

O ácido hialurônico é um polímero natural, presente em humanos, em animais e em algumas bactérias do gênero *Streptococcus*. No corpo humano, está presente na matriz extracelular dos tecidos conjuntivos, na pele, cordão umbilical e fluido sinovial. Além disso, ele pode ser encontrado no humor vítreo, na glândula lacrimal e no epitélio da córnea (RAH, 2011; FALLACARA *et al.*, 2018). O polímero e seu sal de sódio (hialuronato de sódio) possuem várias aplicações em produtos médicos, farmacêuticos, estéticos e cosméticos. A rota utilizada para a obtenção do ácido hialurônico ocorre via extração em tecidos animais (crista de galo, fluido sinovial bovino), e via fermentação bacteriana. A grande utilização do ácido hialurônico se deve à sua propriedade anti-inflamatória, imunossupressora e pelas suas propriedades biológicas e físico-químicas, como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, não imunogenicidade, mucoaderência, higroscopicidade, viscoelasticidade e lubricidade (FALLACARA *et al.*, 2018; HINTZE; SCHNABELRAUCH; ROTHER, 2022; ALIPOOR *et al.*, 2022).

Na oftalmologia, o ácido hialurônico e seu sal sódico são utilizados como líquido viscoelástico para proteção e lubrificação das estruturas oculares. Além disso, pela sua capacidade de promover a hidratação, ele é utilizado na síndrome do olho seco e para melhorar o conforto das lentes de contato (RAJ, 2011; FALLACARA *et al.*, 2018). Estudos tem

demonstrando a ligação do ácido hialurônico à proteínas de membranas, como os receptores CD44 (*Cluster of Differentiation 44*) das células epiteliais da córnea, promovendo a retenção de nanoformulações (KAUR; SMITHA, 2002; ABATANGELO *et al.*; 2020; ONUGWU *et al.*, 2023). Adiciona-se que também é relatado o uso do HA no processo de revestimento de nanocarreadores para prolongar o tempo de residência ocular e a absorção do fármaco nos tecidos oculares (ZENG *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2022). Ibrahim e colaboradores (2010), realizaram o revestimento de nanopartículas de Eudragit® com ácido hialurônico para prolongar a entrega ocular de gatifloxacina e prednisolona. O revestimento foi realizado pela adsorção do HA às nanopartículas de Eudragit® pré-formadas e pelo método de emulsificação espontânea durante a síntese das nanopartículas de Eudragit®. Foi demonstrado que as nanopartículas revestidas com HA forneceram concentrações do fármaco gatifloxacina significativamente aumentadas e prolongadas na córnea de olhos de coelhos em comparação com os colírios comerciais avaliados no estudo. Entretanto, nenhuma comparação entre as nanopartículas revestidas e as não revestidas foi relatada no artigo.

Assim, considerando as propriedades e características, tanto do Eudragit® RL100 como do ácido hialurônico, a exploração do uso desses polímeros em sistemas nanoestruturados de entrega de fármacos no segmento anterior do olho e a investigação da segurança biológica e da eficácia dos referidos sistemas com diferentes propriedades eletrostáticas, foco e inovação desse trabalho, podem trazer melhorias significativas no tratamento de condições clínicas oculares, incluindo a doença do olho seco.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento, caracterização físico-química, avaliação da toxicidade ocular e da eficácia de sistemas nanoestruturados contendo o fármaco tacrolimus, com diferentes cargas superficiais, em modelo experimental de indução da doença do olho seco para administração ocular tópica no tratamento da doença do olho seco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver nanoformulações poliméricas a partir do polímero Eudragit® contendo o fármaco tacrolimus (NTAC) pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado seguido pela evaporação do solvente;
- Desenvolver nanoformulações poliméricas revestidas com ácido hialurônico na forma de hialuronato de sódio (NTAC-HA), a partir da nanopartícula pré-formada do polímero Eudragit® contendo o fármaco tacrolimus pela técnica de adsorção;
- Realizar a caracterização físico-química das nanoformulações poliméricas desenvolvidas (NTAC; NTAC-HA) pelas técnicas: espalhamento dinâmico de luz para determinação do tamanho (diâmetro hidrodinâmico médio); espalhamento de luz eletroforético para análise do potencial zeta; microscopia eletrônica de transmissão para avaliação da morfologia e cromatografia líquida de alta eficiência, (*High performance liquid chromatography*), para avaliação da eficiência de encapsulação do fármaco e avaliação do pH;
- Avaliar as propriedades bioadesivas (retenção ocular) das nanoformulações desenvolvidas (NTAC; NTAC-HA) pela medida da carga superficial das formulações desenvolvidas adicionada à suspensão de mucina;
- Avaliar a estabilidade físico-química das formulações poliméricas desenvolvidas (NTAC; NTAC-HA) por meio das técnicas de espalhamento múltiplo de luz, espalhamento dinâmico de luz e espalhamento eletroforético;

- Avaliar o perfil de segurança biológica (toxicidade ocular) *in vitro* das formulações desenvolvidas (NTAC; NTAC-HA) em modelo de membrana corioalantóica (*Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane HET- CAM*) de embrião de galinha e *in vivo* pelo teste de Draize.
- Avaliar a eficácia das nanoformulações poliméricas desenvolvidas (NTAC ; NTAC-HA) em modelo experimental *in vivo* de indução da doença do olho seco.

4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO TACROLIMUS (NTAC; NTAC-HA)

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Materiais

Tacrolimus (Biocon Limited, China); Eudragit® RL100 (Evonik Nutrition & Care GmbH, Alemanha); Triglicérides de ácido cáprico-caprílico (Polytechno Ind., Brasil); Triolato de sorbitano (Span® 85 - Sigma Aldrich, EUA); Polissorbatos 80 (TWEEN® 80, Synth®, Brasil); Acetona (Vetec Química, Brasil); Água ultrapura, obtida de um sistema de purificação de água (Millipore, EUA); Hialuronato de sódio (HA-EP3.0 - 2,45 MDa - Bloomage Biotechnology Corp. LTDA, China); Mucina de estômago suíno - tipo II (Sigma Aldrich, EUA); Ácido fosfórico (Sigma Aldrich, EUA); Metanol (Merck, Alemanha); Acetonitrila (Merck, Alemanha); Unidade filtrante para seringa de PVDF - Millipore Millex-HV - com tamanho de poro de 0,45 µm.

Todos os solventes utilizados foram grau analítico e o metanol e a acetonitrila foram grau cromatográfico.

4.1.2 Equipamentos

Sistema de purificação de água (Millipore, EUA); Balança analítica (Shimadzu, Alemanha); Agitador magnético (Solab, Brasil); Zetasizer nano ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra); Turbidímetro (Turbiscan® - formulation smart scientific analysis, EUA); Lavadora Ultrassônica (Eco -Sonic, Brasil); Rotavapor (IKA, Brasil); Cromatógrafo líquido de ultra performance cromatógrafo líquido, modelo Elite LaChrom, da marca Hitachi®, com bomba quaternária L-2130, Column oven L-2300, auto injetor L-2200 e detector de arranjo de fotodiodos (DAD) L-2455; Coluna C18 (250 mm de comprimento x 4mm de diâmetro) com partículas de 5µm (Thermoscientific®); Pipetas Gilson, volume ajustável de 20 µL, 200 µL e 1000 µL; Vials de vidro Agilent de 2 mL com tampa e septos de teflon; Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - FEI SpiritBiotwin 120 kV (Termo Fischer Scientific, EUA); Medidor de pH (NI PHM – Nova Instruments Tecnocon, São Paulo, Brasil), Câmara conservadora (Elber Medical Line, Brasil).

4.1.3 Métodos

4.1.3.1 Desenvolvimento e preparo dos sistemas poliméricos nanoestruturados contendo tacrolimus

O processo de desenvolvimento dos novos sistemas de entrega para o fármaco tacrolimus foi iniciado a partir de um padrão de produção de nanopartículas poliméricas previamente estabelecido no laboratório de pesquisa (CASTRO *et al.*, 2020). Foi utilizado o método da deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989). Assim, a fase oleosa, constituída por tacrolimus (10 mg), pelo polímero Eudragit® RL100 (120 mg), pelos triglicérides de ácido cáprico-caprílico - TCM (180 mg) , triolato de sorbitano (40 mg) e pela acetona (40 mL) foram aquecidos à temperatura de 40 °C e agitados (450 rpm) por aproximadamente 10 minutos. A fase aquosa, constituída pelo polissorbato 80 (75 mg) e pela água ultrapurificada (50 mL) foi preparada separadamente, aquecida e agitada na mesma condição da fase oleosa.

Após a completa solubilização dos constituintes, a fase oleosa foi vertida sobre a fase aquosa, utilizando-se um funil de colo longo. Esse processo foi realizado nas mesmas condições de temperatura e agitação anteriormente descritos, durante o período de 10 minutos. As nanopartículas foram então efetivamente formadas. Foi realizada a evaporação da acetona e a redução do volume final da formulação para 20 mL por meio de um rotavapor evaporativo a 50 °C. A composição final da formulação pode ser verificada no Quadro 2.

Quadro 2 - Composição final em % m/v dos constituintes da formulação polimérica NTAC.

Componentes da nanopartícula polimérica desenvolvida	Porcentagem massa/ volume dos constituintes (% m/v)
Tacrolimus	0,05
Eudragit® RL100	0,6
Triglicérides de ácido cáprico-caprílico (TCM)	0,9
Triolato de sorbitano (Span® 85)	0,2
Polissorbato 80 (Tween® 80)	0,375

4.1.3.1.1 Revestimento com ácido hialurônico das nanoformulações poliméricas contendo tacrolimus

O revestimento da nanopartícula de tacrolimus – NTAC com o ácido hialurônico na forma de hialuronato de sódio (HA), foi realizado pela técnica de adsorção de superfície (LEMARCHAND; GREF; COUVREUR, 2004). Foram preparadas inicialmente a dispersão do hialuronato de sódio em água ultrapurificada nas concentrações 0,1%, 0,3% e 0,5% (m/v) sob agitação magnética com rotação de aproximadamente 350 rpm durante 30 minutos.

A suspensão de nanopartículas de Eudragit® RL100 (5 mL) foi então adicionada (em uma única vez) em igual volume de solução aquosa (5 mL) contendo HA nas concentrações anteriormente descritas. Para otimizar o processo de revestimento com o HA, a dispersão/nano foi mantida sob agitação magnética por um período de 1 hora – rotação aproximadamente de 350 rpm. A definição da concentração ideal de revestimento foi determinada pelos resultados de diâmetro, distribuição de tamanho e potencial zeta.

4.1.3.2 Caracterização físico-química dos sistemas poliméricos nanoestruturados

A caracterização físico-química das formulações coloidais (NTAC ; NTAC-HA) foi realizada pelas análises de diâmetro de partícula, potencial zeta e avaliação de fenômenos de desestabilização. Essas análises foram realizadas pelas técnicas de espalhamento dinâmico de luz, espalhamento eletroforético de luz e espalhamento múltiplo de luz (FIEL, 2010; JUNG-CHO *et al.*, 2013; KHAN, *et al.*, 2019; CASTRO *et al.*, 2020; ZIELIŃSKA *et al.*, 2020). Além disso, foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão para avaliação da morfologia, cromatografia líquida de alta eficiência para obtenção da eficiência de encapsulamento e foram avaliados o pH e as propriedades de mucoadesão das formulações poliméricas.

4.1.3.2.1 Diâmetro e distribuição de tamanho

A medida do tamanho das partículas nas formulações poliméricas desenvolvidas (NTAC ; NTAC-HA) e os respectivos índices de polidispersão (PDI - *Poly Dispersity Index*) ou seja a avaliação da distribuição do tamanho, foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering - DLS*) utilizando o equipamento

Zetasizer Nano ZS90 que possui como fonte de luz um laser vermelho de 4 mW, He-Ne, com comprimento de onda de 632,8 nm e o detector a 90° do feixe incidente.

As leituras foram realizadas em triplicata, após diluição das suspensões na razão de 1:10 (v/v) em água ultrapura. Para a realização da análise, foi inserido 1 mL das soluções diluídas em células de poliestireno de 1cm de largura e comprimento. Os dados foram coletados a 25,0 °C e os valores foram expressos como média \pm desvio padrão (DP).

4.1.3.2.2 Avaliação da carga da superfície

A avaliação da carga de superfície das partículas nos sistemas poliméricos nanoestruturados (NTAC ; NTAC-HA) ou seja, o potencial zeta, foi realizada pela técnica de espalhamento eletroforético da luz (*Electrophoretic Light Scattering*), pelo equipamento Zetasizer Nano ZS90. As leituras foram realizadas em triplicata, após a diluição das suspensões na razão de 1:10 (v/v) em água ultrapura. Para a realização da análise, foi inserido 1 mL das soluções diluídas em células capilares moldadas em policarbonato, com eletrodos chapeados a ouro com uma base de cobre-berílio elástica. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão (DP).

4.1.3.2.3 Medida de pH

As aferições do potencial hidrogeniônico (pH) das formulações poliméricas recém-preparadas (NTAC ; NTAC-HA) e após 60 dias foram realizadas em potenciômetro devidamente calibrado (NI PHM – Nova Instruments Tecnoyon, São Paulo, Brasil). Para isso, o eletrodo foi imerso em cada uma das preparações e a leitura, foi realizada em triplicata. As amostras foram armazenadas sob refrigeração (2 - 8°C). Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão (DP).

4.1.3.2.4 Morfologia

A morfologia da superfície das nanopartículas desenvolvidas foi verificada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As análises foram realizadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - FEI SpiritBiotwin 120 kV (Thermo Fisher) no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais. Aproximadamente 5 μ L das formulações NTAC; NTAC-HA foram adicionados em uma grade de cobre revestido com filme

carbono. O excesso de fluido foi removido por um papel absorvente e foi realizada a contração negativa com acetato de uranila 2%.

4.1.3.2.5 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE%) do tacrolimus foi avaliada na formulação NTAC e foi determinada por meio da quantificação de fármaco total presente na formulação (CASTRO *et al.*, 2020). A avaliação foi realizada após a preparação da formulação e após 30 e 60 dias de armazenamento em temperatura ambiente.

A quantificação do fármaco foi realizada por cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE) de acordo com o método validado por SOUZA (2012) apresentadas no Quadro 3. Foram avaliados no referido método, o parâmetro linearidade para determinação da faixa de trabalho mais adequada para o processo de quantificação e o parâmetro seletividade para verificar se os componentes da formulação interferem no desempenho da medição.

A linearidade do método analítico foi avaliada pela construção de curvas analíticas com 6 concentrações do fármaco. A partir de uma solução estoque de tacrolimus foram preparadas soluções diluídas nas concentrações de 5, 10, 20, 50, 150 e 300 µg/mL. As análises foram realizadas em triplicada. A correlação linear entre os resultados de área em função da concentração obtida nos cromatogramas foi avaliada pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) (SOUZA, 2007; ANVISA, 2017). Para a utilização dessa ferramenta estatística, foi inicialmente verificada a presença de valores dispersos (*outliers*) pelo teste de resíduo padronizado de Jackknife. Foi permitida a exclusão de até 22% dos dados da curva original (SOUZA, 2007). Além disso, foi realizada a avaliação das premissas relativas aos resíduos da regressão. A avaliação da normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Ryan-Joiner, a independência dos resíduos foi avaliada pelo teste de Durbin-Watson e homocedasticidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Levene modificado por Brown e Forsythe. Após a avaliação das premissas, a significância da regressão e o desvio da linearidade foram avaliados pela Análise de variância (ANOVA), com $p < 0,01$ (SOUZA, 2007; BRASIL, 2017). A curva analítica foi então construída após o tratamento de *outliers*, em função da concentração. Foram avaliados o gráfico de dispersão dos resíduos e os parâmetros: coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2). O valor obtido de “r” deve estar acima de 0,990 (BRASIL, 2017).

A verificação da seletividade foi avaliada a partir de injeções separadas da solução diluente (Acetonitrila: Metanol - 90:10), da fase móvel (Metanol: Solução de ácido fosfórico

0,1% (v/v) pH 2,5 (80:20)), solução padrão de tacrolimus (100 µg/mL), placebo (nanopartícula vazia) e da solução do placebo fortificado a 100% do fármaco.

As análises foram realizadas no cromatógrafo a líquido, modelo Elite LaChrom, da marca Hitachi®, com bomba quaternária L-2130, Column oven L-2300, auto injetor L-2200 e detector de arranjo de fotodiodos (DAD) L-2455. A separação cromatográfica se deu através uma coluna analítica C18 (250 mm de comprimento x 4 mm de diâmetro) com partículas de 5 µm da marca Thermoscientific®, mantida a 25°C, utilizando um método de separação isocrática. O software utilizado para coletar, integrar e analisar os dados cromatográficos foi o EzChrom Elite.

Todas as soluções analisadas no cromatógrafo, foram filtradas para os *vials*, utilizando unidade filtrante de PVDF (do inglês-*Polyvinylidene fluoride*) porosidade de 0,45 µm acoplado à seringa.

Quadro 3 - Método cromatográfico para quantificação de tacrolimus

Parâmetro	Especificação
Fase móvel	Metanol : Solução de ácido fosfórico 0,1% (V/V) pH 2,5 (80:20)
Solução diluente	Acetonitrila: Metanol (90:10)
Volume de injeção	20 µL
Fluxo	1 mL/min
Temperatura da coluna	50°C
Deteção	210 nm
Tempo de corrida	15 minutos

Fonte: Adaptado de SOUZA, 2012.

O preparo das soluções utilizadas para a avaliação da seletividade e da linearidade validação foi realizado conforme descrito a seguir:

Solução estoque de tacrolimus: 50 mg de TAC foram pesados, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com solução diluente (Acetonitrila: Metanol - 90:10). Assim, foi obtida uma solução estoque com concentração de 500 µg/mL de tacrolimus.

Soluções diluídas: foram retiradas alíquotas da solução estoque e completados o volume com solução diluente (Acetonitrila: Metanol - 90:10). As soluções diluídas foram preparadas nas concentrações de: 5, 10, 20, 50, 150 e 300 µg/mL.

Placebo puro: foram preparadas nanopartículas utilizando os mesmos componentes da formulação original sem a adição do tacrolimus.

Solução do placebo fortificado a 100% do fármaco: 2 mL da solução estoque de tacrolimus e 0,5 ml da nanopartícula vazia foram transferidos para um balão volumétrico de 10mL e completado o volume com solução diluente (Acetonitrila: Metanol - 90:10). Assim, foi obtida uma solução com concentração final de 100 µg/mL do fármaco e 300 µg/mL de placebo (nanopartícula vazia).

Para a realização do teste de eficiência de encapsulamento, 2 mL de formulação foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL, o volume foi completado com acetonitrila e a solução foi homogeneizada. Os balões foram deixados em banho de ultrassom sem aquecimento durante 40 minutos para ocorrer a liberação do tacrolimus das nanopartículas. As análises foram realizadas em triplicata. A eficiência de encapsulamento (EE%) foi então calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$EE\% = \left(\frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \right) * 100 \quad (1)$$

O valor da concentração experimental se refere a quantidade de fármaco encapsulado e a concentração teórica se relaciona com a quantidade de fármaco adicionado à formulação, com o ajuste pertinente de diluição. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (DP).

4.1.3.2.6 Avaliação da propriedade de mucoadesão

A propriedade mucoadesiva dos sistemas poliméricos nanoestruturados desenvolvidos, ou seja, a capacidade de adsorção da mucina às formulações, foi avaliada pela alteração das medidas do potencial zeta de partículas de mucina (mucina de estômago suíno – tipo II) antes e após a mistura com as formulações poliméricas contendo o fármaco tacrolimus (NTAC ; NTAC-HA). Para isso, foi preparada uma suspensão de mucina 1% (v/v) em água ultrapura. A suspensão foi levemente agitada até a completa dissolução à temperatura ambiente e filtrada filtros de 0,45 µm e 0,22 µm para remover agregados. A suspensão de mucina 1% foi misturada com diferentes proporções das nanopartículas de tacrolimus (NTAC; NTAC-HA) (1:1; 1:2 e

1:3) e foram realizadas as leituras do potencial zeta utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90, após 10 e 60 minutos de incubação à temperatura ambiente. As medidas foram realizadas em triplicata e os valores expressos em média \pm desvio padrão.

4.1.3.2.7 Estudos iniciais de estabilidade física dos sistemas poliméricos nanoestruturados

A estabilidade física das formulações nanoestruturadas desenvolvidas (NTAC; NTAC-HA) foi avaliada em diferentes condições devido as propriedades de cada formulação. Os lotes de nanopartículas produzidos foram armazenados em frascos de vidro e protegidos da luz durante o estudo.

A NTAC foi avaliada em três diferentes temperaturas: temperatura ambiente - $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (NTAC - Lote 1), alta temperatura - $40^{\circ}\text{C} / 75\%$ umidade relativa (UR) (NTAC - Lote 2) e sob a condição de refrigeração $2 - 8^{\circ}\text{C}$ (NTAC - Lote 3).

As condições do estudo de estabilidade acelerada, ou seja, a avaliação da estabilidade da formulação armazenada na temperatura de 40°C e 75% UR, foi definida de acordo com as diretrizes da equação de *Arrhenius*, que correlaciona a velocidade de uma reação química com a temperatura (ASTM-F1980). Nesse sentido, foi realizado o cálculo do fator de envelhecimento acelerado de acordo com a seguinte maneira:

$$\mathbf{AAF} = \mathbf{Q}_{10}^{[(T_{AA} - T_{RT})/10]} \quad (2)$$

Em que:

AAF: *accelerated aging factor* - fator de envelhecimento acelerado;

T_{AA} : *accelerated aging temperature* - temperatura de envelhecimento acelerado ($^{\circ}\text{C}$);

T_{RT} : *reference ambiente temperature* - Temperatura ambiente de referência ($^{\circ}\text{C}$);

Q10: Fator teórico baseado na equação de *Arrhenius* que relaciona parâmetros cinéticos de decomposição com a temperatura.

Foi utilizado o valor de Q_{10} igual a 2 por ser uma abordagem convencionalmente utilizada para correlacionar a temperatura com a velocidade das reações (HUKINS;

MAHOMED; KUKUREKA, 2008; ASTM-F1980). A temperatura de referência foi de 20°C. A duração do estudo foi então calculada pela divisão do prazo de validade estimado (365 dias) pelo fator de envelhecimento acelerado. Considerando esse cálculo, o tempo total do estudo de estabilidade foi de três meses e equivale a 365 dias de armazenamento sob temperatura ambiente. Os tempos definidos do estudo foram: T0 (início do estudo); T1 (30 dias após o início do estudo); T2 (60 dias após o início do estudo) e T3 (90 dias após o início do estudo). Ressalta-se que para o estudo de estabilidade acelerada, cada tempo corresponde à:

Quadro 4 - Correspondências do tempo acelerado e do tempo real (TAA = 20 °C , TRT 40°C / 75% UR).

Tempo	Equivalente em meses
T1- 30 dias após o início do estudo	4
T2 – 60 dias após o início do estudo	8
T3 - 90 dias após o início do estudo	12

Para a NTAC-HA, devido a não esterilidade da nanoformulação e considerando as propriedades intrínsecas do ácido hialurônico que poderiam resultar em degradação em condições ambientais (SNETKOV *et al.*, 2020) e/ou crescimento de micro-organismos pela não adição de um agente protetor microbiano à formulação, a estabilidade foi avaliada de maneira conservadora na temperatura sob refrigeração e o estudo foi também realizado em diferentes tempos: T0 (início do estudo e imediatamente após a produção das formulações); T1 (30 dias após o início do estudo); T2 (60 dias após o início do estudo) e T3 (90 dias após o início do estudo).

Para as duas nanoformulações em cada um dos tempos, foram analisados os parâmetros diâmetro e distribuição de tamanho (índice de polidispersividade) e potencial zeta obtidos pela técnica de espalhamento dinâmico/eletroforético de luz, conforme informado nos itens 4.1.3.2.1 e 4.1.3.2.2. As leituras foram realizadas em triplicata. Os valores foram expressos como média \pm desvio. Para a NTAC – Lote 1 e Lote 3, também foi verificado ao final do período do estudo, possíveis alterações na eficiência de encapsulamento, de acordo com a metodologia do item 4.1.3.2.5.

Para a comparação dos resultados obtidos entre os diferentes tempos de análise, foi utilizada a ferramenta estatística de análise de variância (ANOVA) com teste posterior de

Dunnet, com valor de $P < 0,05$ aceito para diferenças estatisticamente significativas. As comparações foram realizadas com o tempo controle (T0). Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prim[®] 8 (San Diego, Califórnia, EUA).

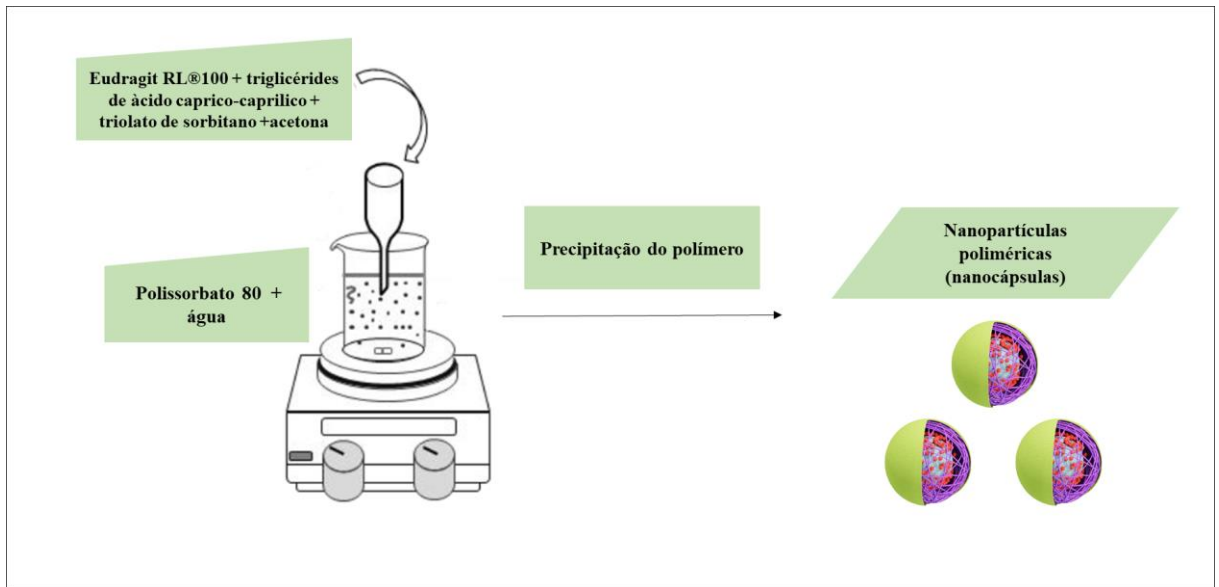
Além disso, também foi realizada a avaliação dos fenômenos de desestabilização pela técnica de espalhamento múltiplo de luz (*Multiple Light Scattering - MLS*) utilizando-se o equipamento Turbiscan[®]. Para a realização do ensaio 10 mL das formulações, não diluídas, foram adicionados em uma célula de vidro borossilicato, cilíndrica, de 25 mm de diâmetro e 55 mm de altura. A célula foi preenchida até cerca de 22 mm de sua altura e foi submetida a seguinte programação: *scans continuos* por 10 *scans*, um *scan* a cada 1 minuto por 30 minutos e varreduras por feixe de luz a cada 5 minutos durante 1 hora (TURBISCAN, 2015; CASTRO *et al.*, 2020). Os dados foram analisados por meio do software do equipamento para avaliação da estabilidade, migração e variação de tamanho das partículas presentes na formulação.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Desenvolvimento e preparo dos sistemas poliméricos nanoestruturados contendo o fármaco tacrolimus

As nanopartículas poliméricas contendo o fármaco tacrolimus foram obtidas pelo método de nanoprecipitação/deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989), a partir do polímero Eudragit RL100[®] que consiste em um copolímero de etil acrilato, metil metacrilato e baixo teor de éster de ácido metacrílico com grupos de amônio quaternário. A referida técnica é rápida, simples, não requer uso de equipamentos complexos o que torna o processo econômico e é facilmente reproduzida (FESSI *et al.*, 1989; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2006; ZIELIŃSKA *et al.*, 2020). Os constituintes da fase orgânica foram dissolvidos e vertidos sob agitação, em uma fase aquosa contendo um tensoativo hidrofílico. Nesse processo, a fase aquosa, imediatamente tornou-se leitosa e as nanopartículas foram instantaneamente formadas (FESSI *et al.*, 1989; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003) (Figura 9). O solvente orgânico foi removido pelo processo de evaporação e a eficácia da remoção foi previamente evidenciada a partir do processo padrão de produção de nanopartículas poliméricas estabelecido no laboratório de pesquisa (CASTRO *et al.*, 2020). Considerando a técnica de fabricação utilizada nesse trabalho, pode ser inferido que houve a formação de nanocápsulas (REIS *et al.*, 2006; CRUCHO; BARROS, 2017; ZIELIŃSKA *et al.*, 2020).

Figura 9 - Preparo de nanocápsulas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado.



Fonte: Adaptado de SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; FRIEDRICH, 2013.

A formulação obtida apresentou, pela análise macroscópica (visual), conforme pode ser verificado na Figura 10, aspecto opalescente (reflexo azulado), branco, homogêneo, fluído e livre de precipitados, que são característicos de suspensões coloidais poliméricas (CASTRO, 2016).

Figura 10 - Formulação desenvolvida de nanopartículas contendo tacrolimus - NTAC.



Fonte: Próprio autor

O revestimento da nanopartícula de tacrolimus – NTAC com o ácido hialurônico na forma de hialuronato de sódio (HA), foi realizado pela técnica de adsorção de superfície

(LEMARCHAND; GREF; COUVREUR, 2004). Diferentes concentrações do ácido hialurônico foram adicionadas diretamente à formulação previamente fabricada a partir do polímero Eudragit® RL 100.

Logo após a preparação da NTAC-HA não houve na avaliação macroscópica, alterações nos aspectos apresentados pela formulação não revestida (Figura 11). A definição da concentração ideal de revestimento foi determinada pelos resultados de diâmetro distribuição de tamanho e potencial zeta (itens 4.2.2.1 e 4.2.2.2).

Figura 11 - Formulação revestida com o ácido hialurônico – NTAC-HA desenvolvida a partir da NTAC.



Fonte: Próprio autor

4.2.2 Caracterização físico-química dos sistemas poliméricos nanoestruturados

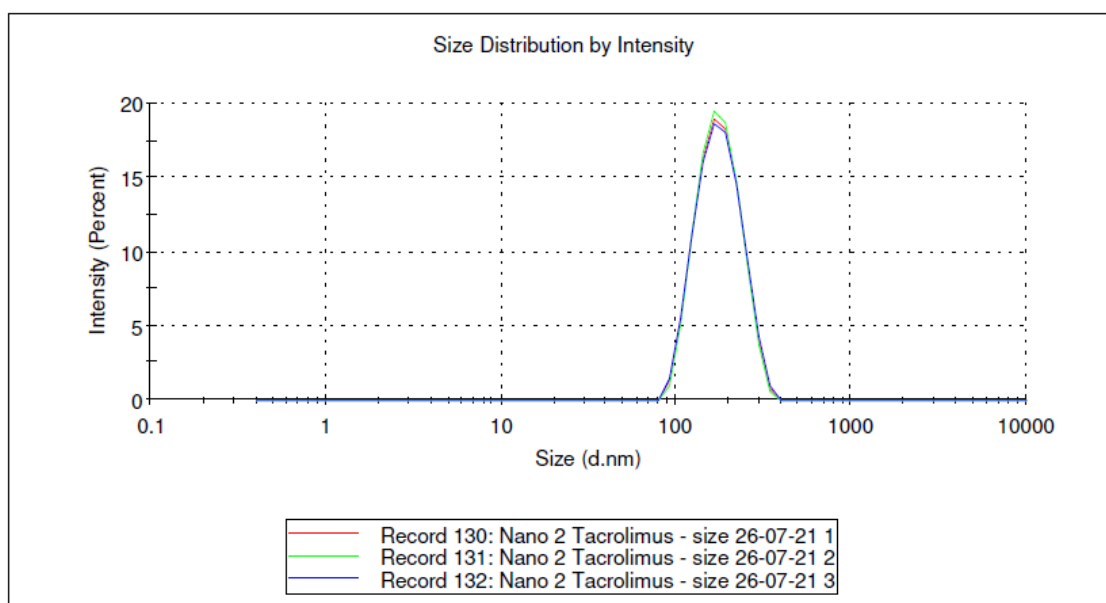
A utilização de técnicas para caracterização de novos sistemas de entrega é de fundamental importância para otimizar o processo de desenvolvimento (JUNG-CHO *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2019). Segundo a *Materials Advisory Board of National Research Council – USA*, a caracterização descreve os aspectos de composição e estrutura (incluindo defeitos) dos materiais, dentro de um contexto de relevância para um processo, produto ou propriedade em particular. A realização de testes preliminares permite o planejamento estratégico de correção nas falhas da formulação, visando a qualidade do produto, englobando a segurança de seu uso, a estabilidade da formulação e a sua eficácia (ORÉFICE; PEREIRA; MANUSUR, 2006; JUNG-CHO *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2019).

4.2.2.1 Diâmetro e distribuição de tamanho

O princípio da técnica de espalhamento dinâmico de luz consiste na análise das flutuações de intensidade da luz espalhada em um determinado ângulo. Essa análise fornece informações sobre o movimento da partícula, que é o responsável pelas flutuações da intensidade da luz espalhada (PIRES; EL SEOUD, 2003; JUNG-CHO *et al.*, 2013; DIALETACHI, 2017; MALVERN, 2021a). Para amostras com partículas não-interagentes, em movimento Browniano, ou seja, randômico, quanto maior o tamanho das partículas, mais lento será o movimento e conseqüentemente, menor será a flutuação da luz dispersa. A velocidade de movimento Browniano é definida pelo coeficiente de difusão translacional (D) que pode ser convertido em tamanho da partícula utilizando a equação de *Stokes-Einstein* (PIRES; EL SEOUD, 2003; ASTM E2490 -09; SUBRINHO, 2019; MALVERN, 2021b).

A formulação polimérica nanoestruturada contendo o fármaco tacrolimus - NTAC, apresentou pela técnica de espalhamento dinâmico de luz, o diâmetro médio de $166,7 \pm 0,29$ nm. Além disso, o índice de polidispersão médio encontrado foi de $0,06 \pm 0,01$. A distribuição de tamanho das partículas está representada na Figura 12 na qual se observa o perfil de distribuição de tamanho em relação a intensidade, de uma mesma amostra, medida em 3 replicatas, para avaliar a reprodutibilidade.

Figura 12 - Distribuição de tamanho por intensidade da formulação polimérica nanoestruturada de tacrolimus (NTAC) após o preparo.



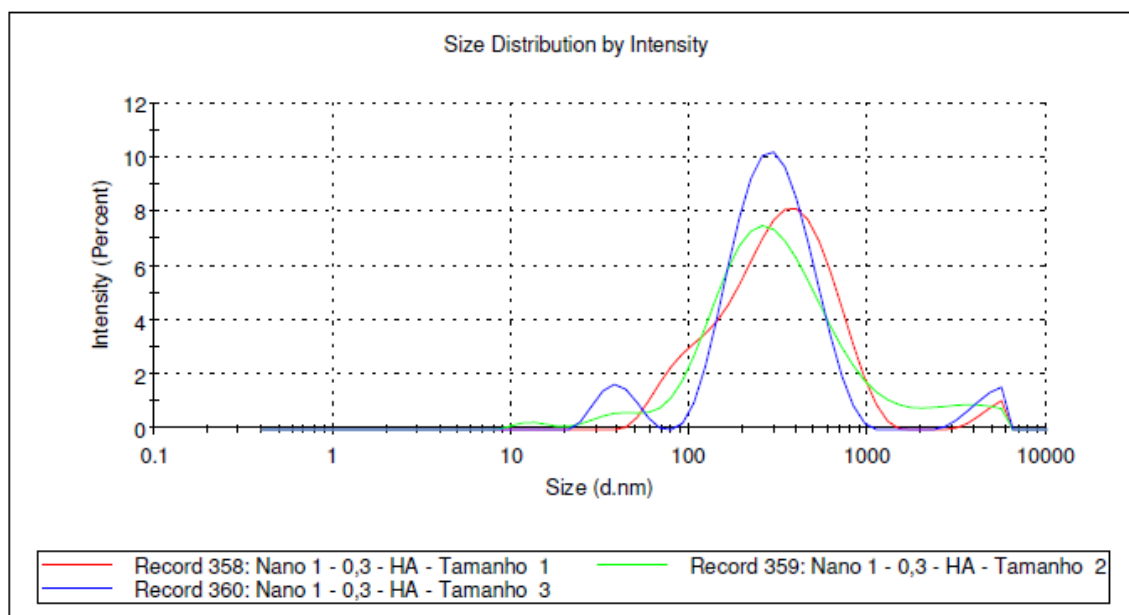
Os valores encontrados de diâmetro e de índice de polidispersão das formulações nanoestruturadas revestidas com diferentes concentrações do ácido hialurônico na forma de hialuronato de sódio (NTAC-HA) estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Diâmetro e distribuição de tamanho das formulações poliméricas nanoestruturadas de tacrolimus revestidas com ácido hialurônico na forma de hialuronato de sódio (NTAC-HA), em diferentes proporções.

Concentração de HA [% (m/v)]	Diâmetro (nm) (média ± DP)	Distribuição do tamanho (IP) (média ± DP)
N1 - 0,1 % HA	189,6 ± 0,80	0,33 ± 0,01
N2 - 0,3% HA	227,2 ± 1,30	0,44 ± 0,01
N3 - 0,5% HA	304,9 ± 0,97	0,55 ± 0,01

Os resultados demonstraram que houve após o revestimento com HA, em todas as concentrações de revestimento aumento significativo ($P > 0,05$) no diâmetro da partícula comparado ao valor da NTAC, o que pode ser um indicativo do processo de adsorção do polímero à superfície das nanopartículas (YANG *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2021). Apesar do aumento, a concentração de 0,1%, foi dentre as demais, a que obteve resultado menos relevante e por isso foi excluída no processo de seleção. Na análise dos resultados de índice de polidispersão, excluindo a concentração de 0,1%, a concentração de 0,3% de HA demonstrou resultado mais favorável, ou seja, mais próximo de zero, que a concentração de 0,5%. Assim, a concentração de 0,3% de HA, foi a selecionada para o prosseguimento dos experimentos (Figura 13).

Figura 13 - Distribuição de tamanho por intensidade da formulação polimérica nanoestruturada de tacrolimus revestida com 0.3% de ácido hialurônico na forma de hialuronato de sódio (NTAC-HA) após o preparo.



O tamanho da partícula é uma informação muito importante e determinante para a biodistribuição e retenção das nanopartículas no tecido alvo (JUNG-CHO *et al.*, 2013). A composição quali-quantitativa e o método de preparação das nanopartículas são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersão das partículas. As nanopartículas poliméricas com tamanho tipicamente < 400 nm são adequadas para uso oftálmico (AMRUTKAR; PATIL, 2023; ONUGWU *et al.*, 2023). Neste sentido, foi possível verificar que as nanopartículas de tacrolimus – NTAC e NTAC-HA (0,3% m/v) estão dentro da faixa desejável para a aplicação ocular tópica.

A homogeneidade da distribuição do tamanho, expresso pelo índice de polidispersão (IP) é a medida da largura da distribuição de tamanhos, sendo que quanto mais próxima de zero mais estreita a largura, indicando um sistema unimodal ou monodisperso, e da mesma forma, se mais próximo de 1, indica menor homogeneidade da distribuição de tamanho (ASTM E2490 – 09; JUNG CHO *et al.*, 2013). Apesar de melhores valores encontrados de IP para a NTAC, a NTAC-HA (0,3%) também mostrou resultados satisfatórios, com a faixa de distribuição estreita o que indica que os sistemas nanoestruturados são unimodais e homogêneos.

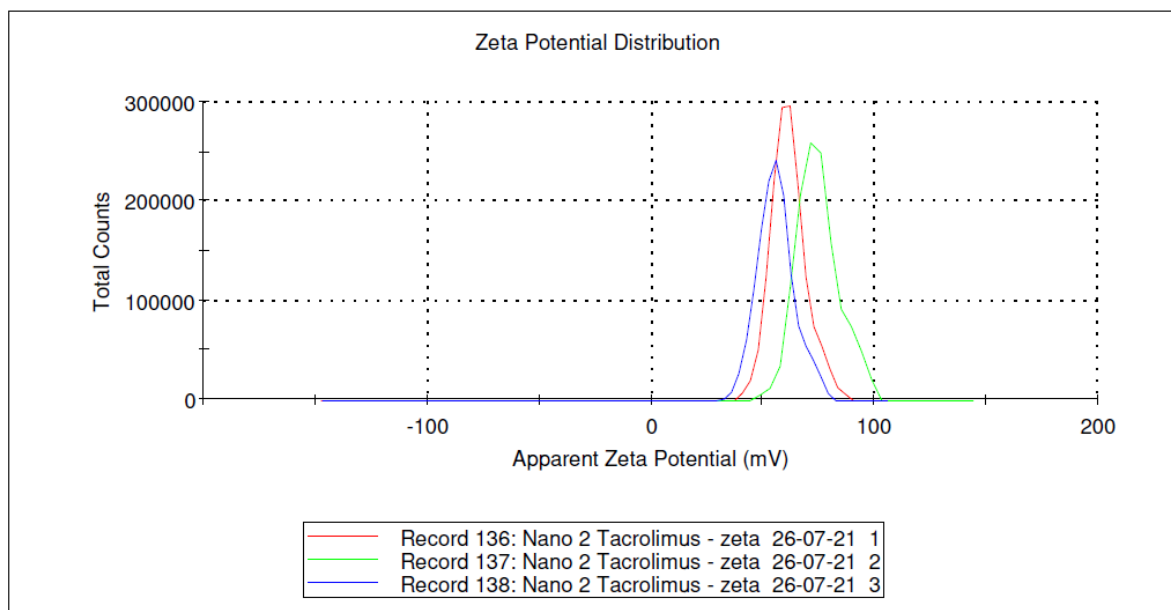
4.2.2.2 Avaliação da carga de superfície

O potencial Zeta (ζ) reflete a carga da superfície das nanopartículas e é um importante parâmetro físico-químico que influencia a estabilidade das formulações e o reconhecimento

biológico dos nanossistemas. O princípio da técnica de obtenção do potencial zeta, espalhamento eletroforético de luz, se baseia na determinação da mobilidade eletroforética e na aplicação da equação de *Henry* (ASTM E2865; MALVERN, 2021c). Valores de potenciais Zeta inferiores a -30 mV ou superiores a $+30$ mV indicam uma formulação estável. Nessas condições, a fração de cargas superficiais é alta e há o predomínio do efeito de repulsão eletrostática, ou seja, das forças repulsivas e consequentemente há o impedimento do processo de aglomeração das partículas (SCHAFFAZICK, *et al.*, 2003; ZIELIŃSKA *et al.*, 2020).

A formulação polimérica nanoestruturada NTAC apresentou valor de potencial zeta de $+63,73 \pm 9,58$ mV, o que indica uma adequada estabilidade eletrostática das partículas. O gráfico com o perfil de distribuição do potencial zeta está disposto na Figura 14, o qual demonstra o resultado de 3 medidas realizadas em uma mesma amostra.

Figura 14 - Distribuição do potencial zeta da formulação polimérica nanoestruturada de tacrolimus (NTAC) após o preparo.

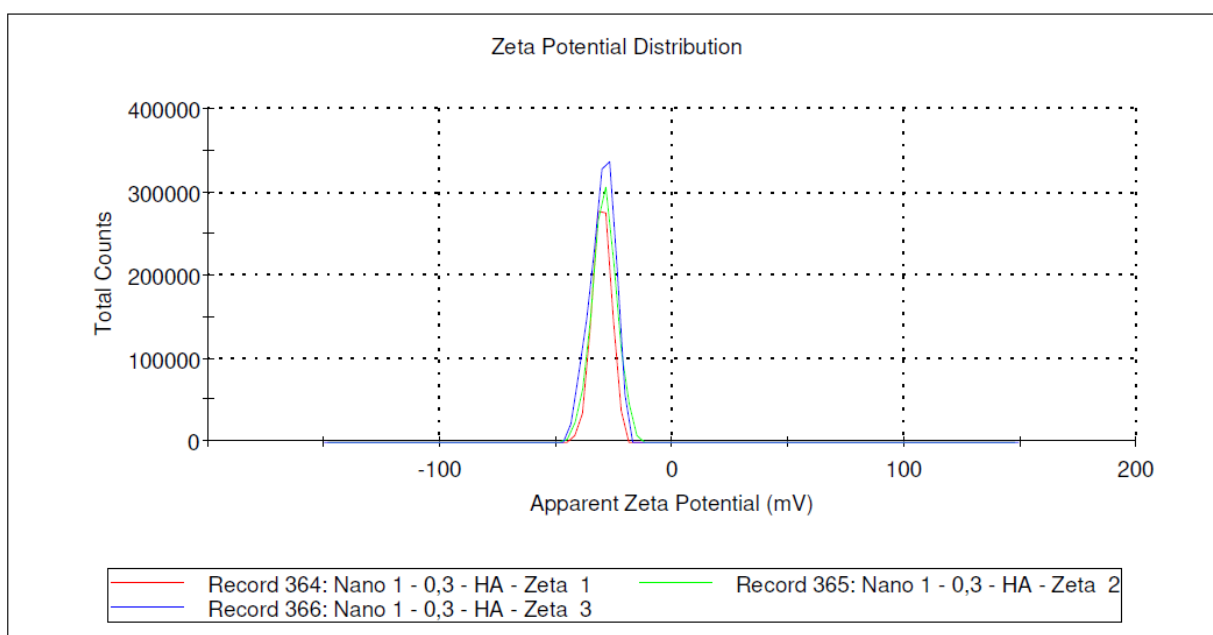


Estudos anteriores também demonstram que o potencial zeta de formulações poliméricas com o Eudragit® RL100 foi positivo (PIGNATELLO; BUCOLO; PUGLIS, 2002; CASTRO *et al.*, 2020) pela presença de grupos de amônio quaternário na cadeia polimérica do Eudragit® RL100 (DAS; SURESH; DESMUKH, 2010; CASTRO *et al.*, 2020). Essa é uma característica interessante para sistemas de entrega de fármacos para uso tópico ocular. A carga positiva pode facilitar uma efetiva adesão à superfície da córnea e promover uma forte interação com a mucosa carregada negativamente da conjuntiva e com a mucina aniônica presente no

filme lacrimal, o que prolonga o tempo de residência da formulação (DAS; SURESH; DESMUKH, 2010; DAS; SURESH, 2011).

A formulação polimérica nanoestruturada revestida com ácido hialurônico, NTAC-HA (0,3%) apresentou valor de potencial zeta de $-30,03 \pm 0,55$ mV, o que também indica uma adequada estabilidade eletrostática das partículas. O valor negativo justifica-se porque o ácido hialurônico é uma macromolécula de carboidrato com muitas cargas negativas pela presença do ácido glucurônico presentes em sua estrutura (AGUILERA-GARRIDO *et al.*, 2019). A diferença do potencial zeta entre as nanopartículas revestidas e não revestidas é um indicador da presença do polímero de revestimento, no caso o ácido hialurônico, na superfície das nanopartículas e conseqüentemente da eficácia da interação eletrostática entre o polímero e o sistema nanoestruturado NTAC (YANG *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2021). Ressalta-se que o potencial zeta do revestimento na concentração de 0,1% foi de $+21,27 \pm 0,42$ o que indica um processo não eficaz de cobertura com o ácido hialurônico. A concentração de 0,5% obteve um valor de $-44,53 \pm 1,10$, favorável na perspectiva do revestimento. Entretanto, na avaliação em conjunto com os resultados apresentados na seção anterior (4.2.2.2), a concentração de 0,3% foi a mais favorável para prosseguimento dos testes experimentais. O gráfico, com o perfil de distribuição do potencial zeta, está disposto na Figura 15, o qual demonstra o resultado de 3 medidas realizadas em uma mesma amostra.

Figura 15 - Distribuição do potencial zeta da formulação polimérica nanoestruturada de tacrolimus revestida com 0.3% de ácido hialurônico na forma de hialuronato de sódio (NTAC-HA) após o preparo.



4.2.2.3 Medida de pH

A medida de pH das formulações poliméricas nanoestruturadas desenvolvidas foi realizada logo após o processo de fabricação e depois de 60 dias de armazenamento sob refrigeração (2 - 8°C). O pH da NTAC foi de $4,68 \pm 0,09$ (inicial) e $4,86 \pm 0,02$ (60 dias) e o da NTAC-HA $6,17 \pm 0,01$ (inicial) e $6,1 \pm 0,09$ (60 dias). Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os valores de pH do tempo inicial e em 60 dias de cada formulação. Entretanto, houve diferença significativa ($P > 0,05$) na comparação dos valores de pH da NTAC e da NTAC-HA.

O pH de formulações oftálmicas é um parâmetro crítico que pode influenciar no conforto, segurança, na estabilidade do produto e idealmente deve ser igual ao pH do fluido lacrimal, aproximadamente 7,4 (ALLEN *et al.*, 2005; ALDRICH *et al.*, 2013; AULTON; TAYLOR, 2016). Entretanto, o pH de uma preparação oftálmica desse ser avaliado estrategicamente para garantir a solubilidade e estabilidade do fármaco (ALLEN *et al.*, 2005).

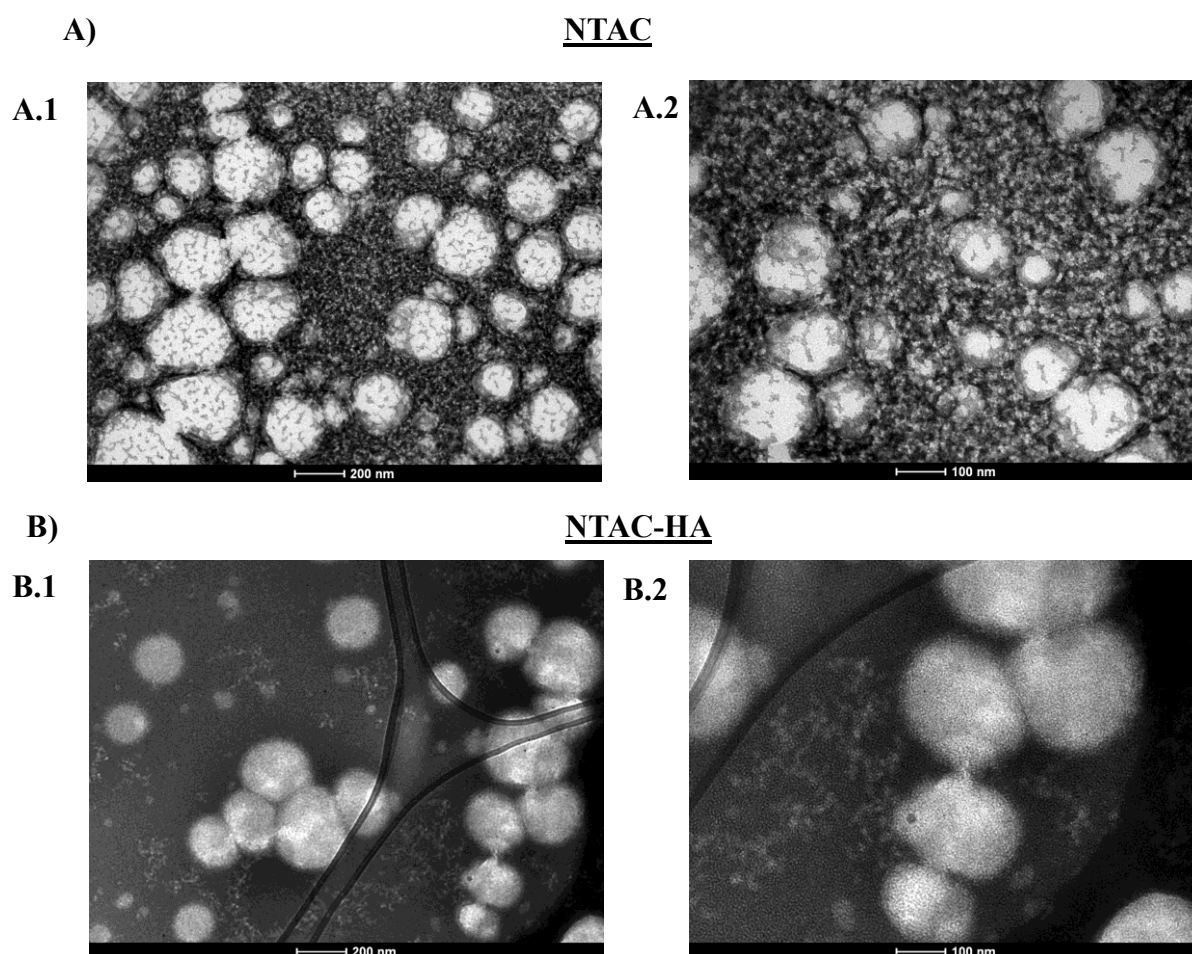
O olho é um órgão muito sensível e a introdução de uma formulação com o pH fora da faixa tolerada, além de causar desconforto para o paciente, pode influenciar significativamente na adesão ao tratamento e na eficácia terapêutica visto que uma fórmula mal tolerada geralmente produz irritação, o que causa o aumento do pestanejamento, produção adicional de lágrimas como um mecanismo de defesa para restaurar as condições fisiológicas normais e a consequente eliminação prematura do fármaco (AULTON; TAYLOR, 2016).

Analisando os valores de pH obtidos para as formulações desenvolvidas, o pH da formulação revestida com ácido hialurônico na forma de hialuronato de sódio, NTAC-HA, atende aos critérios de conforto para aplicação ocular tópica. O valor de pH encontrado para a NTAC também não foi considerado inadequado para o uso proposto e foi similar ao encontrado por Castro e colaboradores (2020) em nanocápsulas de Eudragit® RL100. É importante acrescentar que apesar do pH dessa formulação estar mais distante ao da lágrima fisiológica, comparado ao pH da NTAC-HA, é mencionado na literatura que o olho consegue tolerar preparações oftálmicas tópicas com um pH entre 3,5 e 9,0 e que danos oculares só são observados em valores de pH menores que 3,0 e acima de 10,8 (AULTON; TAYLOR, 2016; DEWEY-MATTIA; CRAWFORD; MASS, 2019). Além disso, é relatado que o polímero Eudragit® RL100 possui perfil de liberação pH-independente e que o fármaco tacrolimus possui suscetibilidade de degradação em pH maior que 7 (KAUR *et al.*, 2018; SAVIĆ *et al.*, 2019; KOVAČEVIĆA; MÜLLERA; KECKC, 2020). Portanto, as duas formulações são adequadas para o uso ocular tópico.

4.2.2.4 Morfologia

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para verificação da morfologia das formulações poliméricas nanoestruturadas desenvolvidas. As micrografias obtidas podem ser verificadas na Figura 16.

Figura 16 - Fotomicrografias de microscopia eletrônica de transmissão dos sistemas poliméricos nanoestruturados demonstrando o formato esférico bem definido e a evidência de formação de nanocápsulas. (A) - Formulação NTAC; (B) Formulação NTAC-HA. Barra da escala A.1; B.1: 200 nm ($\times 43,000$) e A.2; B.2: 100 nm ($\times 87,000$).



A partir das micrografias obtidas foi possível verificar, tanto na NTAC, como na NTAC-HA, partículas com formato esférico, estrutura bem definida e superfície uniforme, sem irregularidades evidentes. É importante acrescentar que há um indicativo de que nanopartículas com formato esférico apresentam características mais favoráveis para melhorar a performance dos fármacos (JINDAL 2017; ONUGWU *et al.*, 2023). De acordo com esses resultados encontrados, com a composição da nanopartícula (núcleo oleoso) e pelo método de preparação

utilizado para fabricação, as formulações podem ser classificadas como nanocápsulas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; ZIELIŃSKA *et al.*, 2020). Ressalta-se que esses dados são consistentes com os da literatura em que nanocápsulas foram preparadas a partir do polímero Eudragit® RL100 e pelo método de precipitação (KATARA; MAJUMDAR, 2013; CASTRO *et al.*, 2020). Em relação à NTAC-HA, verificou-se que o revestimento com o ácido hialurônico pode ter deixado a superfície da nanopartícula mais lisa, o que é vantajoso, visto que partículas isométricas com ângulos e bordas obtusos causam menos irritação do que partículas com ângulos e bordas afiadas (MALHOTRA; MAJUMDAR, 2001; KATARA; MAJUMDAR, 2013). Ainda sobre a NTAC-HA, também foi evidenciado que o tamanho da partícula foi maior que a da formulação não revestida. Esses resultados estão de acordo com os encontrados via técnica de espalhamento dinâmico de luz.

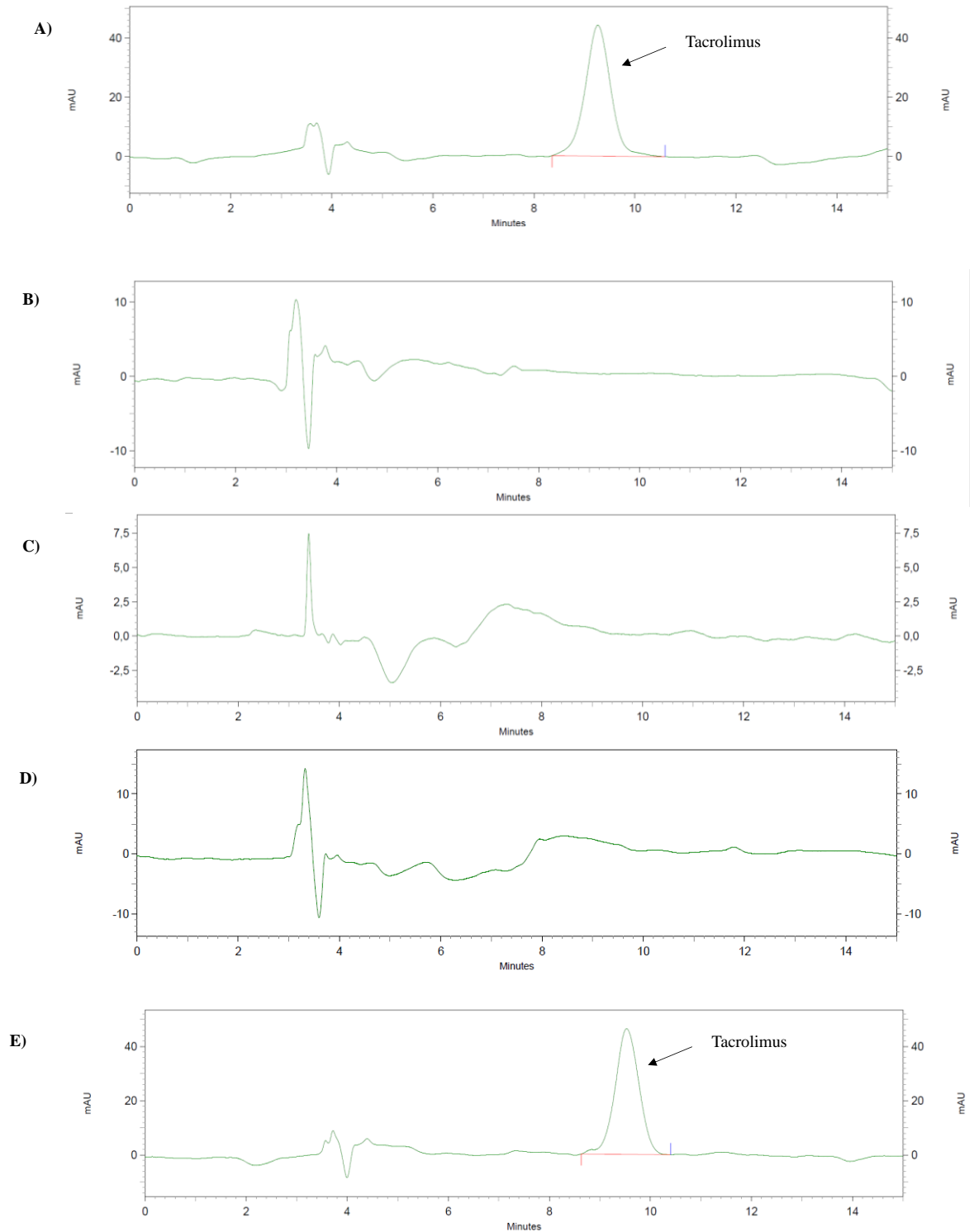
4.2.2.5 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE%) do tacrolimus na formulação polimérica nanoestruturada desenvolvida foi determinada por meio da quantificação de fármaco total presente na formulação (CASTRO *et al.*, 2020).

A quantificação do fármaco foi realizada por cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE) de acordo com o método validado por SOUZA (2012) apresentadas no Quadro 3. Foram avaliados no referido método, o parâmetro linearidade para determinação da faixa de trabalho mais adequada para o processo de quantificação e o parâmetro seletividade para verificar se os componentes da formulação interferem no desempenho da medição.

A seletividade foi verificada pela comparação do cromatograma da solução diluente (Acetonitrila:Metanol – (90:10)), da fase móvel (Metanol:Solução de ácido fosfórico 0,1% (v/v) pH 2,5 (80:20)), do placebo (nanopartícula vazia) e da solução do placebo fortificado a 100% do fármaco com a solução padrão de tacrolimus (100 µg/mL). Foi possível verificar em todas as comparações, a ausência de picos interferentes no tempo de retenção do tacrolimus e demonstrar a seletividade do método para distinguir o analito de interesse dos demais componentes da matriz. Nesse sentido, o método é capaz de identificar e quantificar o tacrolimus na formulação polimérica desenvolvida. Os cromatogramas podem ser visualizados na Figura 17.

Figura 17 - Cromatogramas obtidos para a avaliação da seletividade do método analítico para quantificação de tacrolimus na formulação polimérica. (A) - solução padrão de tacrolimus (100 µg/mL); (B) - solução diluente (Acetonitrila:Metanol – (90:10)); (C) – fase móvel (Metanol:Solução de ácido fosfórico 0,1% (v/v) pH 2,5 (80:20)); (D) - Placebo (nanopartícula vazia); (E) - Placebo fortificado a 100% do fármaco.



A linearidade do método de quantificação do tacrolimus foi avaliada no intervalo de 5 a 300 $\mu\text{g/mL}$. A curva analítica foi obtida pela correlação dos resultados de área em função da concentração.

Foi aplicado o teste de resíduo padronizado de Jacknife. Foram detectados 2 (dois) *outliers*, mantendo-se 16 (dezesesseis) pontos, dentro do limite permitido de exclusão de 22%. Na avaliação das premissas da regressão foi verificado pelo teste de Ryan-Joiner que os resíduos seguem a distribuição normal ($R_{eq} \geq R$ crítico). O valor obtido de R_{eq} foi igual a 0,9824 e o valor de R crítico para $\alpha = 0,01$ é de 0,9153 para $\alpha = 0,01$. No teste de Durbin-Watson foi verificado que não há correlação entre os resíduos e no teste de resíduos e no teste de Levene modificado foi verificado que há homocedasticidade. Os resultados detalhados da avaliação das premissas dos resíduos da regressão podem ser verificados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados da avaliação das premissas dos resíduos da regressão.

Premissas dos resíduos da regressão	Critério de aceitação	Resultados	Conclusões
Normalidade pelo teste de Ryan-Joiner	$R_{eq} \geq R_{\text{crítico}}$ para $\alpha = 0,01$	$R_{eq} = 0,9824$ $R_{\text{crítico}} = 0,9153$	Os resíduos seguem a distribuição normal
Independência pelo teste de Durbin-Watson	$du < d_{\text{calculado}} < 4-du$ para $\alpha=0,01$	$Du = 1,0875$ $D_{\text{cal}} = 1,588$ $4-du = 2,9124$	Não há correlação entre os resíduos
Homocedasticidade pelo teste de Brown-Forsythe ou Levene Modificado	$tL \leq t_{\text{crítico}}$ para $\alpha=0,01$	$tL = 2,520$ $t_{\text{crítico}} = 2,977$	Os resíduos são homocedásticos

Fonte: Adaptado de RIVELLI, 2021.

Após a confirmação de que os resíduos seguiram as referidas premissas, foi então verificado pela Análise de variância (ANOVA) que a regressão linear é estatisticamente significativa ($\alpha = 0,01$) e que não é desvio de linearidade na curva obtida. Os valores dos

coeficientes de determinação e de correlação para a quantificação do fármaco foram superiores a 0,99 e a equação da reta obtida foi $y = 56733x + 933949$ (Figura 18).

Figura 18 - Curva analítica obtida na avaliação da linearidade.

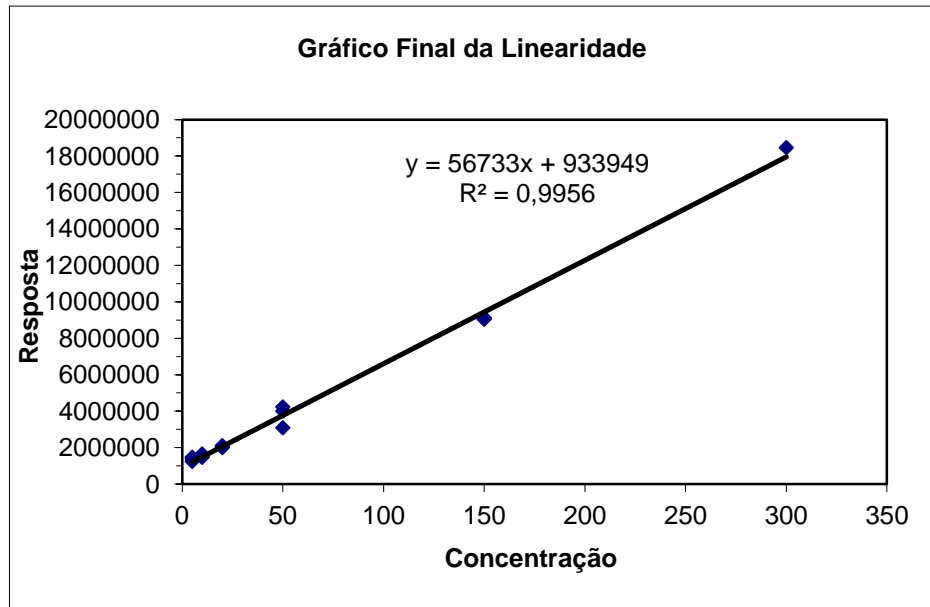
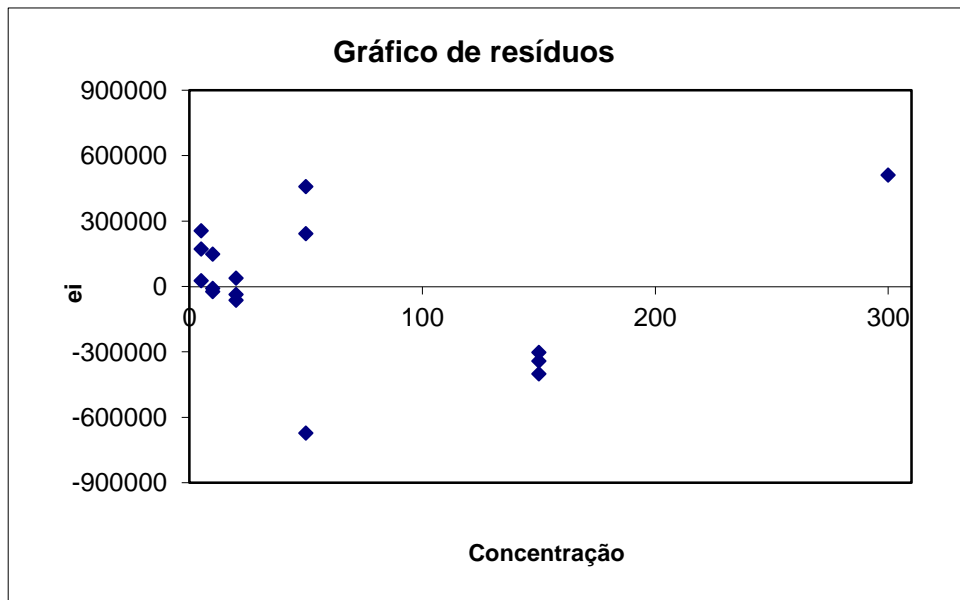


Figura 19 - Gráfico de resíduos da regressão.



Pela análise visual dos gráficos de resíduos da regressão nas Figura 19, é possível perceber que há uma distribuição aleatória ao longo do eixo 0, não apresentando tendências na dispersão.

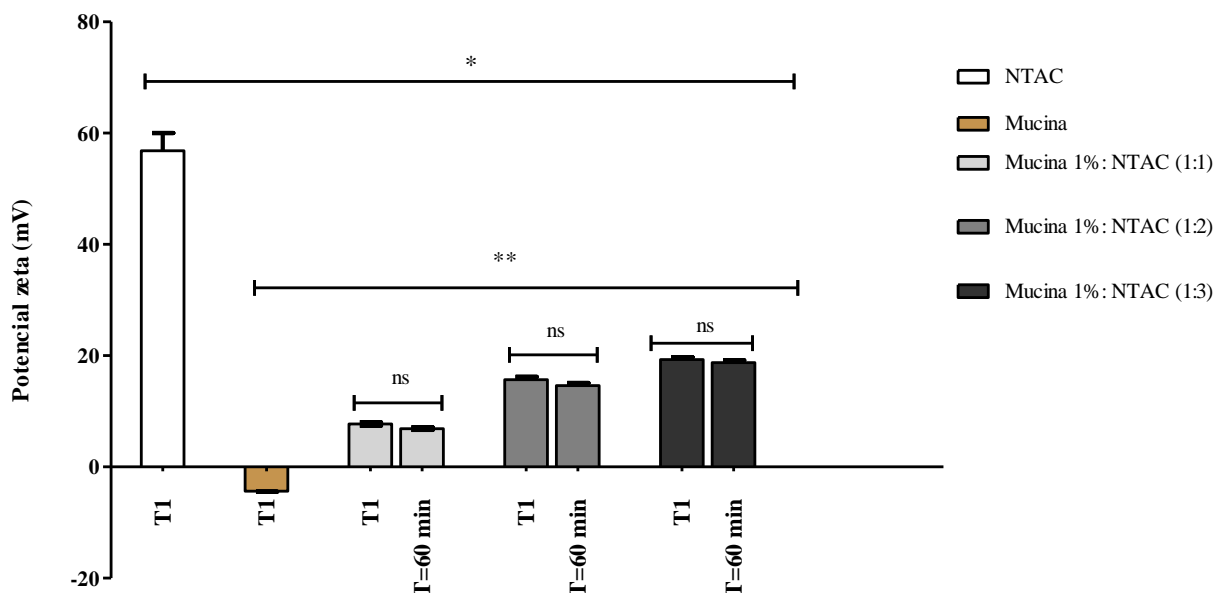
Assim, foi possível observar a linearidade do método para quantificação de tacrolimus desenvolvido por SOUZA, 2012 na faixa de 5 a 300 µg/mL e então, o método pode ser utilizado para quantificação do referido fármaco na formulação polimérica desenvolvida.

A eficiência média de encapsulamento do tacrolimus na formulação desenvolvida - NTAC, considerando triplicata das análises, foi de $91,02\% \pm 0,71$, logo após o processo de fabricação, o que indica que o método utilizado para o preparo das formulações e que a composição dos constituintes da formulação foi adequadamente selecionada para a obtenção de um sistema com o fármaco eficientemente encapsulado (CAMARGO, 2020; CASTRO *et al.*, 2020; ZIELIŃSKA *et al.*, 2020).

4.2.2.6 Avaliação da propriedade de mucoadesão

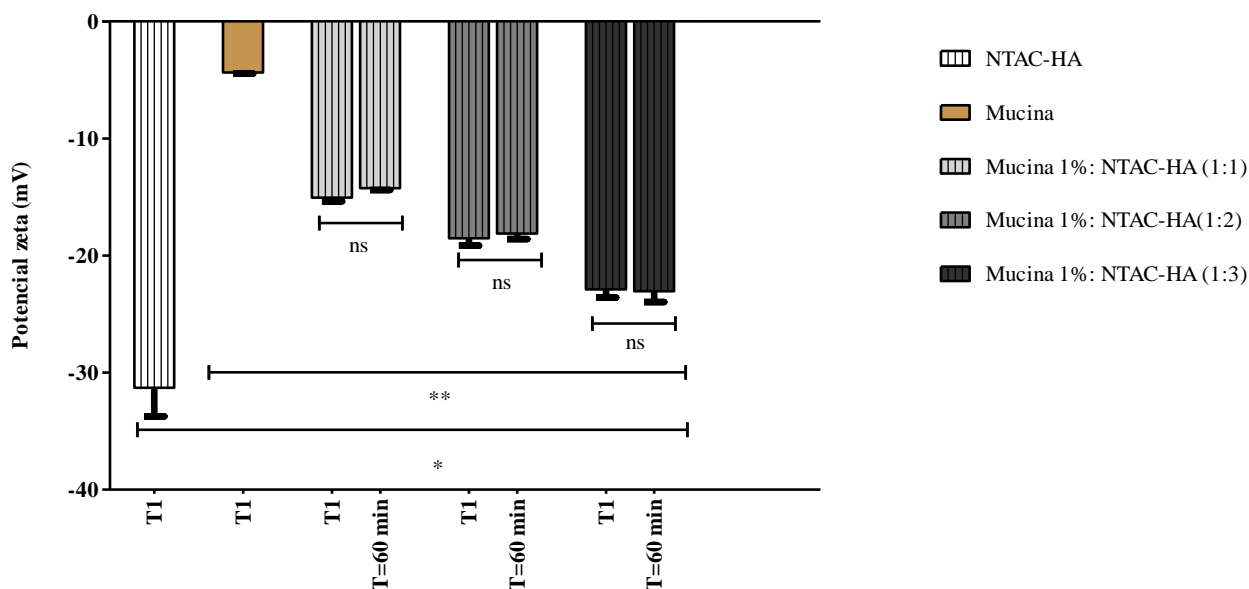
A interação dos polímeros utilizados para a preparação dos sistemas nanoestruturados e a mucina foi verificada pela variação da medida do potencial zeta (ZHU *et al.*, 2012; WOERTZ *et al.*, 2013; DI PRIMA *et al.*, 2019; CASTRO *et al.*, 2020). Dentre as vantagens de utilização desse método, pode ser destacado o uso de pequena quantidade de amostra e a facilidade da técnica (DAVE *et al.*, 2021). O potencial zeta da formulação polimérica nanoestruturada NTAC, conforme demonstrado no item 4.2.2.2, foi positivo, devido a presença de grupos de amônio quaternário na cadeia polimérica do Eudragit® RL100 (DAS; SURESH; DESMUKH, 2010; CASTRO *et al.*, 2020). O potencial zeta da suspensão de mucina 1%, foi negativo, $-4,36 \pm 0,27$, pela presença dos grupos aniônicos de ácido siálico em sua estrutura (DAVE *et al.*, 2021). Os valores de potencial zeta das misturas entre a NTAC e a suspensão de mucina, em todas as proporções, após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, foi positivo e significativamente diferentes ($P < 0,05$), demonstrando a interação eletrostática entre a suspensão de mucina carregada negativamente e a NTAC carregada positivamente (Figura 20). Além disso, nas misturas com maior proporção de NTAC, maiores foram as alterações nos valores de potencial zeta encontrados, sugerindo um comportamento dependente da concentração (CASTRO *et al.*, 2020) Na segunda leitura, após 60 minutos de incubação, não houve diferença estatística com os resultados encontrados na primeira leitura, sugerindo que o processo de mucoadesão não é afetado pelo tempo (CASTRO *et al.*, 2020).

Figura 20 - Resultados das medidas de potencial zeta da NTAC, da suspensão de mucina 1% e das misturas entre a suspensão de mucina 1% e NTAC (1:1; 1:2; 1:3). (T1) – leitura após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente e (T=60 min) - leitura após 60 minutos de incubação à temperatura ambiente. * Diferença estatística ($P < 0,05$) entre NTAC e as outras amostras; ** diferença estatística ($P < 0,05$) entre a suspensão de mucina 1% e as outras amostras; ns diferença não significativa.



O potencial zeta da NTAC-HA, também conforme demonstrado no item 4.2.2.2, foi negativo pela presença do ácido glucurônico em sua estrutura (AGUILERA-GARRIDO *et al.*, 2019). A adição da suspensão de mucina 1% em todas as proporções de NTAC-HA resultou no aumento, em módulo, do potencial zeta (Figura 21) e foi também observado o comportamento dependente da concentração, nos resultados de potencial zeta das misturas com maior proporção de NTAC-HA. Na segunda leitura, após 60 minutos de incubação, também não houve diferença estatística com os resultados encontrados na primeira leitura. Apesar da carga da mucina ser predominantemente negativa, estudos relatam que podem existir em sua estrutura regiões de carga positiva (GRAÇA *et al.*, 2018). Além disso, resultados semelhantes foram encontrados em experimentos utilizando polímeros de carga negativa e que apresentam propriedades mucoadesivas, como os alginatos e pectinas (DAVE *et al.*, 2021).

Figura 21 - Resultados das medidas de potencial zeta da NTAC-HA, da suspensão de mucina 1% e das misturas entre a suspensão de mucina 1% e NTAC-HA (1:1; 1:2; 1:3). (T1) – leitura após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente e (T = 60 min) – leitura após 60 minutos de incubação à temperatura ambiente. *diferença estatística ($P < 0,05$) entre NTAC-HA e as outras amostras; **diferença estatística ($P < 0,05$) entre a suspensão de mucina 1% e as outras amostras; ns diferença não significativa.



O ácido hialurônico é um polímero com propriedades mucodesivas bastante exploradas na literatura (GRAÇA *et al.*, 2018; AGUILERA-GARRIDO *et al.*, 2019; DAVE *et al.*, 2021; WENG SCHICK *et al.*, 2022) e também são encontrados na literatura relatos de que a força responsável pelas propriedades mucoadesivas do HA é a formação de pontes de hidrogênio entre os grupos carboxila e hidroxila hidrofílicos e os componentes do muco (grupos amino) (GRAÇA *et al.*, 2018; AGUILERA-GARRIDO *et al.*, 2019; DAVE *et al.*, 2021). Essas análises reforçam a possibilidade da combinação de interações no processo mucoadesivo (SMART, 2005; VARUM *et al.*, 2008; GRAÇA *et al.*, 2018; WENG SCHICK *et al.*, 2022).

Nesse sentido, os resultados indicam uma estável interação entre a mucina e as nanoformulações poliméricas desenvolvidas e conseqüentemente o potencial aumento do tempo de retenção do fármaco tacrolimus na superfície ocular.

4.2.2.7 Estudos iniciais de estabilidade física dos sistemas poliméricos nanoestruturados

A estabilidade física das formulações desenvolvidas (NTAC e NTAC-HA) foi avaliada em diferentes condições devido as propriedades de cada formulação. Os lotes de nanopartículas produzidos foram armazenados em frascos de vidro e protegidos da luz durante o estudo. O estudo de estabilidade é um parâmetro importante para avaliar a segurança, qualidade e eficácia

do produto. O objetivo dos estudos de estabilidade é verificar se as propriedades do produto permanecem dentro dos limites especificados por um período suficientemente longo sob a influência de diversas condições ambientais. Na prática industrial e regulatória, os estudos de estabilidade devem ser realizados através de estudos em tempo real e acelerados. O estudo de estabilidade acelerada possuiu o propósito de acelerar a degradação química ou física de um produto por condições forçadas de armazenamento (ou seja, temperatura e umidade). Esta condição de estresse é utilizada para analisar parâmetros de degradação cinética e determinar sua data de validade (ASTM 1980; USP, 2017). Dentre os principais parâmetros determinantes da estabilidade de uma nanopartícula podem ser mencionados tamanho, distribuição de tamanho, potencial zeta da superfície e verificação de fenômenos de agregação, como a coalescência, floculação, sedimentação e cremação (PHAN; HAES, 2019).

4.2.2.7.1 Estudos de estabilidade da formulação NTAC

A estabilidade física da formulação de tacrolimus – NTAC, foi avaliada após 90 dias sob diferentes condições de temperaturas: temperatura ambiente – $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Nanopartícula Lote 1), alta temperatura – $40^{\circ}\text{C} / 75\%$ umidade relativa (UR) (Nanopartícula Lote 2) e refrigeração $2 - 8^{\circ}\text{C}$ (Nanopartícula 3). Os resultados dos testes de diâmetro, distribuição de tamanho (índice de polidispersividade), potencial zeta obtidos pelas técnicas de espalhamento dinâmico/eletroforético de luz podem ser verificados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados dos parâmetros físico-químicos utilizados para a avaliação da estabilidade da formulação NTAC em diferentes condições de armazenamento. Cada resultado representa a média de três leituras realizadas pelo equipamento e está expresso como média±desvio padrão (DP) . Para os resultados do estudo de estabilidade acelerada T1 = 4 meses; T2 = 8 meses e T3 = 12 meses de estabilidade real. * P<0,005

Condição de armazenamento	Período	Parâmetros analisados para avaliação da estabilidade física - NTAC					
		Diâmetro (nm) (média ± DP)	P valor	IP (média ± DP)	P valor	Potencial Zeta (mV) (média ± DP)	P valor
Temperatura ambiente - 22 °C Nanopartícula Lote 1	Tempo 0	162,2 ± 0,95	0,1538	0,077 ± 0,02	0,4753	+ 58,53 ± 4,13	0,7855
	T1 - 30 dias	161,93 ± 0,40		0,070 ± 0,01		+ 56,30 ± 1,04	
	T2 - 60 dias	159,90 ± 1,86		0,069 ± 0,01		+ 57,63 ± 5,87	
	T3 - 90 dias	160,66 ± 0,25		0,081 ± 0,01		+ 56,43 ± 2,10	
T = 40°C / 75% UR - Nanopartícula Lote 2	Tempo 0	141,80 ± 1,34	0,0012*	0,091 ± 0,01	0,3414	+ 58,66 ± 13,89	0,2366
	T1 - 30 dias	142,33 ± 1,35		0,070 ± 0,01		+ 58,56 ± 2,13	
	T2 - 60 dias	141,30 ± 0,79		0,078 ± 0,02		+ 55,66 ± 4,72	
	T3 - 90 dias	133,00 ± 0,45*		0,087 ± 0,01		+ 42,9 ± 1,05	
T = 2 - 8°C - Nanopartícula Lote 3	Tempo 0	142,76 ± 0,35	0,1367	0,088 ± 0,01	0,5879	+ 49,73 ± 1,25	0,0063*
	T1 - 30 dias	141,20 ± 0,72		0,075 ± 0,01		+ 56,13 ± 1,70	
	T2 - 60 dias	143,33 ± 0,75		0,082 ± 0,01		+ 58,3 ± 0,34*	
	T3 - 90 dias	143,83 ± 1,20		0,076 ± 0,01		+ 58,56 ± 2,41*	

Os resultados do parâmetro tamanho obtidos logo após o processo de fabricação (Tempo 0) foram ligeiramente maiores no lote 1 do que nos lotes 2 e 3. Apesar dessa variabilidade, especificamente para o lote 1, já que os lotes 2 e 3 apresentaram resultados semelhantes ($P > 0,05$) e demonstram a melhoria no processo de fabricação, a referida diferença não tem impacto para o estudo de estabilidade. Ademais, não houve diferença estatística entre os valores de potencial zeta ($P > 0,05$) dos 3 lotes produzidos.

Os resultados da avaliação da estabilidade demonstram que não houve variação na avaliação do diâmetro, índice de polidispersão e no potencial zeta ($P > 0,05$) das nanopartículas armazenadas à temperatura ambiente – NTAC – Lote 1, nos tempos do estudo comparado com o tempo inicial ($T = 0$).

Em relação ao estudo estabilidade acelerada, realizada na NTAC - Lote 2, foi demonstrado que também não houve variação significativa nos resultados de índice de polidispersão e de potencial zeta ($P > 0,05$) entre os tempos de avaliação. Em relação ao diâmetro, não houve diferença estatística na comparação dos resultados do tempo 0 com os resultados do tempo 1 (correspondente à quatro meses) e do tempo 2 (correspondente à oito meses do estudo em tempo real). Entretanto, houve diferença estática ao comparar os resultados do tempo 0 com os resultados do tempo 3 (correspondente à doze meses do estudo em tempo real). Houve diminuição no tamanho da partícula. É preciso ressaltar que nesse estudo, foram utilizadas condições extremas de temperatura e umidade o que pode ter influenciado nos resultados obtidos.

Para a NTAC - Lote 3, armazenada sobre condição de refrigeração, a variação encontrada foi apenas em relação ao resultado de potencial zeta, com um aumento no valor da carga de superfície na comparação do tempo 0 com os tempos 2 e 3. Entretanto, o valor se manteve positivo, conforme desejável para essa formulação e dentro do limite de estabilidade eletroforética (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; ZIELIŃSKA *et al.*, 2020).

Os valores de eficiência de encapsulamento para a NTAC – Lote 1 e a NTAC – Lote 3, ao final do estudo foram $70,83\% \pm 7,07$ e $95,05\% \pm 3,38$ respectivamente. Comparando com os dados apresentados na seção 4.2.2.5, foi possível verificar que a nanopartícula armazenada sob refrigeração, demonstrou resultados mais favoráveis na manutenção do fármaco tacrolimus encapsulado dentro da matriz polimérica. Um estudo com a avaliação do referido parâmetro a cada mês do estudo de estabilidade é interessante para evidenciar com mais detalhes esses resultados.

Na avaliação visual (macroscópica), não foi verificado em todos os tempos do estudo e para todas as condições de armazenamento, alterações na coloração e no aspecto da NTAC.

Acrescenta-se que também foi verificado em cada um dos tempos, pela técnica de espalhamento múltiplo de luz, a presença de fenômenos de desestabilização reversíveis (cremagem e sedimentação) e irreversíveis (coalescência e segregação) (MENGUAL *et al.*, 1999a; MENGUAL *et al.*, 1999b; CELIA *et al.*, 2009). A técnica foi realizada utilizando equipamento Turbiscan Lab®, o qual analisa a estabilidade de amostras opacas e concentradas. Esse equipamento fornece os perfis de transmissão (*transmission*) e de retroespalhamento de luz (*backscattering*) das dispersões por meio de varreduras da base ao topo da cubeta óptica. Ambos os perfis dependem da concentração e do tamanho das partículas (MENGUAL *et al.*, 1999a; MENGUAL *et al.*, 1999b; CELIA *et al.*, 2009). As variações na base e no topo da célula estão relacionadas aos fenômenos de migração e as variações que incluem a parte central da

célula estão relacionadas à variação no tamanho da partícula (MENGUAL e col., 1999a; MENGUAL e col., 1999b).

Os perfis de transmissão das nanopartículas, devido à sua natureza opaca, foram nulos, ou seja, não houve variação maior que $\pm 2\%$ durante toda a leitura (Figuras 22, 23 e 24). Nesse sentido, a análise em relação aos fenômenos de instabilidade foi realizada pelo perfil de retroespalhamento (TURBISCAN, 2015). Ressalta-se que foi inserido o volume de 10 mL da formulação o que representa aproximadamente 22 mm, logo, os primeiros (2 mm) e os últimos milímetros varridos pelo feixe de luz indicam a transmissão/retroespalhamento na célula de vidro, sem, no entanto, varrer a formulação.

Figura 22 - Perfil de transmissão da formulação NTAC – Lote 1, armazenada em temperatura ambiente - 22 °C . (A) Tempo 0 - logo após o preparo da formulação; (B) Tempo 1 - após 30 dias; (C) Tempo 2 – após 60 dias; (D) após 90 dias. Os perfis de transmissão foram nulos, ou seja, não houve variação maior que $\pm 2\%$ durante toda a leitura. A linha vertical pontilhada representa o menisco da amostra

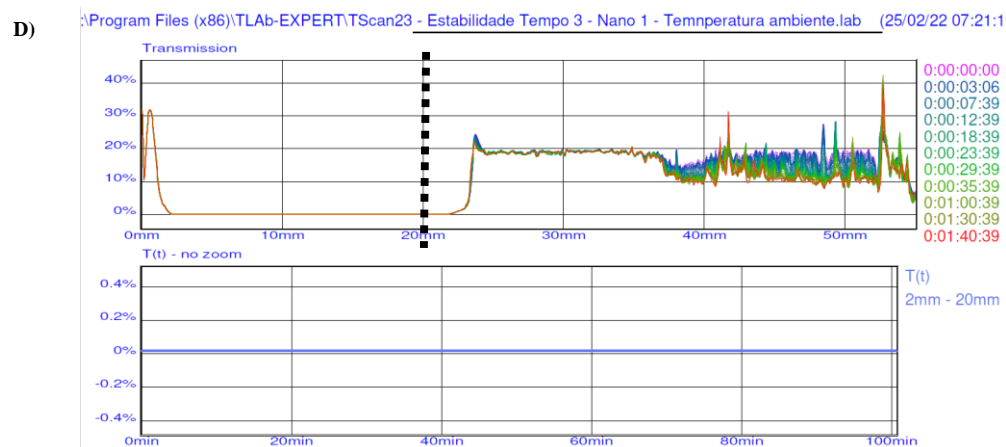
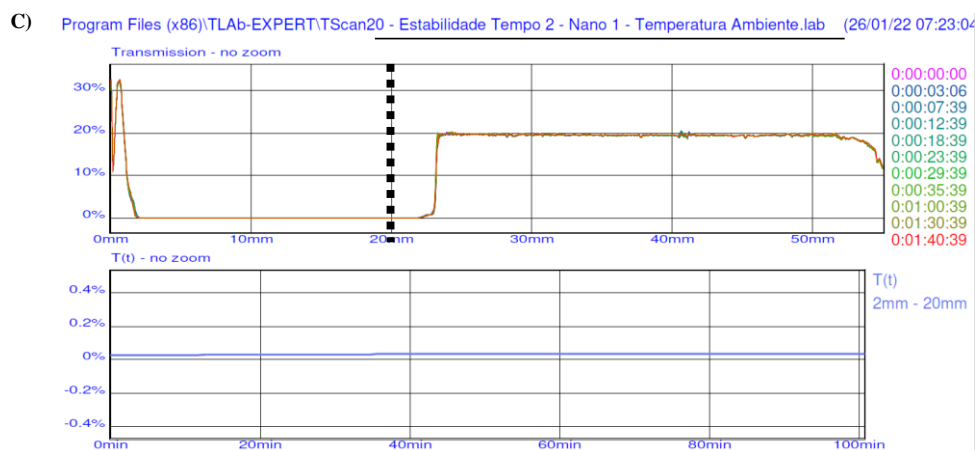
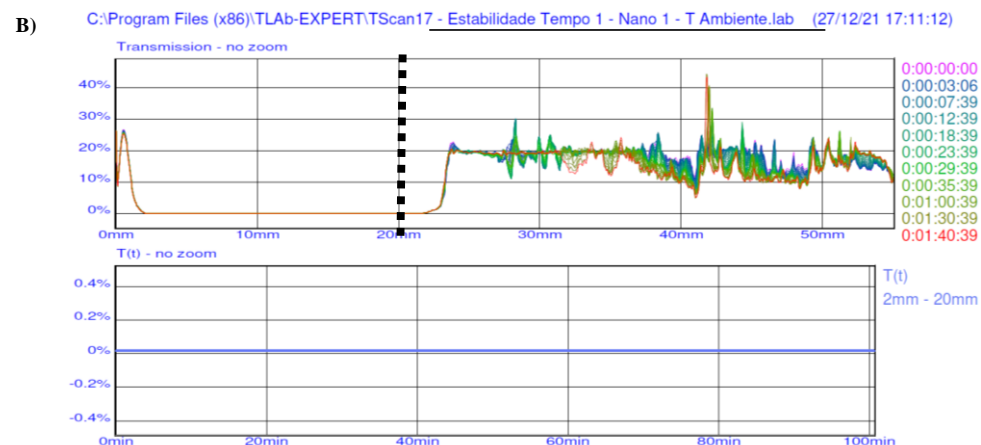
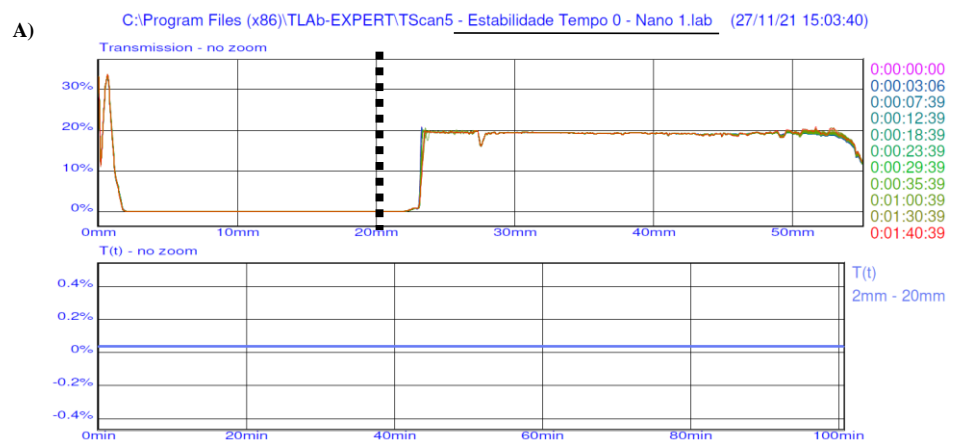
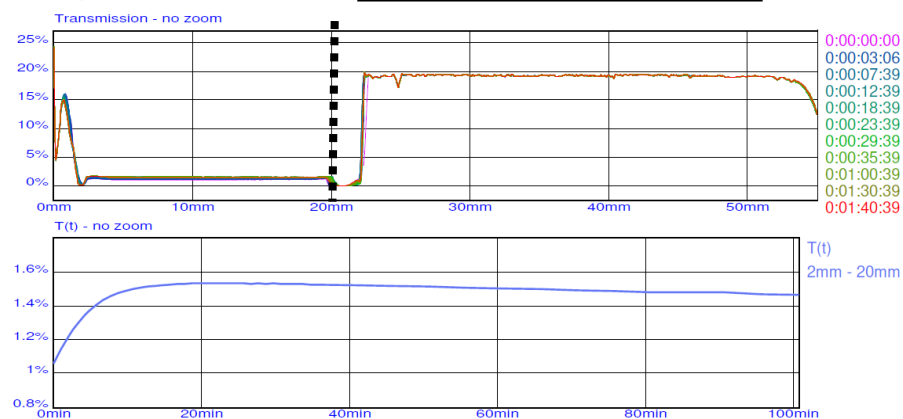
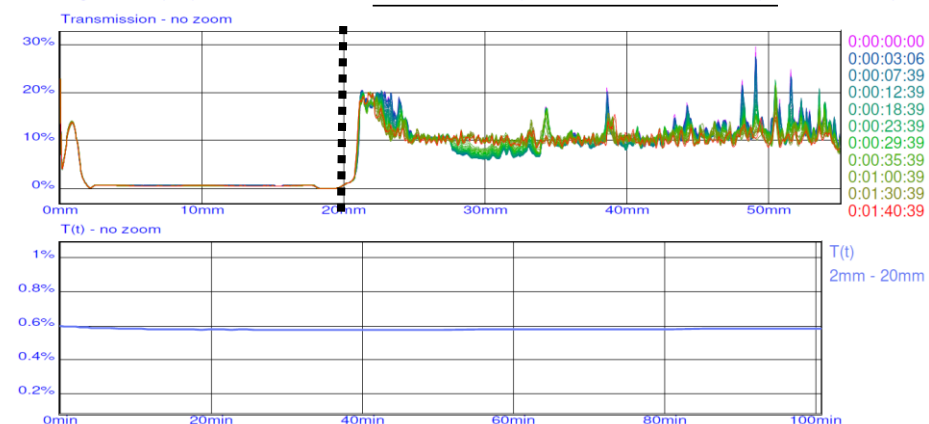


Figura 23 - Perfil de transmissão da formulação NTAC – Lote 2, armazenada sob a condição de 40°C e 75% umidade relativa (A) Tempo 0 - logo após o preparo da formulação; (B) Tempo - após 30 dias; (C) Tempo 2 – após 60 dias; (D) após 90 dias. Os perfis de transmissão foram nulos, ou seja, não houve variação maior que $\pm 2\%$ durante toda a leitura. A linha vertical pontilhada representa o menisco da amostra.

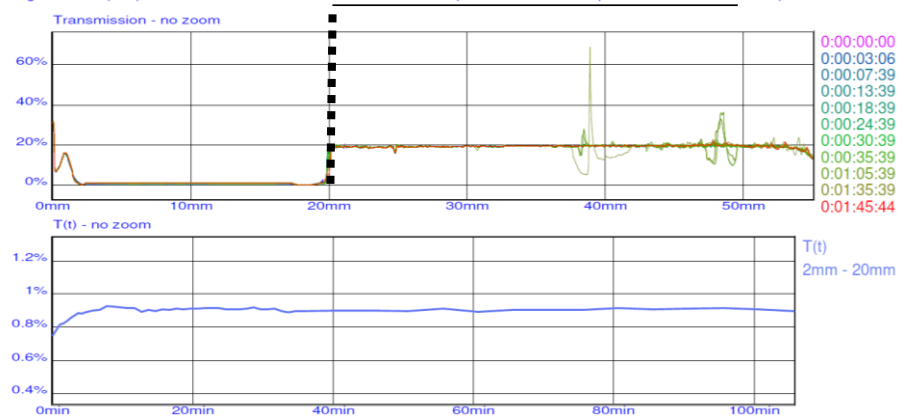
A) C:\Program Files (x86)\TLAb-EXPERT\TScan6 - Estabilidade Tempo 0 - Nano 2 - TAcelerado.lab (27/11/21 17:02:22)



B) C:\Program Files (x86)\TLAb-EXPERT\TScan13 - Estabilidade Tempo 1- Nano 2 - TAcelerado.lab (27/12/21 13:23:12)



C) \Program Files (x86)\TLAb-EXPERT\TScan21 - Estabilidade Tempo 2 - Nano 2 - Temperatura Acelerada.lab (26/01/22 09:10:2)



D) Program Files (x86)\TLAb-EXPERT\TScan24 - Estabilidade Tempo 3 - Nano 2 - Temperatura Acelerada.lab (25/02/22 09:40:3)

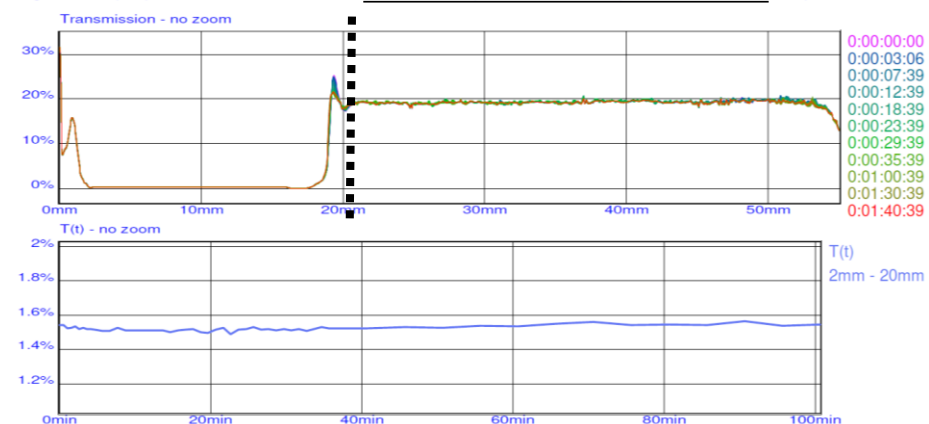
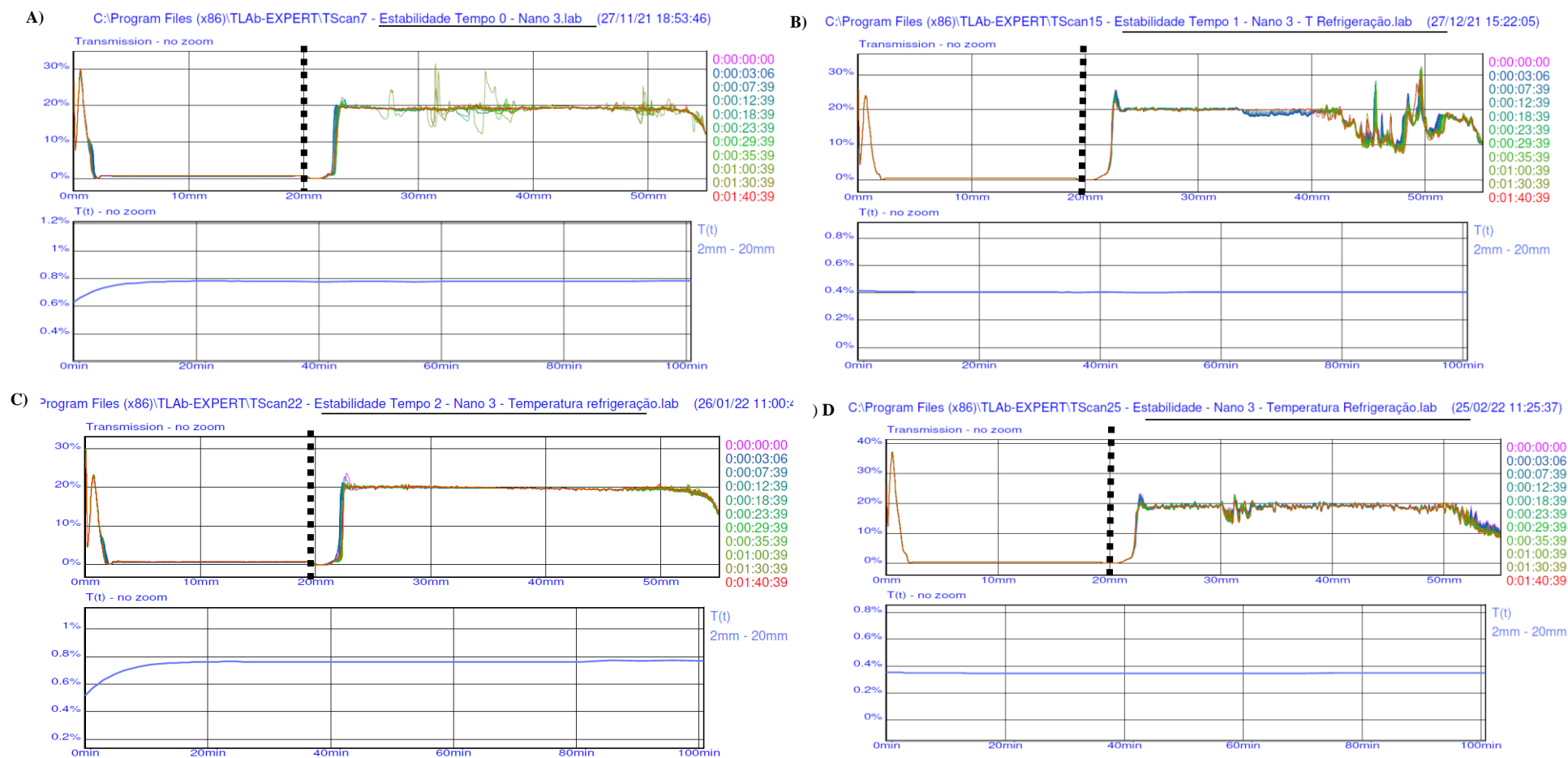


Figura 24 - Perfil de transmissão da formulação NTAC – Lote 3, armazenada sob a condição de refrigeração – 2-8°C. (A) Tempo 0 - logo após o preparo da formulação; (B) Tempo - após 30 dias; (C) Tempo 2 – após 60 dias; (D) após 90 dias. Os perfis de transmissão foram nulos, ou seja, não houve variação maior que $\pm 2\%$ durante toda a leitura. A linha vertical pontilhada representa o menisco da amostra.



As modificações no sinal de transmissão podem ocorrer como função do tempo e da migração de partículas e é graficamente visualizado na forma de picos positivos (aumento do retroespalhamento) ou negativos (diminuição do retroespalhamento). Variações acima de 10% são representativas de instabilidade na formulação (CELIA *et al.*, 2009). Os perfis de variação de retroespalhamento (ΔBS) podem ser verificados nas Figuras 25, 26 e 27.

De acordo com os gráficos das referidas figuras, foi possível verificar que houve, em todas as condições de armazenamento, predominantemente, na parte central da célula, uma leve diminuição do retroespalhamento e pode estar associado a ocorrência de floculação que é um fenômeno reversível de agregação de partículas (TURBISCAN, 2015). Entretanto, essa variação foi em todos os tempos e em todas as condições de armazenamento menor que 1% . Além disso, como demonstrando na Tabela 3, não foi verificado aumento no tamanho da partícula, que é característico desse fenômeno de instabilização (TURBISCAN, 2015). Assim, pode-se inferir que a formulação NTAC não apresentou evidências de instabilidade cinética irreversível durante o período do estudo de estabilidade.

Figura 25 - Perfil de variação de retroespalhamento (Δ BS) da formulação NTAC – Lote 1, armazenada em temperatura ambiente - 22 °C. (A) Tempo 0 - logo após o preparo da formulação; (B) Tempo 1 - após 30 dias; (C) Tempo 2 – após 60 dias; (D) após 90 dias. O Δ BS foi < 10%.

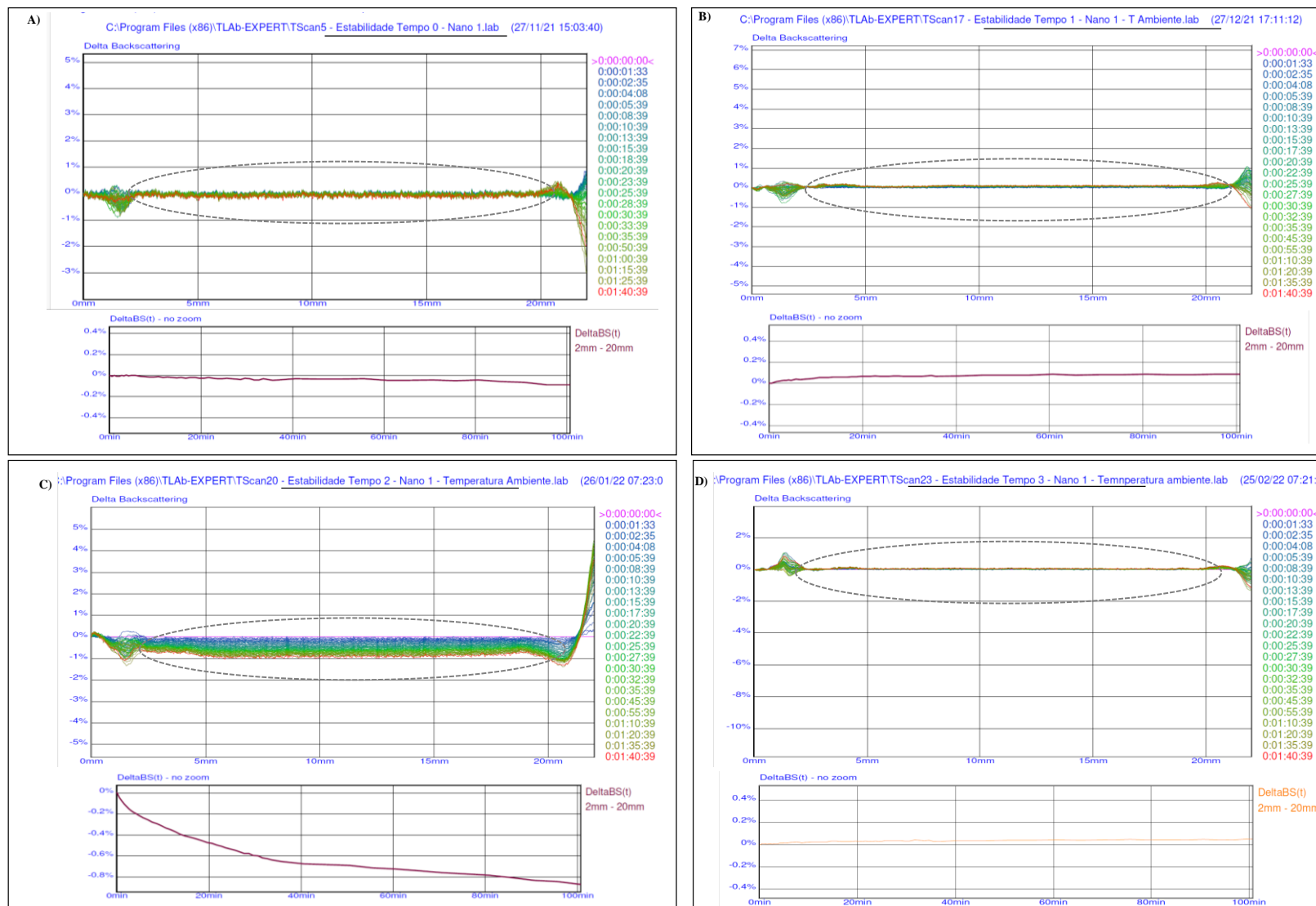


Figura 26 - Perfil de variação de retroespalhamento (Δ BS) da formulação NTAC – Lote 2, sob a condição de 40°C e 75% umidade relativa. (A) Tempo 0 - logo após o preparo da formulação; (B) Tempo - após 30 dias; (C) Tempo 2 – após 60 dias; (D) após 90 dias. O Δ B foi < 10%.

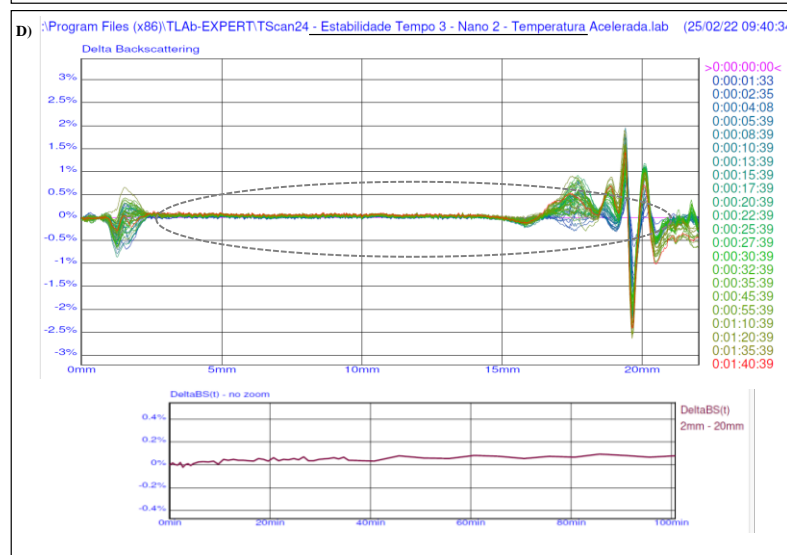
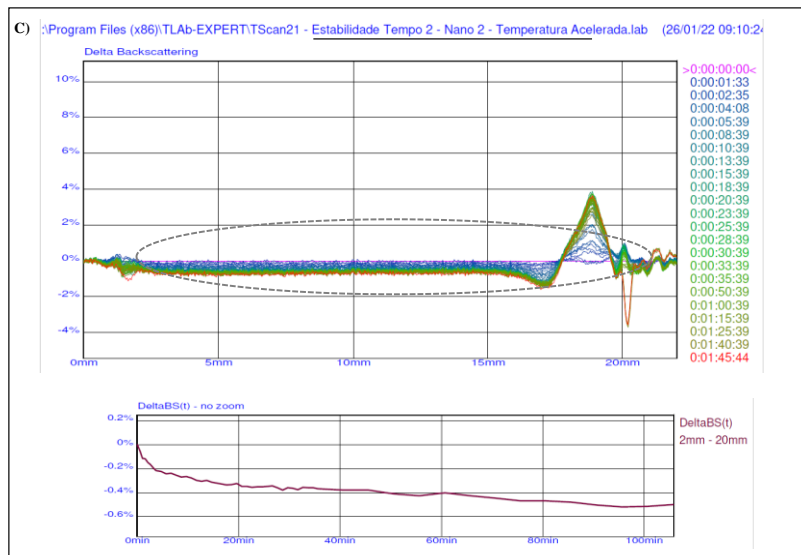
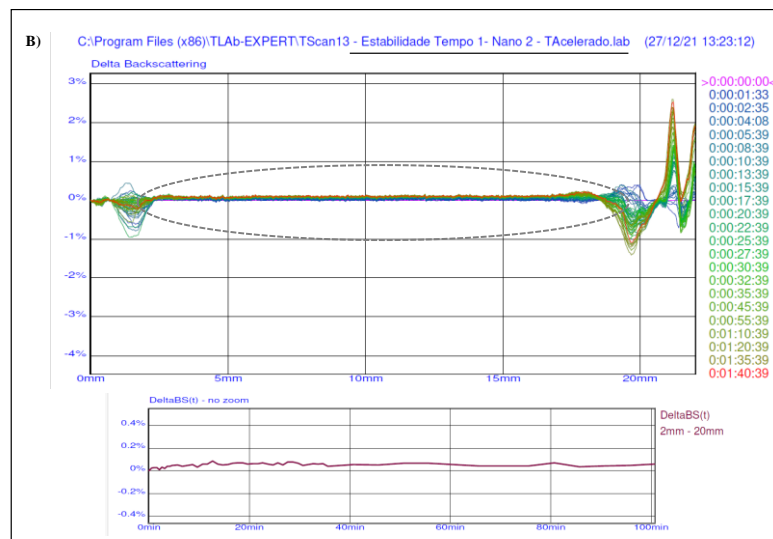
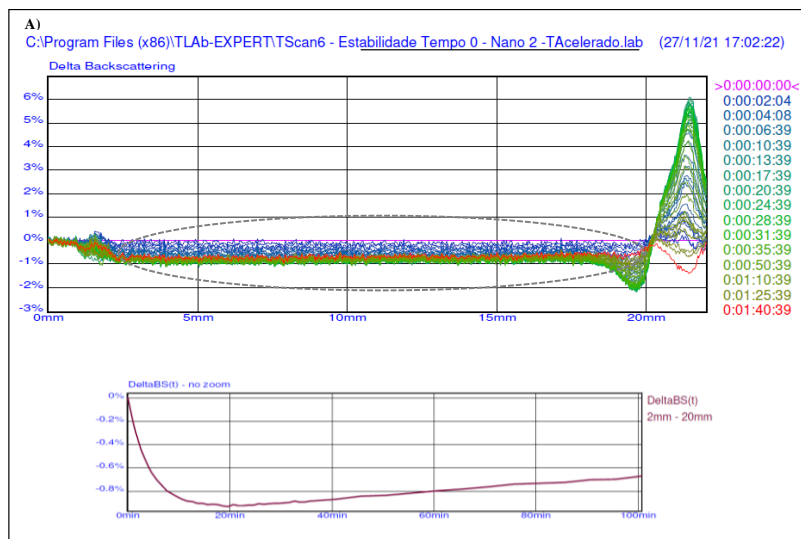
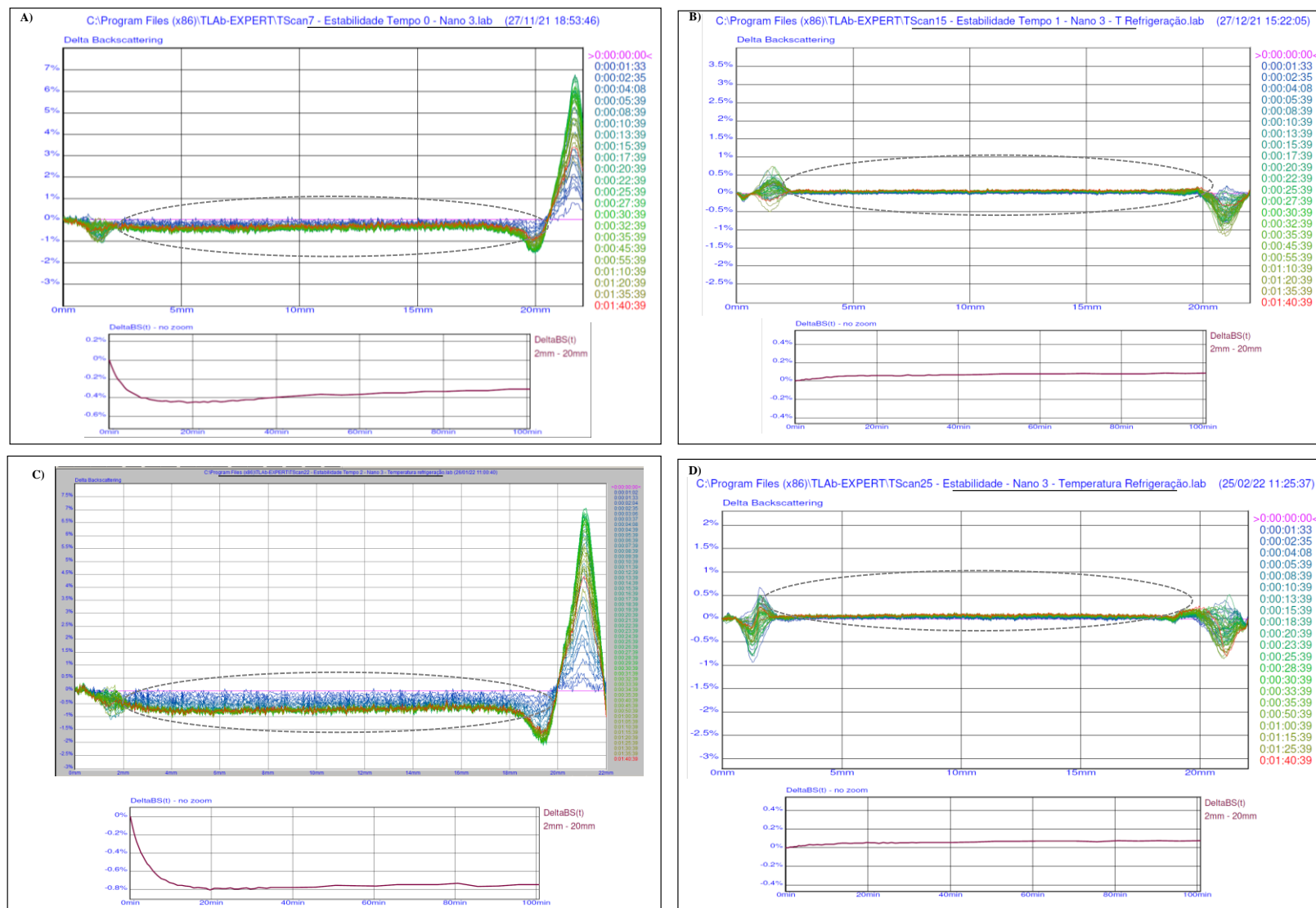


Figura 27 - Perfil de variação de retroespalhamento (Δ BS) de tacrolimus sob a condição de refrigeração – 2-8°C (Nanopartícula Lote 3). (A) Tempo 0 - logo após o preparo da formulação; (B) Tempo - após 30 dias; (C) Tempo 2 – após 60 dias; (D) após 90 dias. O Δ B foi < 10%.



Assim, na análise crítica dos resultados dos testes de diâmetro, distribuição de tamanho e potencial zeta, pode-se inferir que a formulação desenvolvida se mostrou estável durante 90 dias nas condições de armazenamento em temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e na condição de armazenamento sob refrigeração ($2 - 8^\circ\text{C}$). Na condição de armazenamento 40°C e 75% UR, foi verificada a estabilidade integral até o segundo tempo de análise, que corresponde à 8 meses de armazenamento em estabilidade real. Além disso, considerando os resultados iniciais de eficiência de encapsulamento obtidos ao final do estudo, é sugerido que a NTAC seja preferencialmente armazenada sob refrigeração ($2 - 8^\circ\text{C}$).

4.2.2.7.2 Estudos de estabilidade da formulação NTAC-HA

A estabilidade física da nanopartícula de tacrolimus – NTAC-HA, foi avaliada em diferentes tempos: T0 (início do estudo); T1 (30 dias após o início do estudo); T2 (60 dias após o início do estudo) e T3 (90 dias após o início do estudo) sob refrigeração ($2 - 8^\circ\text{C}$). A condição de temperatura utilizada no estudo foi definida pela maior possibilidade de degradação do HA em temperatura ambiente (SNETKOV *et al.*, 2020). Os resultados dos testes de diâmetro, distribuição de tamanho (índice de polidispersividade), potencial zeta obtidos pelas técnicas de espalhamento dinâmico/eletroforético de luz podem ser verificados nas Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados dos parâmetros físico-químicos utilizados para a avaliação da estabilidade da formulação NTAC-HA sob refrigeração ($2 - 8^\circ\text{C}$). Cada resultado representa a média de três leituras realizadas pelo equipamento e está expresso como média \pm desvio padrão (DP) * $P < 0,005$.

Condição de armazenamento	Período	Parâmetros analisados para avaliação da estabilidade física - NTAC -HA					
		Diâmetro (nm) (média \pm DP)	P valor	IP (média \pm DP)	P valor	Potencial Zeta (mV) (média \pm DP)	P valor
T = $2 - 8^\circ\text{C}$ NTAC-HA	Tempo 0	293,30 \pm 15,52	<0,0001*	0,555 \pm 0,08	0,0017*	-32,69 \pm 5,69	0,0874*
	T1 - 30 dias	256,20 \pm 10,65*		0,478 \pm 0,07		-27,23 \pm 0,42	
	T2 - 60 dias	237,60 \pm 9,77 *		0,411 \pm 0,05*		-21,34 \pm 1,62*	
	T3 - 90 dias	245,70 \pm 9,53*		0,379 \pm 0,06*		-31,02 \pm 3,24	

Os resultados da avaliação da estabilidade da NTAC-HA demonstram que houve variação significativa ($P < 0.05$) dos resultados de tamanho em todos os tempos de avaliação comparado com o tempo inicial do estudo. De maneira geral, houve o decréscimo desses valores, o que pode estar relacionado a um aumento da dissolução do Eudragit RL100[®] da cadeia polimérica ao adicionar à solução aquosa contendo HA. Os grupos de amônio quaternário presentes na estrutura do Eudragit RL100[®] proporcionam alta permeabilidade do polímero à água, o que favorece o intumescimento e aumento da porosidade da matriz e acelera a liberação do fármaco (KİLİÇARSLAN, BAYKARA, 2004; MANDAL; ALEXANDER; RIGA, 2010; SOLTANI *et al.*, 2016). Além disso, a referida variação também pode ter ocorrido pela própria degradação do HA adicionado à nanoformulação (SIMULESCU *et al.*, 2015; SNETKOV *et al.*, 2020; HINTZE; SCHNABELRAUCH; ROTHER, 2022). No estudo realizado por Simulescu e colaboradores (2015) para determinação da cinética de degradação do HA em solução aquosa, foi observado a diminuição da massa molecular e a manutenção dos valores de índice de polidispersão, o que indica que a degradação não ocorreu pela cisão aleatória das cadeias de hialuronato em fragmentos de vários comprimentos, que geralmente é o mecanismo de degradação química e não enzimática (STERN *et al.*, 2007). A hipótese levantada foi que a degradação ocorreu pelos residuais microbianos liberados e contidos no meio aquoso, ou como resíduo de produção na amostra sólida, antes da adição do protetor (azida de sódio) (SIMULESCU *et al.*, 2015). É importante ressaltar que não foi adicionado à NTAC-HA nenhum agente protetor (microbiano) e que a condição de esterilidade não foi um parâmetro utilizado nesse trabalho o que pode então ter influenciado em um possível processo de degradação.

Na avaliação do potencial zeta, os valores foram similares e também atenderam os requisitos relacionados à estabilidade eletroforética coloidal (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; ZIELÍŃSKA *et al.*, 2020). O valor se manteve negativo o que sugere que o processo de revestimento com o ácido hialurônico não foi transitório e que a interação eletrostática foi mantida de maneira eficaz.

Na avaliação visual (macroscópica), não foi verificado em todos os tempos do estudo, alterações na coloração e no aspecto da formulação, mas foi verificado durante o armazenamento a presença de sedimentos, que foram facilmente redispersados sob agitação manual. Os perfis de transmissão das nanopartículas – NTAC-HA, também foi nula ($< \pm 2\%$ durante toda a leitura) (Figura 28) e por isso, análise em relação aos fenômenos de instabilidade também foi realizada pelo perfil de retroespalhamento (TURBISCAN, 2015). Na avaliação da variação do retroespalhamento (Figura 29) não foram verificados fenômenos de

desestabilização com variações maiores do que 10% durante o período do estudo, apesar de que após 90 dias de armazenamento foi verificado de forma mais acentuada a presença de cremagem (clarificação), com a redução do sinal de restroespalhamento.

Figura 28 - Perfil de transmissão da formulação NTAC - HA, armazenada sob a condição de refrigeração (2 - 8°C). (A) Tempo 0 - logo após o preparo da formulação; (B) Tempo - após 30 dias; (C) Tempo 2 – após 60 dias; (D) após 90 dias. Os perfis de transmissão foram nulos, ou seja, não houve variação maior que $\pm 2\%$ durante toda a leitura. A linha vertical pontilhada representa o menisco da amostra.

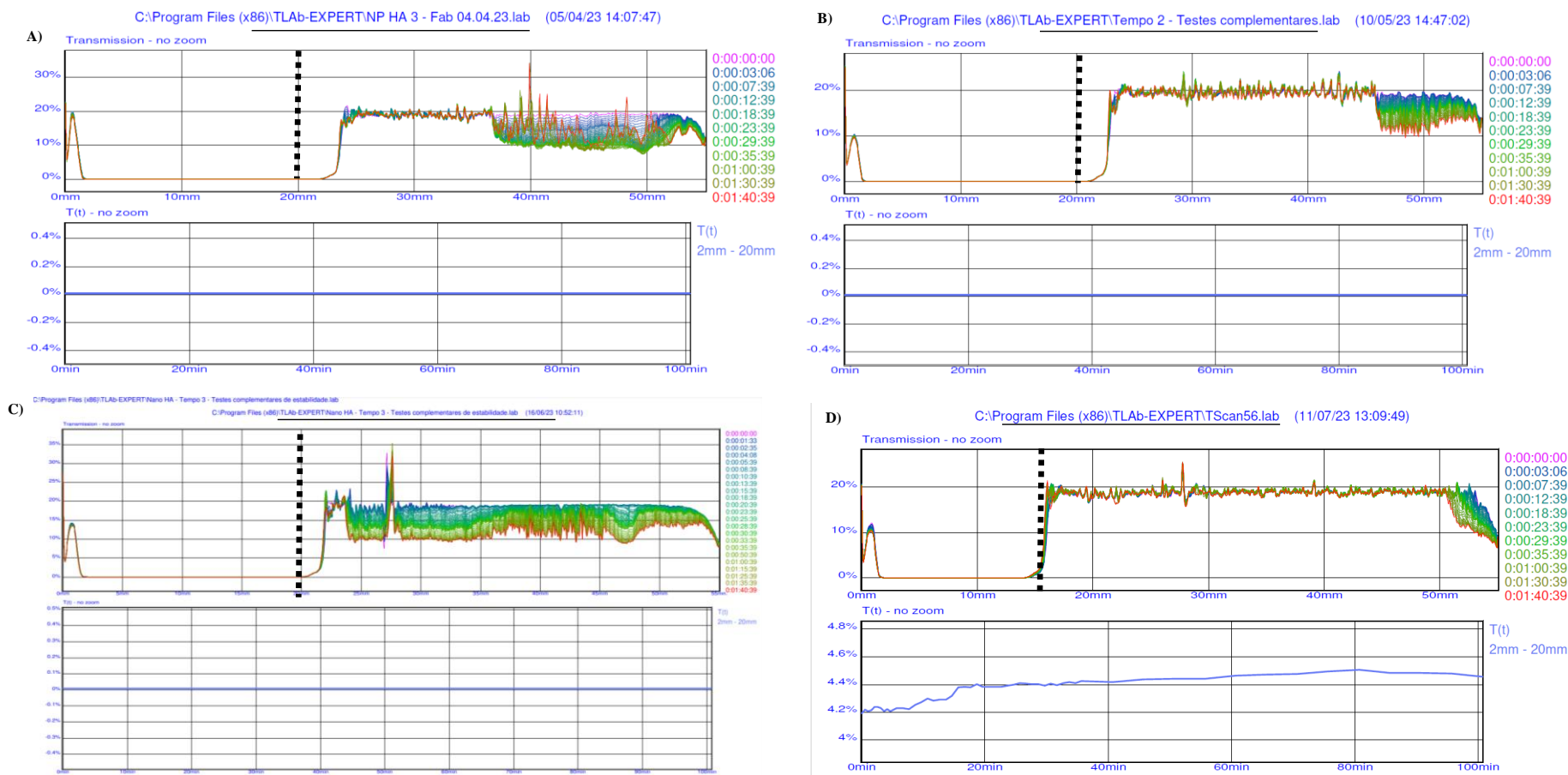
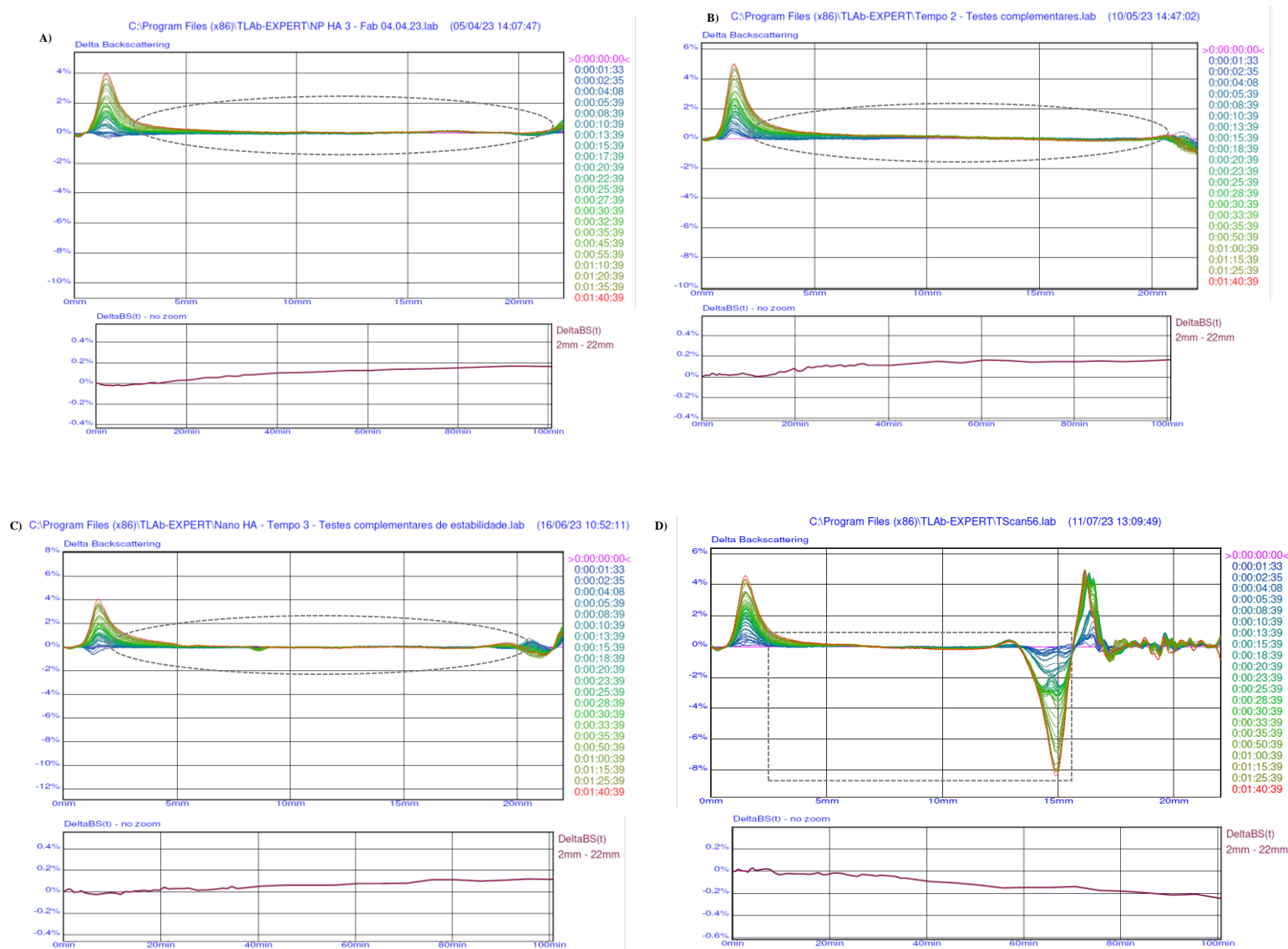


Figura 29 - Perfil de variação de retroespalhamento (Δ BS) da formulação NTAC - HA, armazenada sob a condição de refrigeração (2 - 8°C). (A) Tempo 0 - logo após o preparo da formulação; (B) Tempo - após 30 dias; (C) Tempo 2 - após 60 dias; (D) após 90 dias.



4.3 CONCLUSÕES

O sistema nanoestruturado contendo tacrolimus e formulado a partir do polímero Eudragit® RL 100 (NTAC) foi obtido com sucesso e de maneira eficaz pelo método de nanoprecipitação evidenciado pelo aspecto característico de suspensões coloidais poliméricas: opalescente, branco, homogêneo, fluído e ausente de precipitado visível. A eficiência de encapsulação do sistema foi favorável e uma quantidade significativa e adequada de fármaco foi encapsulado na nanoformulação.

Adicionalmente, o revestimento da nanopartícula pré-formada com o ácido hialurônico na forma de hialuronato de sódio pela técnica de adsorção também foi empregada de maneira satisfatória. O efeito do revestimento da NTAC foi evidenciado pela interação eletrostática que resultou em inversão da carga do potencial zeta de positivo para negativo e aumento do diâmetro da partícula.

As técnicas utilizadas para caracterização foram ferramentas importantes para otimizar o processo de desenvolvimento e incluem basicamente a de espalhamento dinâmico de luz, espalhamento eletroforético de luz, espalhamento múltiplo de luz, microscopia eletrônica de transmissão e medição de pH. Nesse sentido, foi evidenciado que a NTAC e a NTAC-HA, possuem tamanho dentro da escala nanométrica, com índice de polidispersão adequado, o que indica que as formulações são unimodais e homogêneas. A carga eletrostática superficial de ambos os sistemas é apropriada para evitar a agregação das partículas e os valores são contrários (opostos) e de acordo com o esperado. Para a NTAC, o valor positivo é resultante dos grupos de amônio quaternário presentes na cadeia polimérica do Eudragit® RL100. Para a NTAC-HA, a carga negativa é proveniente do ácido glucurônico presentes na estrutura do ácido hialurônico. Além disso, os valores de pH das formulações são compatíveis para a administração ocular tópica, sendo que o da NTAC-HA é mais próximo ao pH fisiológico, o que é uma vantagem desse sistema.

As fotomicrografias demonstraram o formato esférico, bem definido e com ausência de irregularidades aparentes para os dois sistemas e que podem ser classificados como nanocápsulas. Na avaliação das propriedades mucoadesivas, foi possível verificar que houve interação dos polímeros utilizados para preparação da NTAC e NTAC-HA com a mucina pela variação da medida do potencial zeta. Essa evidência pode indicar o potencial aumento do tempo de retenção do fármaco tacrolimus, veiculado nos referidos sistemas nanoestruturados, na superfície ocular.

Nos resultados preliminares de estabilidade foi possível verificar que a formulação NTAC mostrou resultados mais favoráveis do que a NTAC-HA, com o perfil estável para os parâmetros diâmetro e distribuição de tamanho (índice de polidispersividade) e potencial zeta, para a condição de temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e refrigeração ($2 - 8^\circ\text{C}$) durante o período de 90 dias. Na condição de armazenamento extrema, 40°C e 75% UR foi verificada a estabilidade integral até o terceiro tempo de análise, que corresponde a oito meses de armazenamento em estabilidade real. Na avaliação dos dados da eficiência de encapsulamento, os dados sugerem maior estabilidade sob a condição de refrigeração. Entretanto, uma avaliação mais detalhada do referido parâmetro, em cada mês do estudo de estabilidade deve ser realizada para confirmação dos resultados. Para a NTAC-HA, os resultados demonstraram principalmente a diminuição do tamanho da partícula com variação estatística significativa durante o período do estudo, realizado sob refrigeração considerando as propriedades intrínsecas do ácido hialurônico. Apesar do decréscimo, que pode estar relacionado com a dissolução da parede polimérica do polímero Eudragit RL® 100 e/ou a própria degradação do ácido hialurônico, a avaliação dos fenômenos de instabilização pela técnica de espalhamento múltiplo de luz, demonstrou a presença de floculação e cremagem em valores abaixo do estabelecido para formulações instáveis.

Assim, considerando os resultados predominantemente satisfatórios encontrados no processo de fabricação e de caracterização dos sistemas nanoestruturados desenvolvidos, NTAC e NTAC-HA, justifica-se o prosseguimento dos experimentos com a avaliação do perfil de segurança biológica para as duas formulações.

**5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO OCULAR
DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO
TACROLIMUS (NTAC; NTAC-HA)**

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Materiais

Ovos embrionados espécie *Gallus domesticus* e linhagem Ross, da empresa Rivelli, Mateus Leme, MG, Brasil; tampão fosfato (PBS 1X); hidróxido de sódio (NaOH – 0,1 M); solução de Davidson; cloridrato de cetamina (Ketalex®, Venco, Brasil); cloridrato de xilazina (Xilazin®, Syntec Brasil); tiopental sódico (Thiopentax, Cristália, Brasil); formulações poliméricas nanoestruturadas previamente fabricadas (NTAC e NTAC-HA).

5.1.2 Equipamentos

Sistema de purificação de água (Millipore, EUA); incubadora de ovos Premium Ecológica LTDA (Brasil); oftalmoscópio binocular indireto (Welch Allin, Brasil), lâmpada de fenda (Apramed HS5, Brasil), Spectralis HRA+OCT (Heidleberg Engineering, Alemanha); Microscópio óptico - Modelo Axio Imager M2 (Zeiss®, Alemanha).

5.1.3 Animais

Para avaliação da citotoxicidade pelo teste ocular *in vivo*, foram utilizados oito (8) coelhos, fêmeas da raça Nova Zelândia, pesando entre 1,8 – 2,0 Kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em sala de manutenção de coelhos de responsabilidade no Biotério de Experimentação da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), a qual é climatizada (16 a 22°C), com trocas completas de ar sem filtração absoluta, com fotoperíodo de 12h claro:12h escuro. Ração e água foram fornecidos sem restrição e com monitoramento diário. O experimento foi iniciado após o período de 2 semanas de adaptação e de análise clínico-veterinária. Ao final do experimento, foi realizada em cada um dos animais, medicação pré-anestésica utilizando 3 mg/kg de xilazina com 40 mg/kg de cetamina, por via intramuscular. Em seguida, por via intravenosa, foi administrada, na veia marginal da orelha dos animais, uma sobredose letal de anestésico geral (Tiopental, 90 mg/kg).

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as políticas institucionais de experimentação em animal e o estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Fundação Ezequiel Dias, protocolo n° 030/2021 (Anexo I).

5.1.4 Métodos

5.1.4.1 Avaliação do perfil de toxicidade dos sistemas poliméricos nanoestruturados

O *screening*/ triagem inicial do potencial de irritação ocular dos sistemas poliméricos nanoestruturados contendo o fármaco tacrolimus (NTAC ; NTAC-HA) foi realizado pelo teste *in vitro*, em membrana córion-alantoide de ovo embrionado. Além disso, para complementar/confirmar os resultados obtidos pelo teste *in vitro* foi realizada a avaliação *in vivo* pelo teste de Draize .

5.1.4.1.1 Avaliação da toxicidade pelo teste em membrana córion-alantoide de ovo embrionado (método *in vitro*)

O potencial de toxicidade das formulações poliméricas nanoestruturadas de tacrolimus (NTAC e NTAC-HA) foi avaliado *in vitro* pelo teste em membrana córion-alantoide de ovo embrionado (*Hen's Egg Test/ Hühner-Embryonen Test* - HET-CAM). O teste foi realizado de acordo com o protocolo recomendado pelo Comitê Organizador Interagências para Validação de Métodos Alternativos - ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). O referido grupo promove a validação, a regulamentação e aceitação de métodos alternativos que melhor predizem os efeitos ecológicos e para a saúde humana, em comparação aos métodos usuais (CAZARIN, CORRÊA, ZAMBRONE, 2004; ICCVAM, 2010).

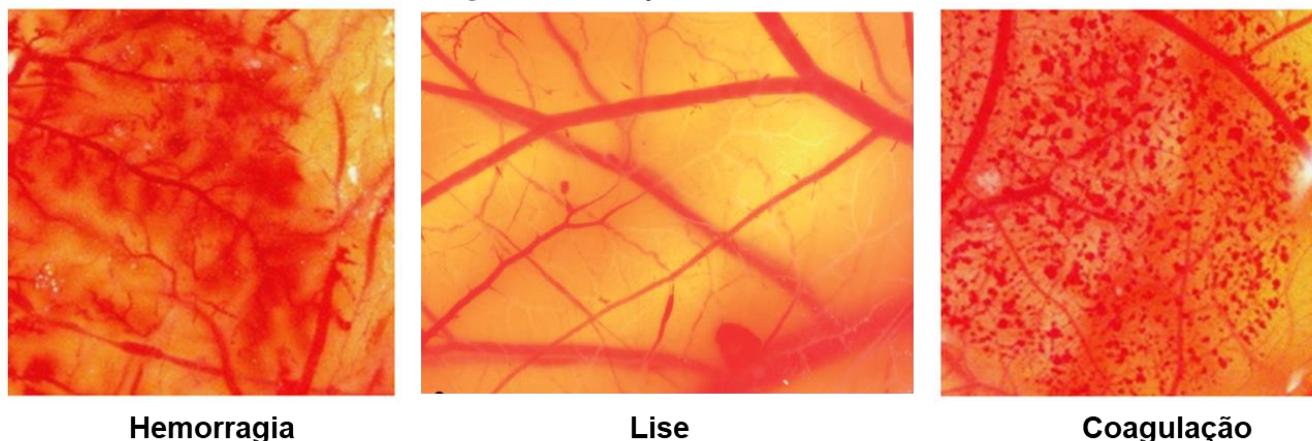
O fundamento do método é baseado na aplicação da substância teste na membrana corio-lantóide (CAM) de ovos fertilizados e os resultados são avaliados pelo tipo de irritação (lise, hemorragia ou coagulação) (LUEPKE, 1985; CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004). Segundo Eichenbaum e colaboradores (2013), a verificação dos referidos efeitos vasculares pode ser evidenciada por:

- Hemorragia: sangramento dos vasos da membrana corion-alantóide (CAM), que podem ser localizados (vários pontos de sangramento) ou difuso (sangramento em toda a CAM);
- Lise: dano da estrutura do vaso endotelial, ou seja, os vasos desaparecem da CAM (desintegração da parede do vaso) e / ou eles se tornam completamente brancos de forma que nenhuma circulação sanguínea possa ser observada.

- **Coagulação:** o fluxo sanguíneo dentro dos vasos diminui ou é interrompido como resultado da trombose. Consequentemente, "galhos de árvore" são formados e o diâmetro do vaso é aumentado.

A demonstração dos efeitos vasculares pode ser verificada na Figura 30.

Figura 30 - Definição de efeitos vasculares.



Fonte: Adaptado de MARQUARDT *et al.*, 2010; RUPENTHAL; GREEN; ALANY, 2011.

Para o ensaio, ovos embrionados da espécie *Gallus domesticus* e da linhagem Ross foram incubados à temperatura de 37°C e 60% de umidade relativa, na posição horizontal, utilizando uma incubadora automática digital (ICCVAM, 2010). No décimo dia de desenvolvimento, foi realizada a abertura dos ovos, na região da câmara de ar e cuidadosamente removida a membrana interna, após umidificação com tampão fosfato (PBS 1X), para exposição da membrana cório-alantoide. Paralelamente, os ovos foram divididos em 4 grupos, compostos por 6 ovos, de acordo com o tipo de amostra aplicada conforme descrito abaixo:

Grupo 1 - Controle positivo: administração de 300 µL de hidróxido de sódio 0,1 M;

Grupo 2 - Controle negativo : administração de 300 µL de tampão fosfato (PBS 1X)

Grupo 3 - NTAC : administração de 300 µL da formulação polimérica nanoestruturada de tacrolimus (NTAC)

Grupo 4 - NTAC-HA : administração de 300 µL da formulação polimérica de tacrolimus nanoestruturada revestida com ácido hialurônico (NTAC-HA)

Após aplicação das amostras e dos controles, foi realizado o monitoramento pelo período de 300 segundos do aparecimento dos efeitos vasculares anteriormente relatados.

Foram retiradas fotografias dos ovos antes (Tempo 0) e após a aplicação das soluções (controles e amostra), nos tempos 30 segundos, 2 e 5 minutos.

Cada imagem obtida, foi individualmente avaliada e, em seguida, combinados com a avaliação geral do grupo, para obter uma pontuação (*score*), utilizada para classificar o nível de irritação da substância em estudo. O valor máximo dessa escala é 21. O controle negativo deve apresentar *score* de 0 e o positivo entre 10 e 19.

Assim, o índice de severidade (*score*) da irritação foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$IS = \left[\frac{301 - t(h)}{300} \right] * 5 + \left[\frac{301 - t(l)}{300} \right] * 7 + \left[\frac{301 - t(c)}{300} \right] * 9 \quad (3)$$

Fonte: MARQUARDT *et al.*, 2010 ; SILVA *et al.*, 2019.

Em que:

- IS: Índice de severidade
- Tempo de hemorragia: tempo em segundos do primeiro surgimento de hemorragia;
- Tempo de lise: Tempo em segundos do primeiro surgimento de lise do vaso na CAM;
- Tempo de coagulação: Tempo em segundos do surgimento de coagulação proteica na CAM.

A classificação do grau de irritação das substâncias testes foram então realizadas de acordo correlação com o escore encontrado (Tabela 5).

Tabela 5 - Relação dos escores das reações observadas no teste HET-CAM com a classificação da irritação.

Escore das reações	Classificação da irritação
0 - 0,9	Não irritante ou praticamente não irritante
1 - 4,9	Irritação leve ou fraca
5 - 8,9 ou 5 - 9,9	Irritação moderada
9 - 21 ou 10 - 21	Irritação severa ou forte

Fonte: LUEPKE, 1985; ICCVAN, 2010.

5.1.4.1.2 Avaliação da toxicidade pelo teste ocular de Draize (método *in vivo*)

A avaliação do potencial de irritação ocular das formulações poliméricas nanoestruturadas de tacrolimus também foi realizada *in vivo* pelo teste de Draize (WHILHELMUS, 2001). Os oito (8) animais da raça Nova Zelândia foram divididos aleatoriamente e igualmente em dois grupos experimentais conforme descrição abaixo:

Grupo 1: Instilação de 0,1 mL (100 µL) da formulação polimérica de tacrolimus (NTAC) no saco conjuntival do olho direito (controle positivo) e nenhuma aplicação no olho esquerdo (controle negativo).

Grupo 2: Instilação de 0,1 mL (100 µL) da formulação polimérica de tacrolimus revestida com ácido hialurônico (NTAC-HA) no saco conjuntival do olho direito (controle positivo) e nenhuma aplicação no olho esquerdo (controle negativo).

Os olhos dos animais em cada grupo foram inicialmente avaliados clinicamente por um oftalmologista, com o uso de lâmpada de fenda e oftalmoscópio direto. Após essa verificação preliminar, foi realizada a instilação em dose única, no saco conjuntival do olho direito de cada um dos animais, de 0,1 mL (100 µL) das respectivas formulações poliméricas de tacrolimus. O olho esquerdo de cada animal foi utilizado como controle e não recebeu nenhum tratamento. As análises clínicas foram novamente realizadas após 1, 24, 48 e 72 horas, utilizando os mesmos equipamentos usados no tempo inicial. A córnea, íris e conjuntiva dos olhos direito e esquerdo de cada animal foram analisadas quanto à existência de qualquer sinal de irritação, os quais foram pontuados de acordo com os parâmetros e escores do teste de Draize para avaliação da severidade das lesões oculares (Tabela 6).

Tabela 6 - Parâmetros e escores do teste de Draize para avaliação da severidade das lesões oculares.

Estrutura ocular	Avaliação		Escores
	Parâmetro/tipo de lesão	Característica	
CÓRNEA	Opacidade – grau de densidade (realizar a leitura na área mais densa)	Área difusa ou espalhada; detalhes da íris claramente visíveis.	1
		Áreas translúcidas facilmente discerníveis; detalhes da íris ligeiramente turvos.	2
		Áreas opalescentes; detalhes da íris não visíveis; tamanho da pupila um pouco perceptível.	3
		Córnea opaca; íris invisível.	4
	Área da córnea envolvida	Um quarto ou mais (diferente de zero).	1
		Maior que um quarto e menor que metade	2
		Maior que metade e menor que três quartos.	3
		Maior que três quartos até a área total.	4
ÍRIS	Características gerais	Pregas acima do normal; congestão, inchaço, e/ou injeção circocórnea, injeção circocórnea; íris continua reagindo à luz (ainda que lentamente);	1
		Sem reação à luz, hemorragia e destruição grosseira.	2
CONJUNTIVA	Vermelhidão da pálpebra conjuntival	Vasos definitivamente infundidos acima do normal.	1
		Mais difusa, em vermelho mais escuro e vasos individuais não facilmente discerníveis.	2
		Difusa e vermelha robusta com aparência de músculo.	3
	Quemose	Qualquer inchaço acima do normal (incluindo a membrana nictitante).	1
		Inchaço óbvio com inversão parcial da pálpebra.	2
		Inchaço com a pálpebra fechada pela metade.	3
		Inchaço com a pálpebra fechada mais da metade próxima de completamente fechada	4
	Secreção	Qualquer quantidade acima do normal;	1
		Secreção com umedecimento da pálpebra e cílios próximos à pálpebra;	2
		Secreção com umedecimento da pálpebra e áreas consideráveis ao redor do olho.	3

Fonte: Adaptado de WHILHELMUS, 2001

Cada resultado clínico obtido, foi individualmente pontuado de acordo com as pontuações anteriormente descritas e, em seguida, foi realizada a média do somatório de todos os escores para obter a avaliação geral/pontuação final do grupo. Escores zero (0) foram inseridos para a ausência de surgimento de manifestações clínicas na córnea, íris e conjuntiva. A pontuação média máxima (*Maximum Average Score* - MAS) de cada grupo foi obtida com os resultados dos 4 animais (n=4). A classificação do nível de irritação da formulação foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos na Tabela 7 (YU *et al.*, 2015; MODI *et al.*, 2022)

Tabela 7 - Relação da pontuação total média das alterações observadas no teste de irritação ocular aguda (teste de Draize) com a classificação da irritação.

Escores das reações	Classificação da irritação
0 - 3	Não irritante
4 - 8	Irritação leve
9 - 12	Irritação moderada
13 - 16	Irritação severa ou forte

Fonte: YU *et al.*, 2015; MODI *et al.*, 2022

5.1.4.1.3 Testes complementares para verificação de alterações na estrutura da córnea

Após a finalização do teste de Draize, foi realizada a verificação de alterações dos parâmetros morfológicos no segmento anterior do olho, principalmente na estrutura das córneas dos animais pelo exame de Tomografia de Coerência Óptica (OCT) e por Histologia.

5.1.4.1.3.1 Técnica de Tomografia de Coerência Óptica (OCT)

Antes da instilação das nanoformulações poliméricas/início do teste e após o término do teste de Draize (após 72 horas da instilação), os animais foram anestesiados (3mg/kg de xilazina com 40mg/kg de cetamina por via intramuscular), realizada a aplicação de uma gota de filme lacrimal nos olhos dos animais e obtidas imagens topográficas transversais das córneas, em alta

resolução, pela técnica de Tomografia de Coerência Óptica (OCT) utilizando o equipamento Spectralis HRA+OCT.

Além da verificação visual da integridade da estrutura das córneas, foi realizado o cálculo da medida da espessura total do tecido utilizando o software ImagJ® (versão 1.50i - National Institutes of Health, EUA). A avaliação estatística dos dados obtidos foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) *one way* com teste posterior de Tukey. As diferenças significativas foram aceitas ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

5.1.4.1.3.2 Histologia

Após o término do teste de Draize, os animais foram eutanasiados, com sobredose de anestésico (Tiopental (90 mg/Kg). e foi realizada a remoção do bulbo ocular. Os olhos enucleados foram inseridos em um frasco de 50 mL contendo solução de Davidson (Tabela 8) e foram fixados por 24 horas. Após esse período, os olhos foram mantidos em álcool etílico 70%, realizada a clivagem/corte do material de forma sagital e o acondicionamento em cassetes histológicos. Na etapa de processamento, foi realizada a desidratação do tecido com álcool etílico em diferentes graduações alcoólicas e a clarificação/diafanização, para aumento da afinidade com a parafina, com xilol. Após a infiltração da parafina líquida no material biológico (impregnação), foram realizados cortes finos no tecido (4 μ m) e a coloração com hematoxilina/eosina. A análise das lâminas preparadas foi realizada em microscópio ótico Modelo Axio Imager M2 (Zeiss®, Alemanha).

Tabela 8 - Constituição da solução de Davidson utilizada para fixação histológica

Componente	Concentração (v/v)
Álcool etílico 95%	33,0%
Ácido Acético Glacial	11,5%
Formalina Tamponada 10%	22,0%
Água purificada	q.s.p 100 mL

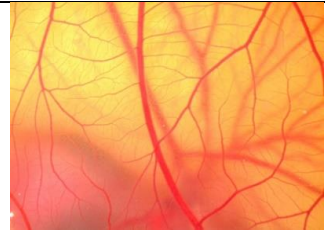
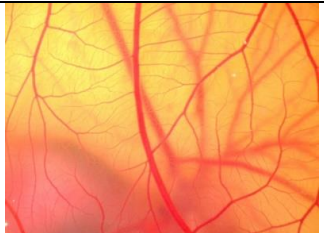
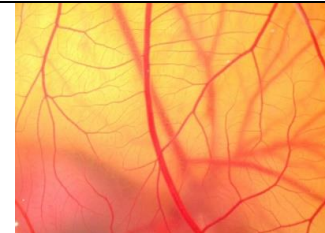
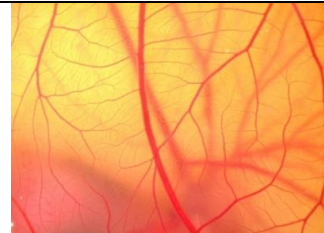
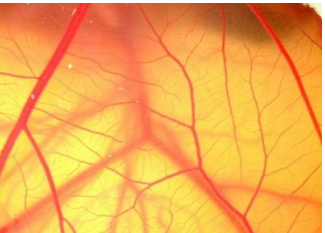
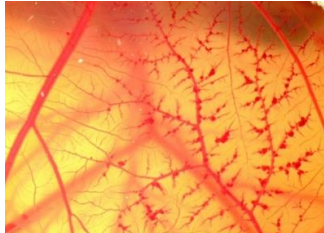

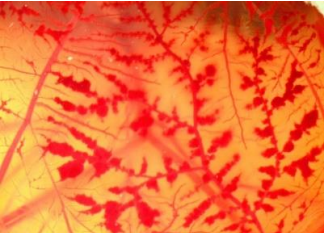
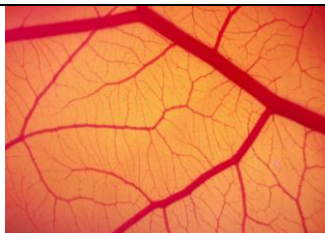

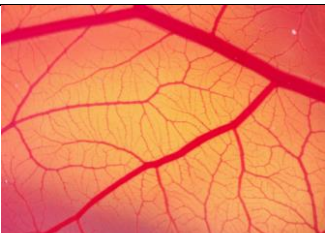

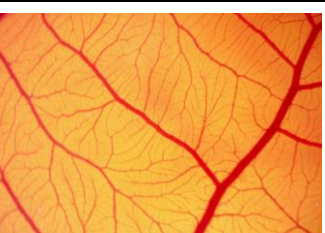
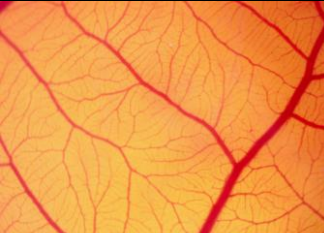


5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Avaliação da toxicidade pelo teste em membrana córion-alantoide de ovo embrionado (método *in vitro*)

O teste em membrana cório-alantoide de ovo embrionado foi o método alternativo, *in vitro*, utilizado para a realização do *screening*/triagem inicial potencial de irritação ocular das formulações poliméricas nanoestruturadas contendo o fármaco tacrolimus (NTAC; NTAC-HA). O desenvolvimento das referidas formulações foi estrategicamente realizado considerando os conceitos do “*safe-by-design*” (ONUGWU *et al.*, 2023). Inicialmente, foi realizado o teste de HET-CAM de todos os componentes individualmente das formulações, incluindo a solução de 0,3% HA (dados não integralmente mostrados) e foi evidenciado que, o polissorbato 80 e o Triolato de sorbitano (Span[®] 85) foram classificados com irritação forte (IS = $17,09 \pm 1,28$) e fraca (IS = $1,05 \pm 2,11$) respectivamente. Entretanto, como a quantidade utilizada desses componentes é muito baixa e, além disso, o teste de HET-CAM é realizado com amostras não diluídas, as referidas substâncias não foram excluídas das formulações. O restante dos componentes foram classificados como não irritantes. De maneira complementar e também nessa referida classificação, se encontram a NTAC e da NTAC-HA vazias (sem o fármaco) IS = $0,85 \pm 1,88$ e $0,84 \pm 1,88$ respectivamente.

No teste, foi verificada a conformidade dos resultados do controle positivo (NaOH 0,1 mol/L), com a classificação de irritação forte (índice de severidade igual a $18,97 \pm 0,0$) e do controle negativo (PBS 1X) (índice de severidade igual a $0 \pm 0,0$) com a classificação de não irritante. Os índices de severidade da formulação polimérica de tacrolimus (NTAC) e da formulação polimérica de tacrolimus revestida com ácido hialurônico (NTAC-HA) foram similares e apresentaram o valor de $0,70 \pm 1,72$. Não houve em nenhum desses dois grupos, o surgimento de hemorragia, e coagulação durante o período de realização do teste de HET-CAM (300 segundos). Foi verificado apenas reduzidas manchas de lise em alguns dos ovos nos vasos de pequeno calibre após a aplicação das referidas nanoformulações. Assim, as formulações poliméricas nanoestruturadas desenvolvidas foram classificadas como não irritantes. Os resultados do teste podem ser verificados na Tabela 9. O índice de severidade foi expresso como a média \pm desvio padrão.

Tabela 9 - Resultados do teste em membrana córion-alantoide de ovo embrionado (HET-CAM) das formulações poliméricas nanoestruturadas de tacrolimus (NTAC e NTAC-HA).

Item	Tempo 0	Tempo 30 s	Tempo 2 min	Tempo 5 min	IS	Categoria
Controle negativo - PBS 1X					$0 \pm 0,0$	Não irritante
Controle positivo - NaOH 0,1 mol/L					$18,97 \pm 0,0$	Irritação forte ou severa
NTAC-Eudragit® RL100					$0,70 \pm 1,72$	Não irritante
NTAC- HA					$0,70 \pm 1,72$	Não irritante

5.2.2 Avaliação da toxicidade pelo teste ocular de Draize (método *in vivo*)

A avaliação *in vivo* do potencial de irritação ocular das formulações poliméricas nanoestruturadas contendo o fármaco tacrolimus (NTAC) e (NTAC-HA), foi realizada para complementar/confirmar os resultados obtidos pelo teste *in vitro*. O teste de Draize possui reconhecido valor técnico-científico-regulatório e é considerado o método padrão-ouro para verificar a toxicidade aguda das substâncias (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944; WILHELMUS, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2018).

Todos os parâmetros do teste foram realizados de acordo com as melhores práticas recomendadas (WILHELMUS, 2001). O coelho foi o modelo animal utilizado pela possibilidade de maior acessibilidade aos tecidos da superfície ocular comparado aos demais modelos tradicionais de estudo. Além disso, é um modelo que possui sistema ocular com fisiologia e anatomia bem descrita (TEIXEIRA *et al.*, 2018).

Os olhos dos animais (n=16) foram clinicamente avaliados antes do início do teste e foi detectado no olho direito de um dos animais a presença prévia de catarata incipiente e uveíte (Figura 31). Então, para esse animal, a formulação foi administrada no olho esquerdo.

Após a instilação em dose única das formulações poliméricas de tacrolimus, foi realizada novamente após 1, 24, 48 e 72 horas a avaliação clínica nos olhos dos animais. No grupo 1, em que houve a instilação da NTAC não foram verificadas alterações nos parâmetros da córnea, da íris e da conjuntiva em três (3) animais. Em um (1) animal foi verificado após 1 hora da aplicação, leve congestão (leve vermelhidão) dos vasos da íris, entretanto, esse sinal não foi observado nos outros tempos de avaliação, o que o classifica como um caso isolado. Nos olhos tratados com a formulação polimérica de tacrolimus revestida com ácido hialurônico (NTAC-HA) não foram observados nenhum sinal clínico de irritação ocular.

A pontuação média máxima (*Maximum Average Score - MAS*) dos olhos tratados com a formulação polimérica de tacrolimus - NTAC foi 0,25 e a dos olhos tratados com a formulação polimérica de tacrolimus revestida com ácido hialurônico foi zero (0). Assim, as duas formulações foram classificadas como não irritantes, o que corrobora com os resultados encontrados no teste HET- CAM.

Figura 31 - Catarata incipiente e uveíte detectada na avaliação clínica realizada antes do início do teste de Draize no olho direito de um dos animais do estudo. Para esse animal, a formulação nanoestruturada foi administrada no olho esquerdo.



Fonte: próprio autor

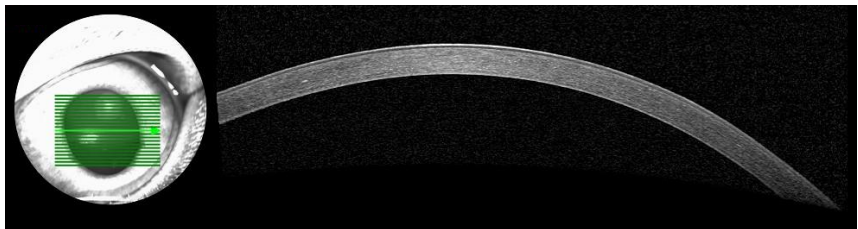
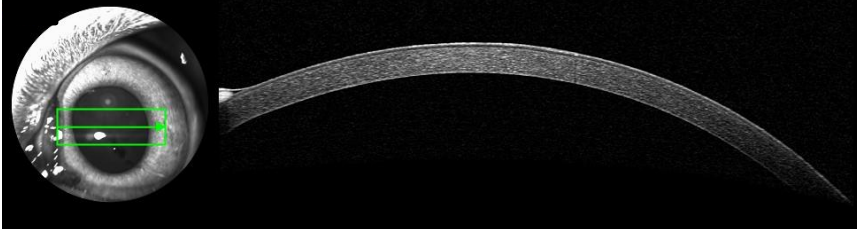
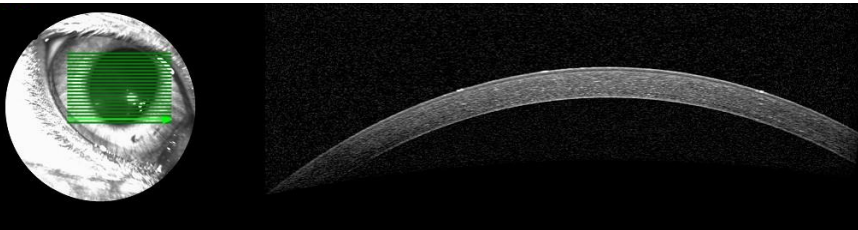
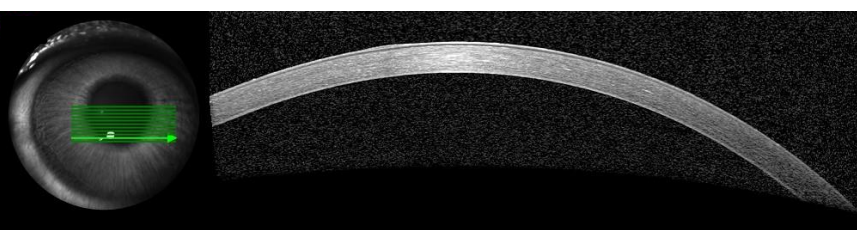
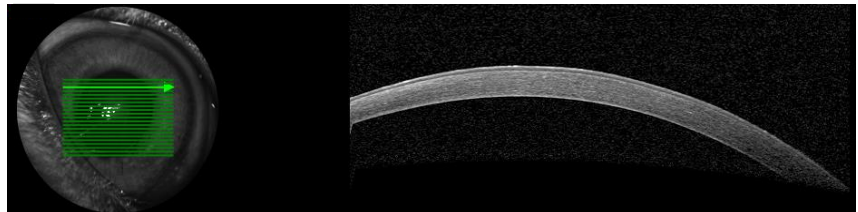
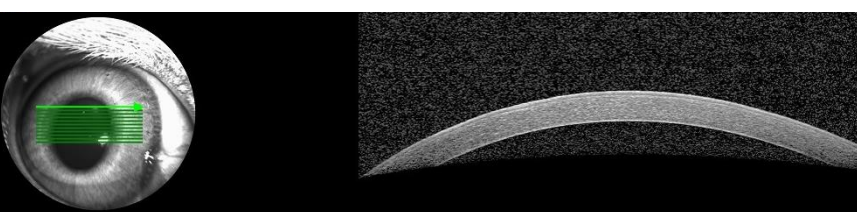
5.2.3 Testes complementares para verificação de alterações na estrutura da córnea

5.2.3.1 Técnica de Tomografia de Coerência Óptica (OCT)

A Tomografia de Coerência óptica é uma técnica de aquisição de sinais de alta resolução, não invasiva, que faz o mapeamento de imagens baseada reflectometria de um feixe luminoso de baixa coerência, na região do infravermelho, ao atravessar as diferentes estruturas do globo ocular. O sistema do OCT realiza múltiplas varreduras longitudinais e uma ferramenta valiosa para avaliar a morfologia do segmento anterior e posterior do olho e para o diagnóstico e tratamento de diversas condições clínicas oculares (SRIDHAR; MARTIN, 2018; VENKATESWARAN *et al.*, 2018; FUGIMOTO *et al.*, 2020).

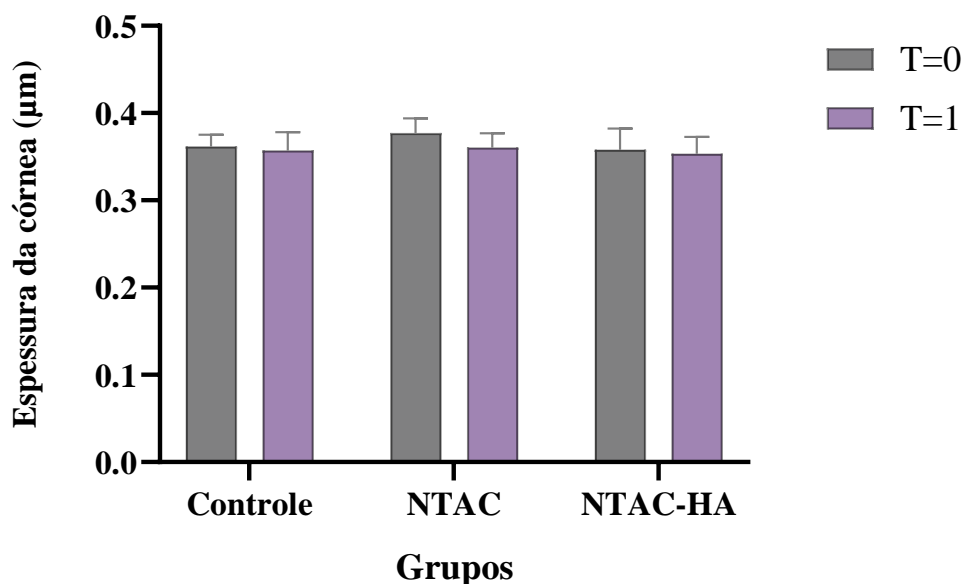
A partir das imagens obtidas por OCT não foi verificada, em todos olhos, alteração na estrutura das córneas. Foi possível verificar a integridade das camadas da córnea, incluindo o estroma, o endotélio e o epitélio, dos olhos utilizados como controle e dos olhos em que houve a administração em dose única das formulações poliméricas nanoestruturadas desenvolvidas - NTAC e NTAC-HA (Figura 32).

Figura 32 - Imagens obtidas por Tomografia de Coerência Óptica (OCT) antes e após 72 horas da instilação das formulações poliméricas de tacrolimus. Grupo Controle – sem administração das formulações poliméricas; Grupo NTAC – instilação de dose única (0,1 mL) da formulação polimérica nanoestruturada NTAC; Grupo NTAC-HA – instilação de dose única (0,1 mL) da formulação polimérica nanoestruturada revestida NTAC-HA.

Grupos	Tempo 0 - antes do início do teste	Tempo 1 – após 72 horas de teste
Controle		
NTAC		
NTAC-HA		

A média da medida da espessura da córnea para o grupo controle, antes do início do teste foi $0,362 \mu\text{m} \pm 0,01$ e após 72 horas do teste, foi $0,357 \mu\text{m} \pm 0,02$. Para o grupo NTAC, os resultados foram $0,377 \mu\text{m} \pm 0,01$ e $0,361 \mu\text{m} \pm 0,01$, respectivamente. Os resultados do grupo que recebeu a instilação da formulação nanoestruturada revestida - NTAC-HA, foram de $0,358 \mu\text{m} \pm 0,02$ e $0,354 \mu\text{m} \pm 0,02$, respectivamente. Os resultados demonstram que não houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre as medidas de espessura da córnea antes e após a aplicação das formulações poliméricas de tacrolimus - NTAC e NTAC-HA (Figura 33).

Figura 33 - Resultados das medidas da espessura total da córnea antes (T=0) e após 72 horas da instilação das formulações poliméricas nanoestruturadas de tacrolimus (T=2). Grupo Controle – sem administração das formulações poliméricas; Grupo NTAC – instilação de dose única (0,1 mL) da formulação polimérica nanoestruturada NTAC; Grupo NTAC-HA – instilação de dose única (0,1 mL) da formulação polimérica nanoestruturada revestida NTAC-HA.



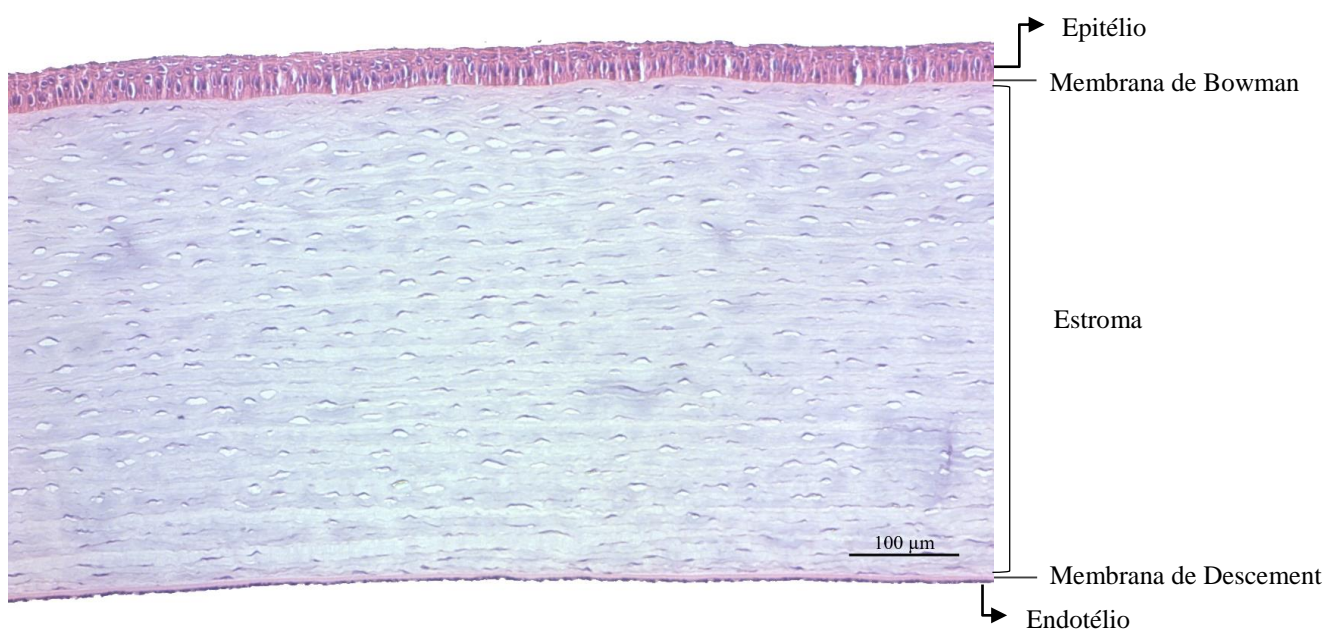
5.2.3.2 Histologia

Na avaliação histológica, também não foi observado, no olho controle e nos olhos que receberam a instalação em dose única das formulações poliméricas nanoestruturadas (NTAC; NTAC-HA, nenhuma alteração na morfologia do epitélio, endotélio e nas células estromais das córneas. Foi verificada a manutenção da histoarquitetura das córneas, composta por uma camada epitelial estratificada, escamosa/pavimentosa e não queratinizada; a membrana de Bowman, localizada abaixo do epitélio e acima do estroma, constituída por fibrilas colágenas dispostas ao acaso; a camada estromal com organização regular do colágeno, membrana basal de Descemet, que reveste a porção posterior do estroma e o separa do endotélio, e a

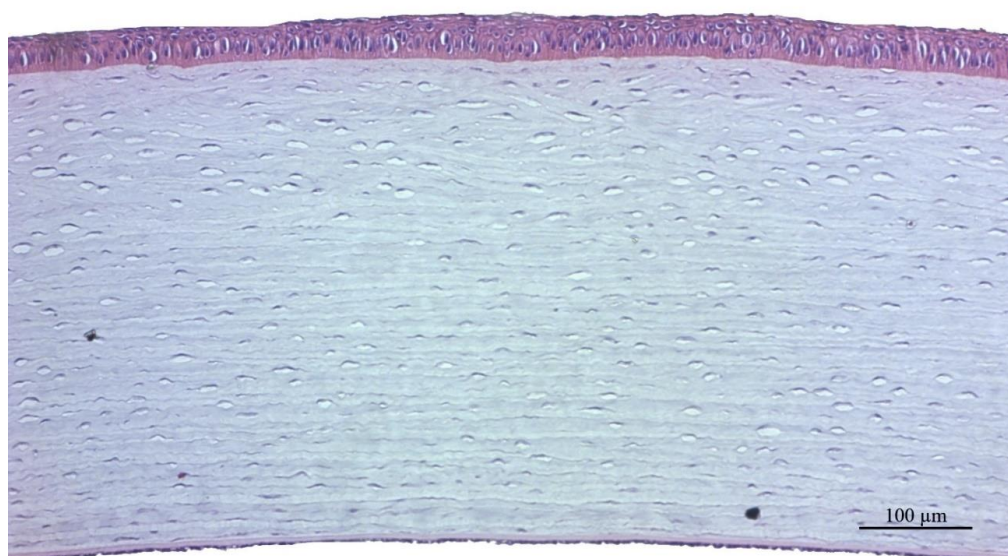
monocamada de células endoteliais. Não foi verificada nenhuma infiltração inflamatória, hemorragia e necrose. Os cortes histológicos podem ser verificados na Figura 34.

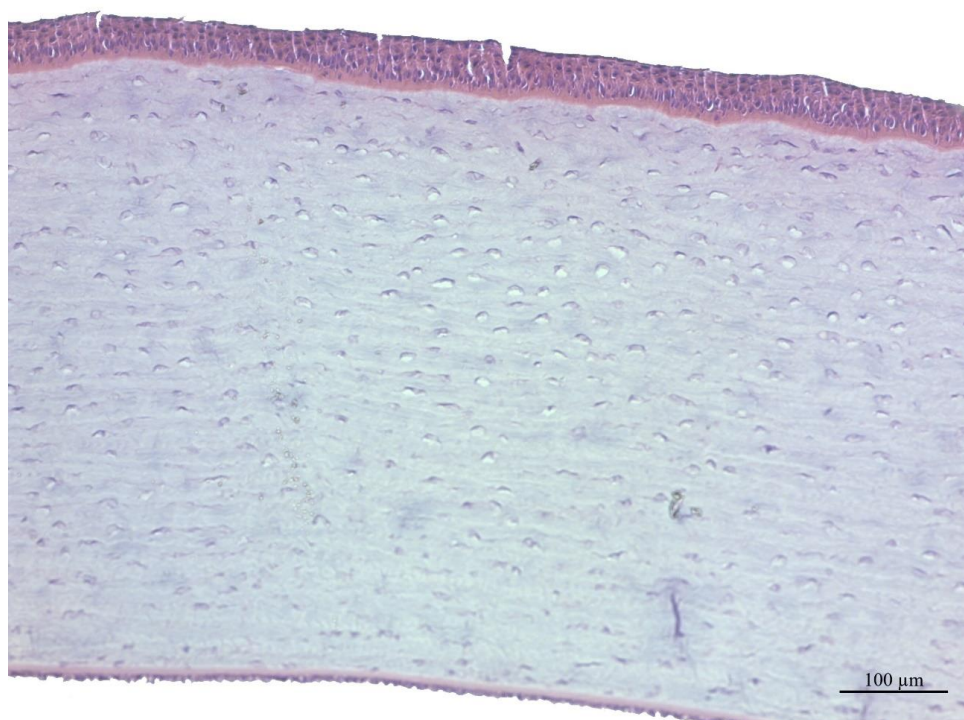
Figura 34 - Cortes histológicos das córneas extraídas após 72 horas do início do teste. (A) Grupo Controle – sem administração das formulações poliméricas; (B) Grupo NTAC – instilação de dose única (0,1 mL) da formulação polimérica nanoestruturada NTAC; (C) Grupo NTAC-HA – instilação de dose única (0,1 mL) da formulação polimérica nanoestruturada revestida NTAC-HA.

A) Grupo controle – sem instilação das formulações nanoestruturadas



B) Grupo NTAC



C) Grupo NTAC – HA

Assim, os resultados obtidos dos testes realizados para avaliação do perfil de irritação, indicam a biocompatibilidade das duas formulações poliméricas de tacrolimus desenvolvidas e a segurança para o uso ocular tópico.

5.3 CONCLUSÕES

A triagem inicial do potencial de irritação ocular foi realizada para verificar os requisitos mínimos do *safe-by-design* relacionados à segurança dos sistemas poliméricos nanoestruturados desenvolvidos para a entrega do fármaco tacrolimus (NTAC ; NTAC-HA). De maneira geral, as duas formulações, por meio do ensaio *in vitro* (HET-CAM) e pelo método de avaliação *in vivo* (teste de Draize), foram classificadas como não irritantes e a formulação revestida com ácido hialurônico, NTAC-HA, apresentou resultados melhores (não significativo) que a NTAC, no estudo *in vivo*, evidenciado pelo menor valor da Pontuação Média Máxima (MAS). Os resultados obtidos pelo teste de Tomografia de Coerência Óptica e pela avaliação dos cortes histológicos corroboraram para os resultados encontrados, indicando que não foi verificada para nenhuma das formulações avaliadas a ocorrência de alterações na estrutura celular das córneas dos animais que receberam as instilações.

Assim, os resultados obtidos dos testes realizados para avaliação do perfil de irritação, indicam que, tanto a NTAC quanto a NTAC-HA, são seguras e adequadas para uso ocular tópico. Portanto, justifica-se a realização de estudos adicionais para avaliar a eficácia do tacrolimus veiculado nas duas referidas formulações em modelo experimental de indução da doença do olho seco.

**6 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS SISTEMAS
NANOESTRUTURADOS CONTENDO TACROLIMUS
(NTAC; NTAC-HA) EM MODELO EXPERIMENTAL
ANIMAL DE INDUÇÃO DA DOENÇA DO OLHO SECO**

6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.1 Materiais

Solução de Davidson; cloridrato de cetamina (Ketalex, Venco, Brasil); cloridrato de xilazina (Xilazin®, Syntec Brasil); tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália, Brasil); formulações poliméricas nanoestruturadas de tacrolimus previamente fabricadas ((NTAC e NTAC-HA); Sulfato de atropina 1% (Allergan, Brasil) ; Fluoresceína Sódica 1% (Ophtalmos, Brasil); Teste de Schirmer (Madhu Instruments, Índia).

6.1.2 Equipamentos

Sistema de purificação de água (Millipore, EUA); Balança analítica (Shimadzu , Alemanha); Pipetas Gilson, volume ajustável de 100 µL; Spectralis HRA+OCT (Heidleberg Engineering, Alemanha); Microscópio óptico - Modelo Axio Imager M2 (Zeiss®, Alemanha), Lâmpada de fenda (Aymed Equipamentos Oftalmológicos, Brasil).

6.1.3 Animais

Para avaliação da eficácia dos sistemas nanoestruturados desenvolvidos em modelo experimental da doença do olho seco, foram utilizados dezesseis (16) coelhos, fêmeas da raça Nova Zelândia, pesando entre 1,8 – 2,0 Kg. Os animais foram mantidos em gaiolas, em sala de manutenção de coelhos de responsabilidade no Biotério de Experimentação da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), a qual é climatizada (16 a 22°C), com trocas completas de ar sem filtração absoluta, com fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro. Ração e água foram fornecidos sem restrição e com monitoramento diário. O experimento foi iniciado após o período de 2 semanas de adaptação e de análise clínico-veterinária. Ao final do experimento, foi realizada em cada um dos animais, medicação pré-anestésica utilizando 3mg/kg de xilazina com 40mg/kg de cetamina, por via intramuscular. Em seguida, por via intravenosa, foi administrada, na veia marginal da orelha dos animais, uma sobredose letal de anestésico geral (Tiopental, 90 mg/kg).

Todo os procedimentos foram realizados de acordo com as políticas institucionais de experimentação em animal e o estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Fundação Ezequiel Dias, protocolo n° 023/2022 (Anexo II).

6.1.4 Métodos

6.1.4.1 Avaliação da eficácia do tacrolimus nos sistemas poliméricos nanoestruturados

Para a avaliação da eficácia do fármaco tacrolimus nas formulações desenvolvidas (NTAC; NTAC-HA) foi estabelecido um modelo de indução da doença do olho seco e realizadas as avaliações aplicáveis após o período de tratamento.

6.1.4.1.1 Desenvolvimento experimental do modelo da doença do olho seco em coelhos

Foi realizada a instilação de 50 µL de sulfato de atropina 1% no saco conjuntival dos olhos de doze animais (24 olhos), três vezes ao dia durante o período de quatorze (14) dias. No sétimo dia de indução, os animais, foram divididos em três grupos experimentais, composto por quatro animais e com o total de oito olhos em cada grupo (n=8). No grupo 1, controle positivo, foi realizada apenas a instilação de sulfato de atropina (modelo da doença sem tratamento) durante todo o período de experimentação. Nos grupos 2 e 3 foi realizada a administração, uma vez por dia, meia hora depois da última instilação de sulfato de atropina 1%, de 0,1 mL (100 µL) das formulações poliméricas desenvolvidas, NTAC e NTAC-HA, respectivamente, durante sete dias. Ressalta-se que controle negativo (n = 8) foi composto por animais não induzidos com a doença do olho seco e não tratados.

6.1.4.1.2 Confirmação do diagnóstico do modelo induzido da doença do olho seco em coelhos e avaliação da eficácia do tacrolimus nos sistemas nanoestruturados

A confirmação da indução experimental da doença do olho seco nos coelhos foi realizada pela análise da medida da produção de lágrimas (teste de Schirmer I) e pela verificação da estabilidade do filme lacrimal com o uso do teste de ruptura lacrimal (*break-up time - TBUT*), Além disso, foi realizada a avaliação de alterações na estrutura da córnea e na integridade dos tecidos oculares utilizando a técnica de tomografia de coerência óptica e por meio de análises histológicas em todos os grupos de experimentação. Os mesmos testes foram utilizados para verificação da eficácia do tratamento com o uso dos sistemas nanoestruturados desenvolvidos. Os testes foram realizados no início do experimento (T0), no sétimo dia de indução (T7) e no tempo final do experimento (14 dias).

6.1.4.1.2.1 Avaliação/medida da produção de lágrimas (Teste de Schirmer)

A avaliação da quantidade de lágrima produzida pelos olhos dos animais foi realizada pelo teste de Schirmer nos dias 0, 7 e 14, pelo uso de tiras estéreis de papel de filtro Whatman nº41 cortadas em tiras de 5 mm x 60 mm (Ophtalmos). O teste de Schirmer foi realizado sem o uso de colírio anestésico (Schirmer I). A fita de Schirmer foi introduzida no fórnix conjuntival inferior por um período de 5 minutos, a qual, posteriormente, foi retirada e em seguida realizada a leitura do comprimento da área úmida da tira de papel (mm). Os valores obtidos foram expressos como média \pm desvio.

6.1.4.1.2.2 Teste de ruptura lacrimal (break-up time)

O teste de ruptura lacrimal, do inglês “*break-up time*” (TBUT) é também considerado um “quantitativo” para medir a estabilidade do filme lacrimal na superfície do olho. Foi realizada nos dias 0, 7 e 14, a instilação de uma gota de fluoresceína 1% em ambos os olhos. Os olhos dos animais foram piscados manualmente para que o corante fosse distribuído uniformemente sobre a superfície ocular. Em seguida, foi observado, através de uma lâmpada de fenda com filtro azul cobalto (Aymed Equipamentos Oftalmológicos), o tempo para o primeiro rompimento do filme lacrimal (aparecimento de manchas/falhas). Os valores obtidos foram expressos como média \pm desvio.

6.1.4.1.3 Testes complementares para avaliação de danos à superfície ocular e da eficácia do tacrolimus nos sistemas nanoestruturados

6.1.4.1.3.1 Técnica de Tomografia de Coerência Óptica (OCT)

Antes da indução da doença do olho seco (tempo inicial), no sétimo dia de indução (T7) e no tempo final do experimento (14 dias), um animal de cada grupo (n=2) foi anestesiado (3 mg/kg de xilazina com 40 mg/kg de cetamina por via intramuscular) e foram obtidas imagens topográficas transversais das córneas, em alta resolução, pela técnica de Tomografia de Coerência Óptica (OCT) utilizando o equipamento Spectralis HRA+OCT. Nessa técnica foi realizada a análise visual da integridade da estrutura das córneas.

6.1.4.1.3.2 Histologia

Após 14 dias de experimento, os animais foram eutanasiados, com sobredose de anestésico (Tiopental (90 mg/Kg) e foi realizada a remoção do bulbo ocular. Os olhos enucleados foram inseridos em um frasco de 50 mL contendo solução de Davidson (Tabela 8 – item 5.1.4.1.3.2) e foram fixados por 24 horas. Após esse período, os olhos foram mantidos em álcool etílico 70%, realizada a clivagem/corte do material de forma sagital e o acondicionamento em cassetes histológicos. Na etapa de processamento, foi realizada a desidratação do tecido com álcool etílico em diferentes graduações alcoólicas e a clarificação/diafanização, para aumento da afinidade com a parafina, com xilol. Após a infiltração da parafina líquida no material biológico (impregnação), foram realizados cortes finos no tecido (4 µm) e a coloração com hematoxilina/eosina. A análise das lâminas preparadas foi realizada em microscópio óptico (Microscópio óptico - Modelo Axio Imager M2, Zeiss®, Alemanha).

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 Desenvolvimento experimental do modelo da doença do olho seco em coelhos

O modelo experimental da doença de olho seco foi realizado *in vivo*, em coelhos, empregando o método de indução química de acordo com protocolos previamente relatados na literatura científica (RAHMAN *et al.*, 2021; SINGH; SHARMA; BASU, 2021).

O sulfato de atropina, fármaco utilizado para indução da DED, é um antagonista dos receptores muscarínicos (ATRI; CHANG; STRICHARTZ, 2014). Na clínica oftalmológica, pelo bloqueio das respostas do músculo esfíncter da pupila e do músculo ciliar do cristalino ao estímulo colinérgico, a atropina é indicada para obtenção de midríase (dilatação da pupila) e cicloplegia (paralisação da acomodação), para a realização dos exames de fundo de olho e exames de refração (ATRI; CHANG; STRICHARTZ, 2014). Na pesquisa, diversos estudos tem demonstrado resultados satisfatórios de indução do modelo da doença do olho seco em coelhos da raça Nova Zelândia com a utilização da atropina (KARN *et al.*, 2014; RAHMAN *et al.*, 2021; SINGH; SHARMA, BASU, 2021; MODI *et al.*, 2022; SÁNCHEZ-RÍOS *et al.*, 2022; MOHAMMAD *et al.*, 2022). A produção de lágrimas é controlada pela estimulação simpática e parassimpática das glândulas lacrimais, que por sua vez é controlada por um arco reflexo neural originado na superfície ocular (DARTT 2009; MASLI; DARTT, 2020). A atropina

provoca o bloqueio da inervação simpática da glândula lacrimal o que provoca a diminuição da produção de lágrimas e alteração da funcionalidade da lágrima (CRANDALL; LEOPOLD, 1979; BURGALASSI *et al.*, 1999; RAHMAN *et al.*, 2021; MOHAMMAD *et al.*, 2022). Essa condição, gera um *stress* que aciona o sistema imune a produzir mediadores inflamatórios que provocam inflamação e danos à superfície ocular (MOHAMMAD *et al.*, 2022). Nesse sentido, os sinais e sintomas característicos da doença do olho seco são satisfatoriamente obtidos (CRAIG *et al.*, 2017; SINGH; SHARMA, BASU, 2021).

Nas seções a seguir, são apresentados os resultados dos testes utilizados para a confirmação do modelo experimental da doença.

6.2.2 Confirmação do diagnóstico do modelo de indução da doença do olho seco em coelhos e avaliação da eficácia do tacrolimus nos sistemas nanoestruturados

6.2.2.1 Avaliação/medida da produção de lágrimas (Teste de Schirmer)

O valor médio encontrado do teste de Schirmer para o grupo controle foi de $17,38 \pm 2,50$, similar ao encontrado no tempo inicial dos outros grupos de experimentação e dos valores encontrados na literatura para olhos saudáveis de coelhos (KARN *et al.*, 2014; SINGH; SHARMA, BASU, 2021; MOHAMMAD *et al.*, 2022; SÁNCHEZ-RÍOS *et al.*, 2022). Os resultados dos outros tempos podem ser visualizados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados do teste de Schirmer (I) em milímetros (mm) para o grupo modelo de olho seco não tratado e para os grupos tratados com a formulação NTAC e NTAC-HA nos tempos T0 (início do experimento), T7 (sétimo dia de indução) e T14 (tempo final do experimento). Dados representam a média±desvio de quatro coelhos com o total de oito olhos.


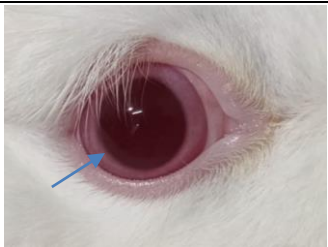
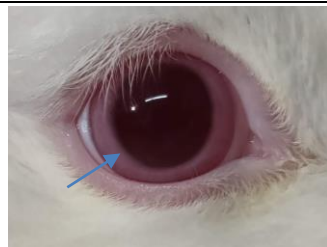

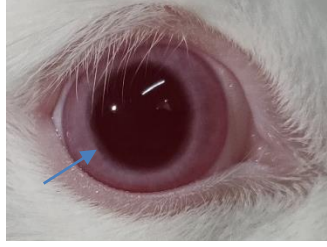


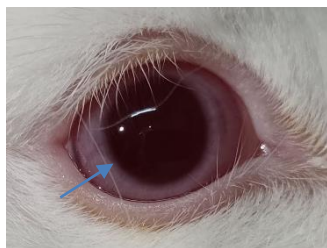

Grupos	Teste de Schirmer (mm) (média ± DP)		
	Tempo 0	Tempo 7	Tempo 14
Modelo olho seco não tratado	$19,25 \pm 2,81$	$15,25 \pm 5,77$	$15,38 \pm 5,99$
NTAC	$16,00 \pm 2,67$	$12,88 \pm 5,57$	$19,63 \pm 3,70$
NTAC-HA	$16,13 \pm 4,22$	$13,00 \pm 4,86$	$16,88 \pm 2,58$

De acordo com os resultados encontrados, foi observado em todos os grupos, um decréscimo, nos valores do teste, após sete dias de aplicação de sulfato de atropina (3 vezes ao dia) comparado com o tempo inicial (T=0). Apesar de não sido estatisticamente significativo, o decréscimo pode indicar a ação do fármaco no processo de indução e, além disso, esses

resultados estão de acordo com os encontrados em outros trabalhos que utilizaram a atropina para o estabelecimento do modelo da doença (BURGALASSI *et al.*, 1999; KARN *et al.*, 2014; SÁNCHEZ-RÍOS *et al.*, 2022).

Na comparação do tempo intermediário (T=7) com o tempo final (T=14), no grupo experimental do modelo de olho seco não tratado, não houve alteração substancial do valor médio do comprimento da área úmida da fita de Schirmer, o que pode estar relacionado a uma resposta compensatória ao quadro de irritação/dano provocado pela atropina. Nos grupos NTAC e NTAC-HA houve um aumento nos valores médios do teste na comparação do valor do tempo intermediário (T=7) com o tempo pós tratamento (T=14). Paralelamente, a ação da atropina também foi notada pela dilatação nos olhos dos animais durante à sua administração. Esse processo foi mantido no grupo experimental da doença do olho seco e revertido nos grupos tratados com as formulações mesmo com a instilação contínua do fármaco (Tabela 11).

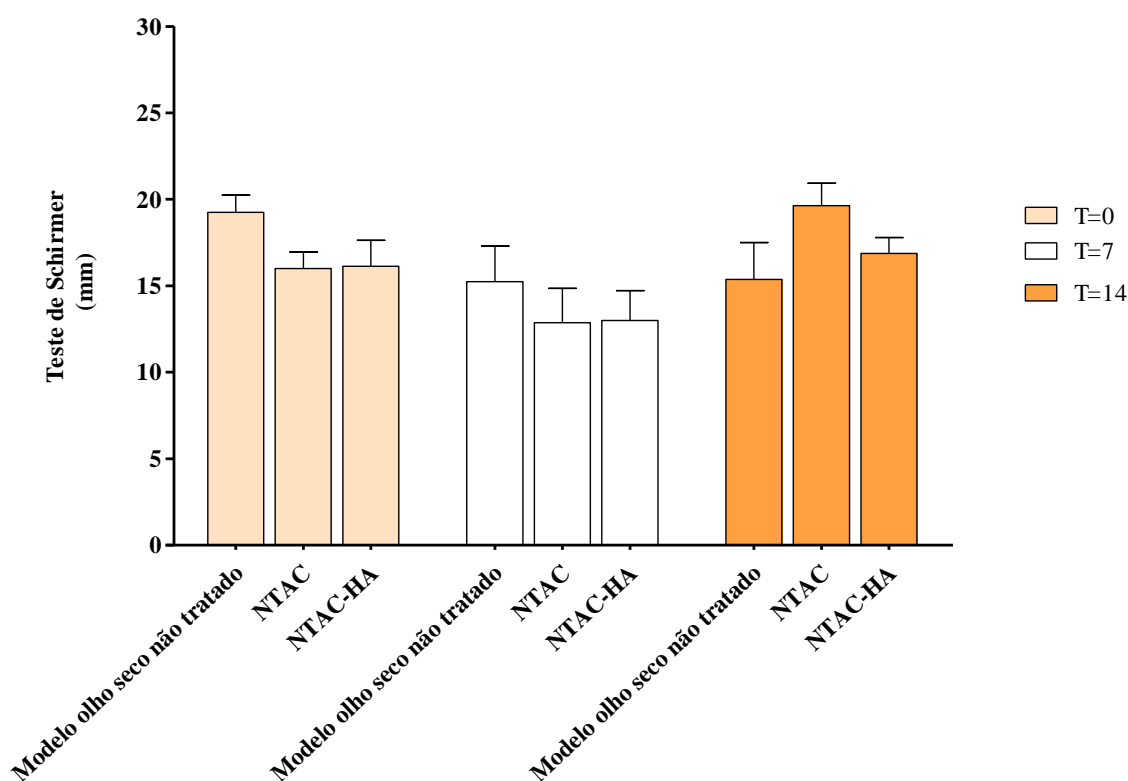
Tabela 11 - Análise visual das alterações oculares durante o período de experimentação.

Grupos	Tempo 0	Tempo 7	Tempo 14
Modelo olho seco não tratado			
NTAC			
NTAC-HA			

Adicionalmente, foi possível verificar que o processo de indução ocorreu de forma similar em todos os grupos de experimentação e que o grupo tratado com a formulação NTAC

obteve resultados ligeiramente melhores que o grupo tratado com a NTAC-HA no reestabelecimento da secreção lacrimal (Figura 35).

Figura 35 - Representação gráfica do teste de Schirmer (I) em milímetros (mm) para o grupo modelo de olho seco não tratado e para os grupos tratados com a formulação NTAC e NTAC-HA nos tempos T0 (início do experimento), T7 (sétimo dia de indução) e T14 (tempo final do experimento). Dados representam a média \pm desvio de quatro coelhos com o total de oito olhos. Houve redução dos valores após sete dias de indução com sulfato de atropina. O grupo tratado com a NTAC demonstrou resultados ligeiramente melhores que a NTAC-HA no aumento da secreção lacrimal.



O teste de Schirmer é um método tradicional de auxílio no diagnóstico da doença do olho seco para avaliação do volume da lágrima (WOLFFSOHN *et al.*, 2017). Dentre as vantagens de uso desse teste, destacam-se a facilidade de execução, baixo custo e não necessidade do uso de equipamentos. Porém, entre as desvantagens pode ser mencionado a baixa repetibilidade, baixa sensibilidade, especificidade, desconforto e a variabilidade dos resultados encontrados de acordo a metodologia utilizada para a realização do teste (SAVINI *et al.*, 2008; LI; DENG; HE 2012; WOLFFSOHN *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2022). Serruya e colaboradores (2009) identificaram que as medidas do teste de Schirmer com olhos fechados foram estatisticamente diferentes do realizado com olhos abertos e ressaltaram a possível

interferência de outros fatores como posicionamento da cabeça, posição da fita, condição da córnea e iluminação.

Diversos valores de confirmação de diagnóstico do teste de Schirmer tem sido propostos, dentre eles 5 mm/5 min e 10 mm/5 min (WOLFFSOHN *et al.*, 2017; SINGH; SHARMA, BASU, 2021). Entretanto, é importante ressaltar que os estados de olho seco muitas vezes geram hiper-secreção reflexa, o que pode mascarar o quadro da doença (PUTZ, 2001). Além disso, na literatura também é reportado situações de diagnóstico positivo para a doença do olho seco, mas com valores anormais no teste de Schirmer (UCHINO *et al.*, 2013).

Assim, mesmo com um resultado indicativo do processo de indução da doença do olho seco e da ação efetiva das formulações desenvolvidas no reestabelecimento da condição clínica saudável dos olhos dos animais, pelo aumento do volume lacrimal, é necessária a avaliação em conjunto com os resultados dos outros testes realizados para uma análise mais robusta da eficácia da NTAC e NTAC-HA.

6.2.2.2 Teste de ruptura lacrimal (break-up time)

O valor médio encontrado do teste de ruptura lacrimal para o grupo controle foi de $15,13 \pm 10,95$, também similar ao encontrado no tempo inicial dos grupos NTAC e NTAC-HA. O grupo utilizado como modelo de olho seco não tratado apresentou no tempo inicial, especificamente em um olho de um animal, um valor de TBUT mais alto que os demais representantes do grupo, o que proporcionou um desvio elevado. Entretanto, o resultado apesar de distante dos demais, não foi considerado um *outlier* e pode ser justificado pela variabilidade de comportamento e resposta experimental entre animais. Acrescenta-se que o valor médio de todos os grupos experimentais está de acordo com os valores encontrados na literatura para olhos saudáveis de coelhos (WEI *et al.*, 2013; MODI *et al.*, 2022; MOHAMMAD *et al.*, 2022). Os resultados dos outros tempos podem ser visualizados na Tabela 12.

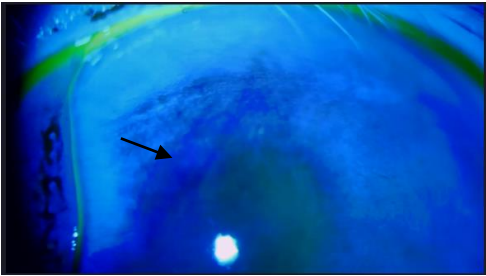
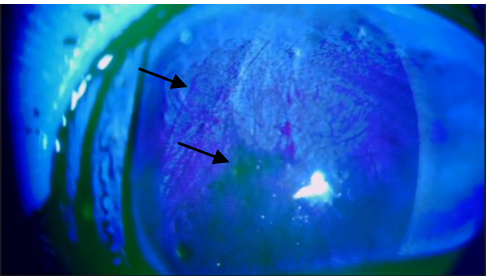
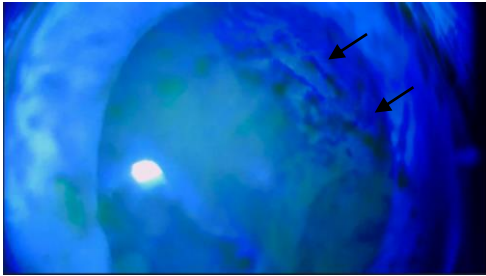
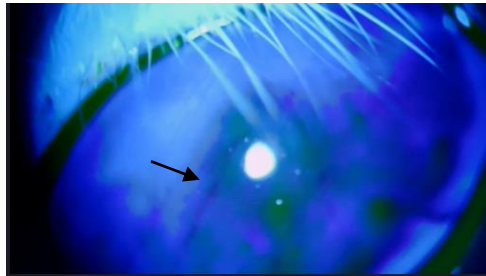
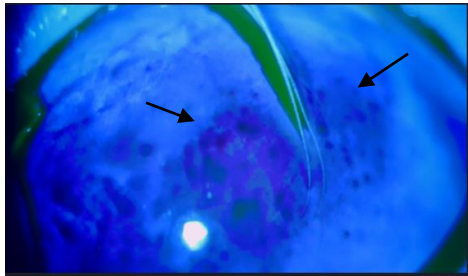
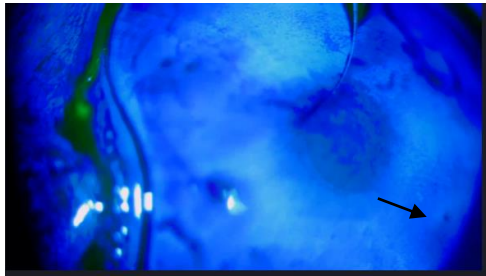
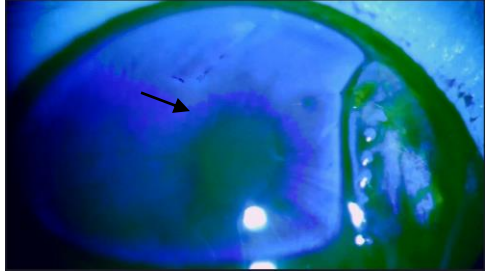
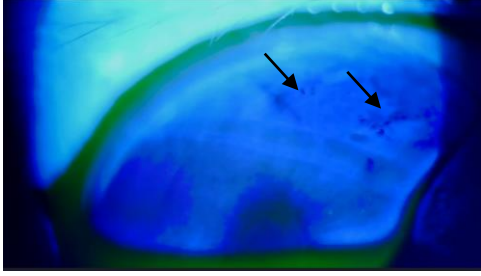
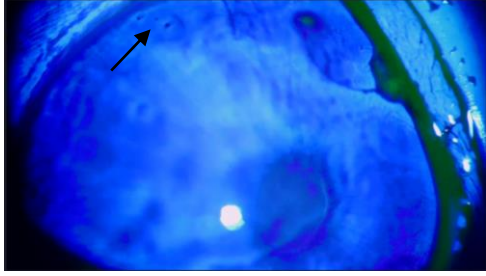
Tabela 12 - Resultados do teste de ruptura lacrimal em segundos (s) para o grupo modelo de olho seco não tratado e para os grupos tratados com a formulação NTAC e NTAC-HA nos tempos T0 (início do experimento), T7 (sétimo dia de indução) e T14 (tempo final do experimento). Dados representam a média \pm desvio de quatro coelhos com o total de oito olhos.

Grupos	Teste de Ruptura Lacrimal (segundos) (média \pm DP)		
	Tempo 0	Tempo 7	Tempo 14
Modelo olho seco não tratado	27,75 \pm 18,44	8,00 \pm 8,43	4,12 \pm 1,64
Grupo NTAC	14,25 \pm 5,47	7,50 \pm 4,37	14,88 \pm 6,89
Grupo NTAC-HA	14,63 \pm 4,98	5,50 \pm 4,44	22,25 \pm 9,88

Foi observado em todos os grupos experimentais, um decréscimo nos valores do teste após sete dias (T7) de aplicação de sulfato de atropina (3 vezes ao dia) comparado com os valores do tempo inicial (T0). Um TBUT menor do que 10 segundos é considerado anormal e indica a existência de instabilidade lacrimal (WOLFFSOHN *et al.*, 2017). Assim, é possível verificar que houve a perda da estabilidade do filme lacrimal e consequentemente a eficácia do processo de indução da doença do olho seco. Na comparação do tempo intermediário (T7) com o tempo final (T14), no grupo experimental do modelo de olho seco não tratado, houve decréscimo do tempo de ruptura lacrimal encontrado entre os referidos tempos, o que demonstra que a aplicação contínua do sulfato de atropina agravou o quadro de instabilidade lacrimal. A diferença entre os valores de T0 e o T14 no referido grupo foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Importante ressaltar que a diminuição do TBUT não interfere no volume da lágrima e, sim, na qualidade do filme lacrimal (PUTZ, 2001). Nos grupos experimentais tratados com as formulações NTAC e NTAC-HA houve um aumento significativo ($P < 0,05$) nos valores médios do teste, na comparação do (T7) com o (T14), o que corrobora para o uso promissor das formulações no tratamento da doença do olho seco. Também foi possível observar alterações do padrão do teste de ruptura lacrimal nos diversos tempos de experimentação. Em todos os grupos, com a indução da doença (T7), os pontos escuros foram mais proeminentes, indicando o ressecamento da superfície ocular e inclusive, foi verificado no (T14) do grupo experimental do modelo de olho seco não tratado, os padrões de quebra classificados como *line break* e/ou *area break* que estão relacionados aos casos moderados/graves da doença do olho seco (YOKOI *et al.*, 2017; YOKOI; GEORGIEV, 2018; YOKOI; GEORGIEV, 2019). Ao contrário dos grupos tratados com as nanoformulações, em que houve a reversão desse quadro, com o padrão

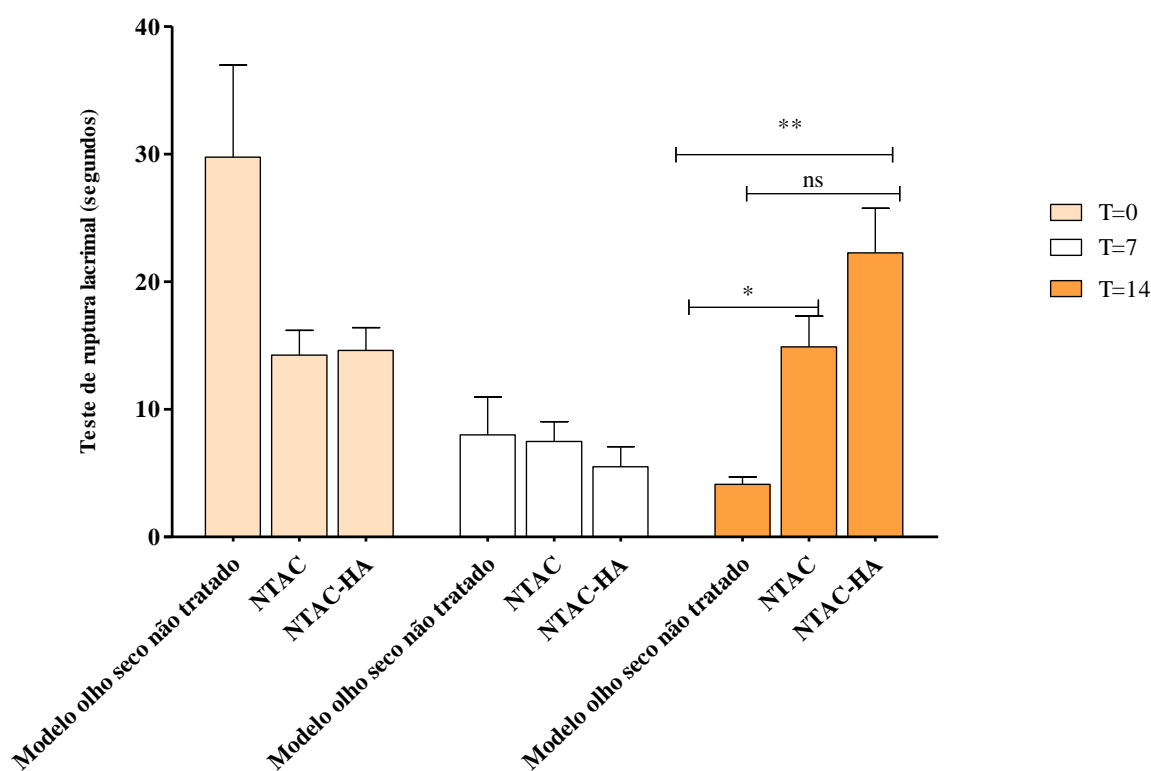
de TBUT similar e até mesmo mais suave/menos agressivo do que encontrado no tempo inicial (T0), mesmo com a instilação contínua da atropina (Tabela 13).

Tabela 13 - Padrões do TBUT/ aparência do filme lacrimal com o uso de lâmpada de fenda para o grupo modelo de olho seco não tratado e para os grupos tratados com a formulação NTAC e NTAC-HA nos tempos T0 (início do experimento), T7 (sétimo dia de indução) e T14 tempo final do experimento). Seta indica alguns pontos/área de quebra.

Grupos	Tempo 0	Tempo 7	Tempo 14
Modelo olho seco não tratado			
NTAC			
NTAC-HA			

Além disso, foi possível verificar com os resultados encontrados, que o processo de indução também ocorreu de forma similar e eficaz em todos os grupos de experimentação e que o grupo tratado com a formulação NTAC-HA obteve resultados ligeiramente melhores que o grupo tratado com a NTAC (Figura 36).

Figura 36 - Representação gráfica do teste de ruptura lacrimal em segundos para o grupo modelo de olho seco não tratado e para os grupos tratados com as formulações NTAC e NTAC - HA nos tempos T0 (início do experimento), T7 (sétimo dia de indução) e T14 (tempo final do experimento). Dados representam a média \pm desvio de quatro coelhos com o total de oito olhos. *Diferença estatística ($P < 0,05$) entre o TBUT do grupo não tratado e o tratado com a NTAC; **diferença estatística ($P < 0,05$) entre o TBUT do grupo não tratado e o tratado com a NTAC -HA; ns diferença não significativa.



O filme lacrimal contribui de maneira expressiva para a manutenção de uma superfície ocular adequada, incluindo a qualidade da visão e o processo de defesa ocular (ROLANDO; ZIERHUT, 2001; PFLUGFELDERA; STERNA, 2020). Alterações na estabilidade do filme lacrimal contribuem significativamente no ciclo vicioso inflamatório e consequentemente para os sinais e sintomas da doença do olho seco (ROLANDO; ZIERHUT, 2001; WEI *et al.*, 2013; NELSON *et al.*, 2017). Na prática clínica, o teste de ruptura lacrimal é um dos testes mais utilizados para a avaliação da estabilidade lacrimal que é mantida pela interação do filme

lacrimal com o epitélio da córnea e as pálpebras (NORN 1969; SWEENEY; MILLAR; RAJU 2013; WOLFFSOHN *et al.*, 2017; CRAIG; DOWNIE, 2019; WU *et al.*, 2022). O ato de piscar, provoca o espalhamento do filme lacrimal sobre a córnea e a conjuntiva. Além disso, nesse processo, as áreas secas são umedecidas. Na ausência do processo de piscar, há a ruptura do filme lacrimal que é identificada com a adição da fluoresceína e através da lâmpada de fenda com filtro azul cobalto como manchas pretas ou estrias na córnea (NORN, 1969; WOLFFSOHN *et al.*, 2017; CRAIG; DOWNIE, 2019; WU *et al.*, 2022). O filme lacrimal instável e irregular é rompido rapidamente sobre a superfície ocular irregular no olho seco e está associado à má qualidade de visão (SWEENEY; MILLAR; RAJU 2013; UCHINO; TSUBOTA, 2010).

A fluoresceína é um dos corantes de diagnóstico mais utilizados devido a facilidade de acesso, ausência de toxicidade epitelial intrínseca, rápida velocidade de difusão e duração curta do efeito (ICHIHASHI *et al.*, 2015). Dentre os fatores de interferência do teste podem ser mencionados, o volume e pH do corante utilizado, nível de iluminação da lâmpada de fenda e experiência clínica (SAVINI *et al.* 2008; SWEENEY; MILLAR; RAJU 2013; CRAIG; DOWNIE, 2019).

Apesar das limitações descritas anteriormente do teste, os dados obtidos nesse experimento, indicam que o modelo de indução utilizado foi capaz de alterar a estabilidade do filme lacrimal, um dos principais fatores no mecanismo fisiopatológico da doença e que formulações desenvolvidas atuaram no reestabelecimento da condição estável.

6.2.3 Testes complementares para avaliação de danos à superfície ocular e da eficácia do tacrolimus nos sistemas nanoestruturados

6.2.3.1 Técnica de Tomografia de Coerência Óptica (OCT)

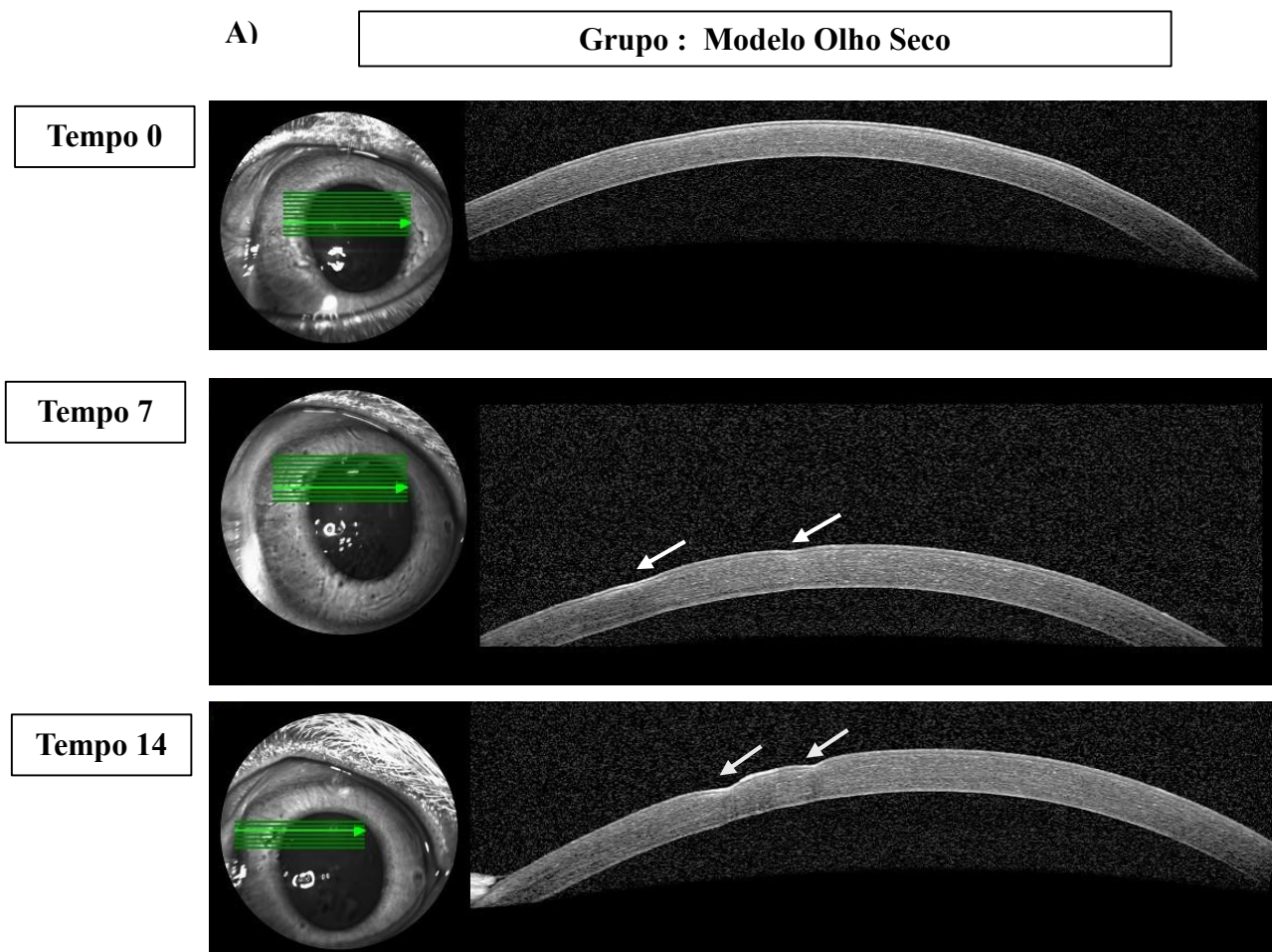
A Técnica de Tomografia de Coerência Óptica foi utilizada para a obtenção de imagens em diversas regiões dos olhos dos animais, da estrutura das córneas durante o período de experimentação. Diversos estudos tem demonstrado a aplicabilidade do OCT como técnica complementar para avaliação e gerenciamento de doenças do segmento anterior, dentre elas a doença do olho seco (VENKATESWARAN *et al.*, 2018).

De acordo com as imagens obtidas, em todos os grupos experimentais, no início do experimento (T0) foi possível verificar a integridade das camadas das córneas, incluindo o estroma, o endotélio e o epitélio. No entanto, alterações drásticas na estrutura das córneas foram

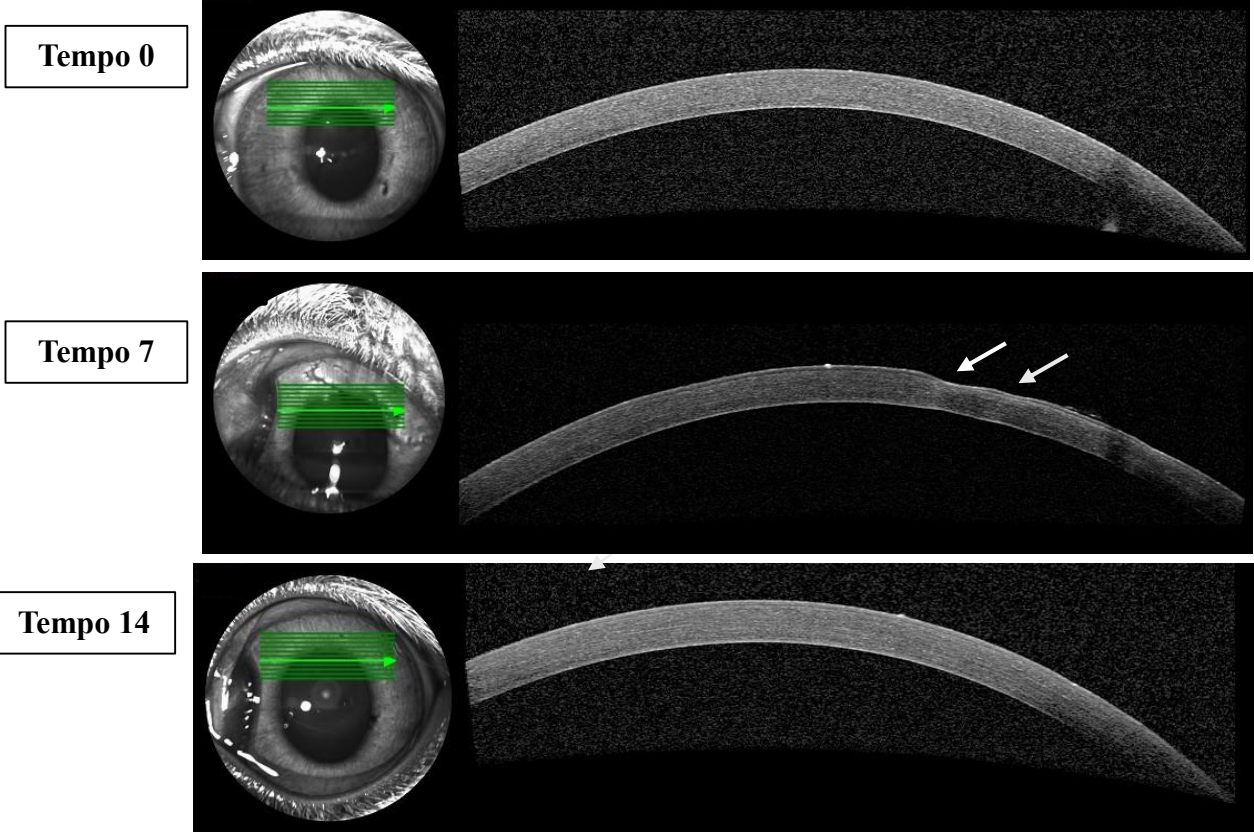
verificadas após sete dias (T7) de aplicação de sulfato de atropina, 3 vezes ao dia. Assim, foi observada a desestruturação da integridade da camada epitelial, com áreas frequentes de abrasões e defeitos que podem indicar a perda de células epiteliais. Do mesmo modo, houve a manutenção e até mesmo o agravamento das referidas irregularidades no grupo modelo de olho seco não tratado em T14. Destaca-se que na doença do olho seco, a instabilidade do filme lacrimal provoca danos ao epitélio corneano, o que corrobora com a conformidade dos resultados encontrados (BARANAUSKAS; GALGAUSKAS, 2023).

Nos grupos tratados NTAC e NTAC-HA, foi verificado, de maneira similar, o reestabelecimento da integridade da camada epitelial após sete dias de administração tópica, uma vez ao dia, o que indica a eficácia do tacrolimus nos sistemas nanoestruturados desenvolvidos no modelo experimental da doença. As imagens podem ser verificadas na Figura 37.

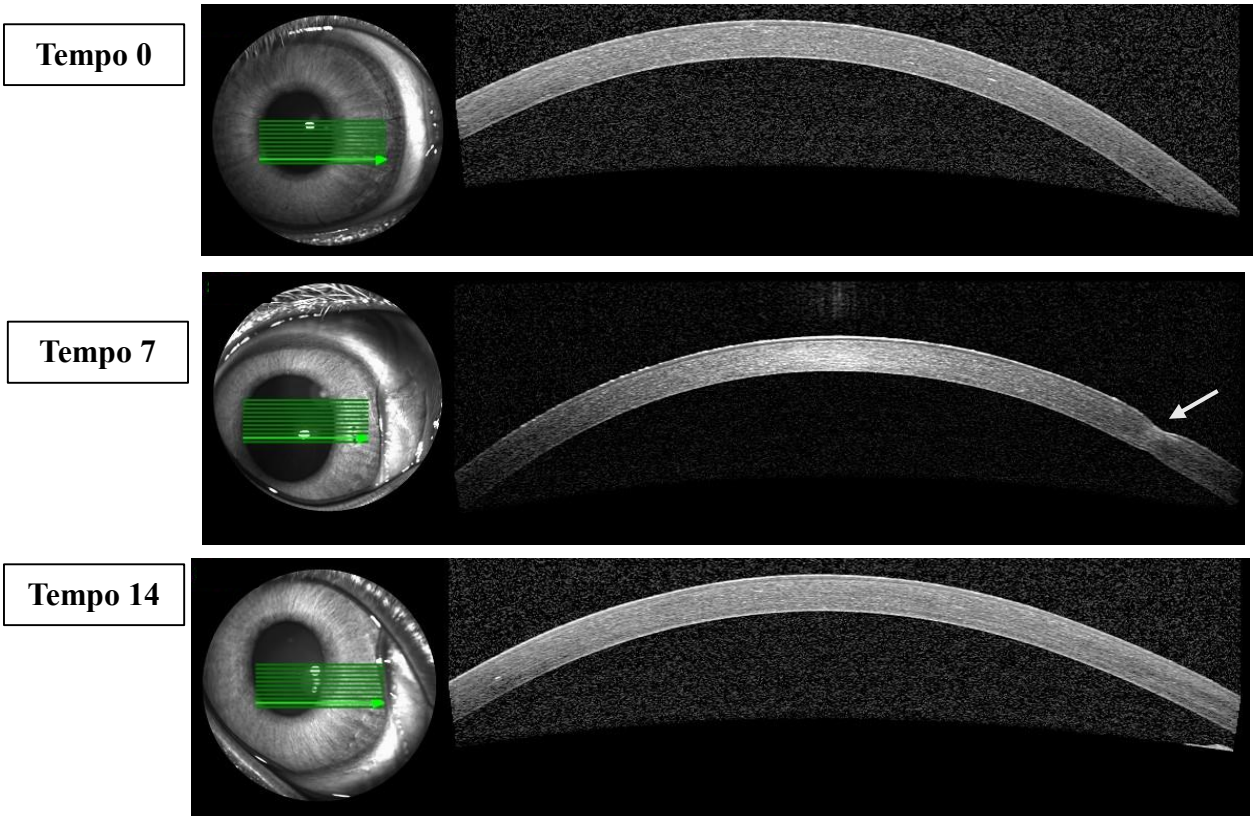
Figura 37 - Imagens obtidas por Tomografia de Coerência Óptica (OCT) o grupo modelo de olho seco não tratado (A) e para os grupos tratados com a formulação NTAC (B) e NTAC-HA (C) nos tempos T0 (início do experimento), T7 (sétimo dia de indução) e T14 (tempo final do experimento). Dados representam a média \pm desvio de quatro coelhos com o total de oito olhos. Setas indicam a ação do sulfato de atropina na desestruturação da integridade da camada epitelial.



B) Grupo : NTAC



C) Grupo : NTAC -HA



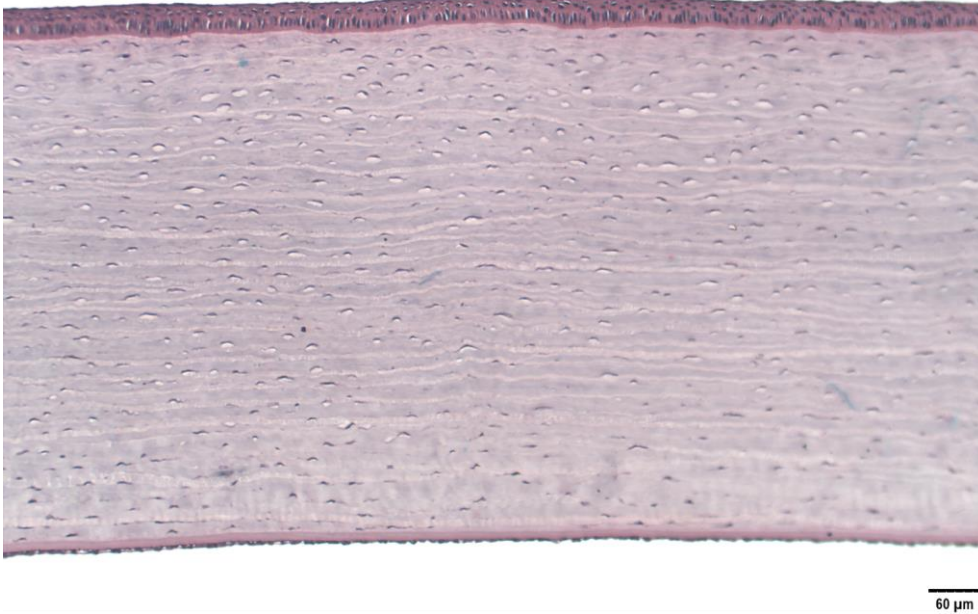
6.2.3.2 Histologia

Nos cortes histológicos realizados (Figura 38), foi observado no grupo experimental induzido com a doença do olho seco, a não manutenção da integridade da córnea, com alterações na camada epiteliais e com aparente perda celular, resultantes dos danos oculares provenientes da aplicação contínua do sulfato de atropina (1%). Entretanto, a histoarquitetura das córneas dos olhos tratados com as nanoformulações poliméricas nanoestruturadas (NTAC e NTAC-HA) foi semelhante à dos olhos do grupo controle. A marcante consistência estrutural do epitélio corneano ao longo da superfície ocular foi nitidamente observada nos grupos tratados. Esses resultados corroboram com os anteriormente apresentados nesse trabalho, também sugerindo a eficácia dos sistemas nanoestruturados para a entrega do fármaco tacrolimus no tratamento da doença do olho seco.

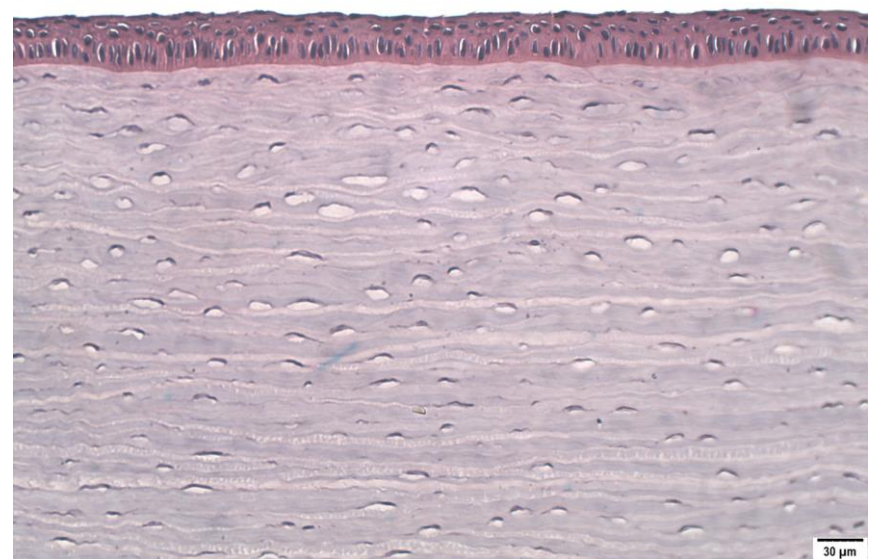
Figura 38 - Cortes histológicos das córneas extraídas após 14 dias de teste. (A) Grupo Controle – sem administração das formulações poliméricas; (B) Modelo de olho seco não tratado (C) Grupo NTAC; (D) Grupo NTAC-HA. Barra da escala A.1; B.1; C1; D1: 60 μm ($\times 10$) e A.2; B.2; C2; D2: 30 μm ($\times 20$). As setas indicam alterações na camada epitelial e perda celular devido à indução do olho seco.

A) Controle – sem indução do modelo experimental da doença do olho seco

A.1

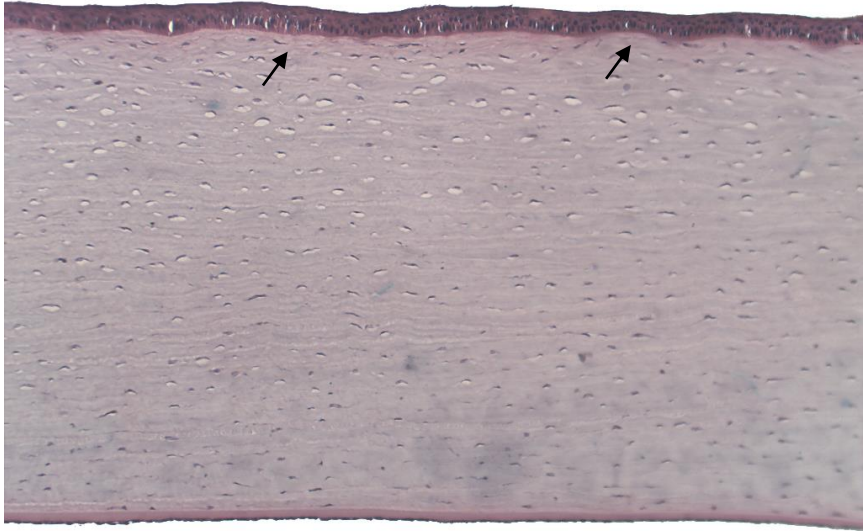


A.2



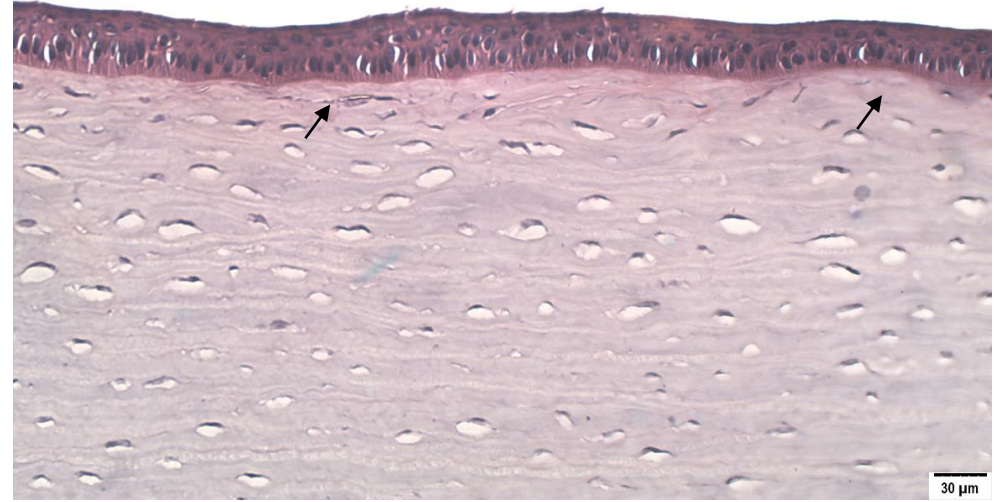
B) Modelo olho seco não tratado

B.1



60 μm

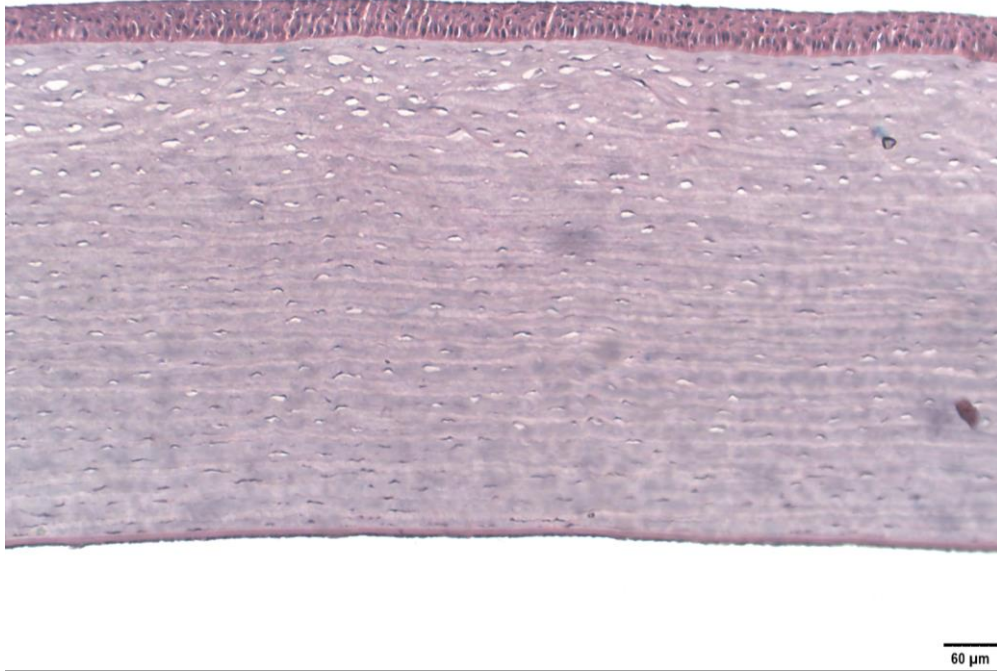
B.2



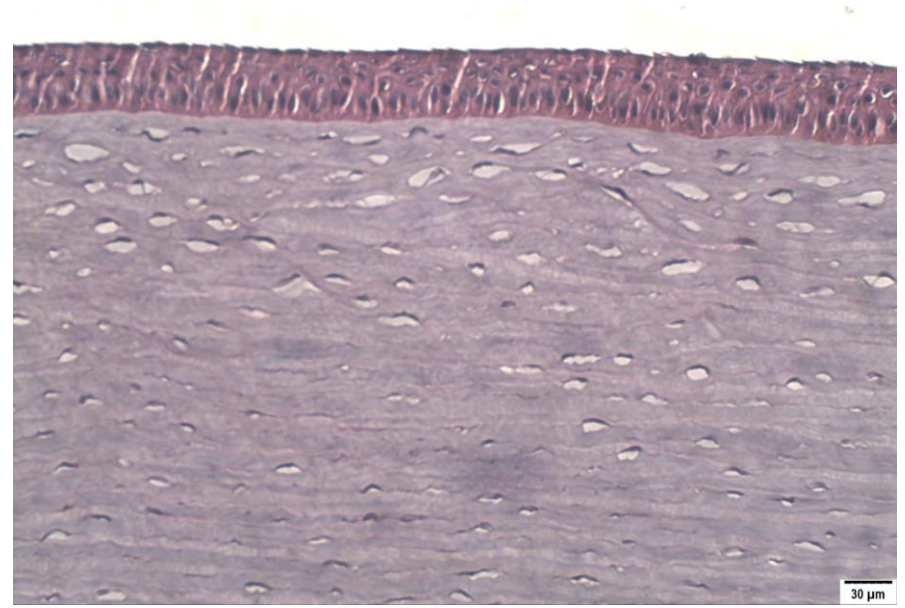
30 μm

C) NTAC - indução do modelo experimental da doença do olho seco e tratado com a NTAC

C.1

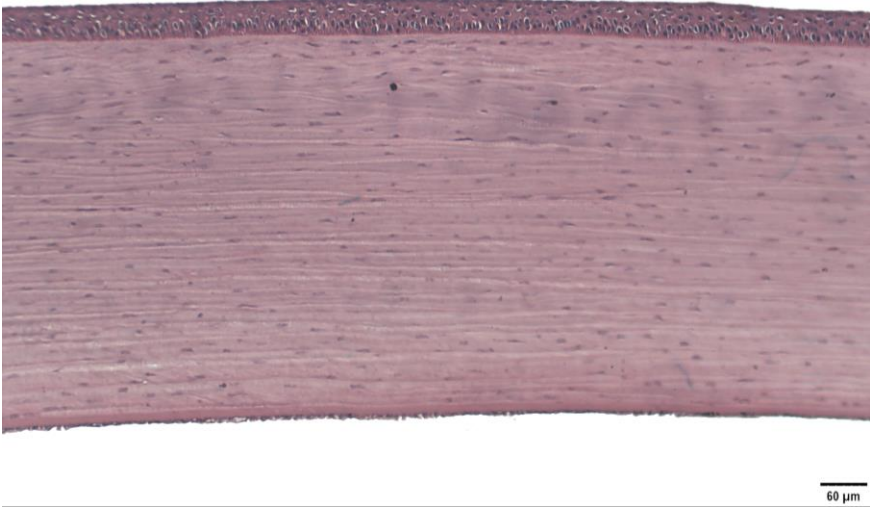


C.2

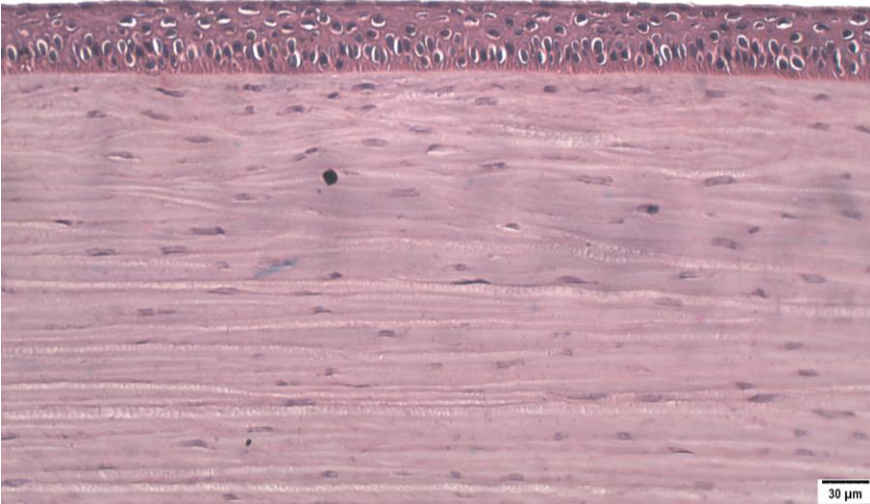


D) NTAC - HA - indução do modelo experimental da doença do olho seco e tratado com a NTAC - HA

D.1



D.2



6.3 CONCLUSÕES

A indução do modelo experimental da doença de olho seco em coelhos pelo método de indução química, com o uso de sulfato de atropina, três vezes ao dia, foi alcançada de maneira eficaz no sétimo dia do protocolo experimental, que foi evidenciada pela diminuição do escore do teste de Schirmer (I) e pela redução do tempo de ruptura lacrimal (TBUT<10 segundos) comparado com os valores encontrados no início do teste. Adicionalmente, as imagens obtidas por tomografia de coerência óptica e histologia também demonstraram irregularidades principalmente no epitélio da córnea em algumas regiões da superfície ocular.

As formulações NTAC e NTAC-HA mostraram resultados promissores no tratamento da doença, visto que em ambos os grupos, foi verificado o aumento da produção de lágrimas, o retorno da estabilidade do filme lacrimal e o reestabelecimento da integridade da camada do epitélio após sete dias de administração, uma vez por dia, do fármaco tacrolimus veiculado nos referidos sistemas de entrega, mesmo com a instilação contínua de sulfato de atropina. Acrescenta-se ainda que, apesar de não ter sido observado diferença significativamente estatística entre os resultados obtidos entre as duas formulações, notou-se que a NTAC apresentou melhor perfil no aumento da produção de lágrimas e que a NTAC-HA foi mais efetiva no retorno da estabilidade do filme lacrimal.

7 CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O sistema polimérico nanoestruturado de tacrolimus a partir do polímero Eudragit RL 100, obtido pelo método de método de nanoprecipitação e o sistema coloidal híbrido, formado pelo revestimento da nanoformulação pré-formada com o ácido hialurônico na forma de hialuronato de sódio (NTAC-HA), foram satisfatoriamente obtidos e apresentam interessantes características como alternativa no tratamento tópico da doença do olho seco e também para exploração de produção em escala industrial.

Os métodos de caracterização utilizados para a avaliação dos parâmetros físico-químicos demonstraram resultados coerentes e adequados para os sistemas desenvolvidos e foram ferramentas importantes na otimização do processo de desenvolvimento. As diferenças na carga superficial das partículas obtidas, parâmetro de grande relevância para esse trabalho, foram claramente evidenciadas na avaliação do potencial zeta e nas interações com a mucina, que podem indicar um aumento do tempo de residência da formulação na mucosa ocular e consequentemente aumento da biodisponibilidade do fármaco.

Na avaliação da estabilidade à longo prazo, a nanopartícula não revestida, foi capaz de manter, de maneira eficaz, os resultados dentro dos critérios avaliados, durante os 90 dias de estudo (médio prazo). Apesar do comportamento variável em relação ao tamanho da partícula, no período de avaliação da estabilidade, a NTAC-HA não apresentou fenômenos significativos de instabilidade cinética e alterações nos valores de potencial zeta. Além disso, as outras evidências obtidas na fase de caracterização, a classificaram como um sistema com potencial exploratório para as demais etapas do projeto.

A triagem inicial do potencial de irritação ocular das formulações realizado pelo ensaio HET-CAM pelo teste de Draize (método de avaliação *in vivo*), demonstraram a segurança dos sistemas nanoestruturados desenvolvidos para a entrega do fármaco tacrolimus visto que, tanto a NTAC como a NTAC-HA foram classificadas como não irritantes.

O modelo experimental de indução da doença do olho seco foi satisfatoriamente desenvolvido pela técnica de indução química com o uso de sulfato de atropina. O diagnóstico foi confirmado pela redução na produção de lágrimas, perda da estabilidade do filme lacrimal, acompanhada de danos à superfície ocular, principalmente na camada epitelial das córneas. A administração tópica uma vez por dia das nanoformulações, após a confirmação da indução da doença, durante sete dias, demonstrou a potencial eficácia dos sistemas nanoestruturados desenvolvidos para o tratamento da doença do olho seco. Apesar da não diferença significativamente estatística, a NTAC, carregada positivamente, proporcionou melhor perfil no reestabelecimento do volume lacrimal aos valores considerados normais para olhos

saudáveis e a NTAC-HA, carregada negativamente, foi mais interessante para o retorno da estabilidade do filme lacrimal.

Como perspectivas futuras e considerando a condição inflamatória induzida pela doença do olho seco, que resulta na produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6) na superfície ocular, será interessante explorar e investigar a ação dos sistemas nanoestruturados desenvolvidos contendo o fármaco tacrolimus, em modelo induzido da DED, na interrupção do ciclo na inflamação, que poderia ser evidenciado pela diminuição dos níveis/expressão dos referidos mediadores. Esse estudo poderá trazer informações relevantes que contribuirão ainda mais para a comparação da eficácia das nanoformulações no tratamento da DED.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATANGELO, G. *et al.* Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. **Cells**, v.9, n.7, 2020.

ABERAME, A.R. *et al.* Assessment of prevalence of dry eye among medical students using ocular surface disease index questionnaire – Is COVID-19 to be really blamed? **Indian Journal of Ophthalmology**, 2023.

ABLAMOWICZ, A.F; NICHOLS, J.J. Ocular Surface Membrane-Associated Mucins. **The Ocular Surface**. v.14, p 331-341, 2016.

AGUILERA-GARRIDO, A. *et al.* Mucoadhesive properties of liquid lipid nanocapsules enhanced by hyaluronic acid. **Journal of Molecular Liquids**. v. 296, 2019.

ALDRICH, D. S. *et al.* Ophthalmic preparations -. **USP Stimuli to the revision process**, v. 39, p. 69-71, 2013.

ALIPOOR, R. *et al.* Hyaluronic Acid-Based Nanomaterials as a New Approach to the Treatment and Prevention of Bacterial Infections. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.10, 2022.

ALLAN, J. *et al.* Regulatory landscape of nanotechnology and nanoplastics from a global perspective. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.122, 104885, 2021.

ALLEN, L.V. *et al.* Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 9 ed. Baltimore, Md: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

ALMEIDA H. *et al.* Ophthalmic preparations - new strategies to promote the bioavailability. **Acta Farmacêutica Portuguesa**., vol. 10, n.1, pp.44-83, 2021.

AMRUTKAR, C. S., PATIL, S. B. Nanocarriers for ocular drug delivery: Recent advances and future opportunities. **Indian Journal of Ophthalmology**, v.71, n.6, p.2355–2366, 2023.

ASTM E2490 – 09 - Standard Guide for Measurement of Particle Size Distribution of Nanomaterials in Suspension by Photon Correlation Spectroscopy (PCS).

ASTM E2865 – 12 - Standard Guide for Standard Guide for Measurement of Electrophoretic Mobility and Zeta Potential of Nanosized Biological Materials.

ASTM F1980-21 - Standard Guide for Accelerated Aging of Sterile Barrier Systems of Medical Devices.

ATRI, A.; CHANG, M.S; STRICHARTZ, G.R. Farmacologia Colinérgica. In: D . GOLAN, D. E. *et al.* Princípios de Farmacologia - **A Base Fisiopatológica da Farmacologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

AULTON, M. E.; TAYLOR, K.M.G. Aulton Delineamento de Formas Farmacêuticas. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

BALDIM, I. *et al.* Natural Ergot Alkaloids in Ocular Pharmacotherapy: Known Molecules for Novel Nanoparticle-Based Delivery Systems. **Biomolecules**. v.10, 2020.

BARABINO, S. *et al.*, Understanding Symptoms and Quality of Life in Patients With Dry Eye Syndrome. **The Ocular Surface**, v. 14, p. 365-376, 2016.

BARANAUSKAS, V.; GALGAUSKAS, S. Rabbit models of dry eye disease: comparative analysis. **International Journal of Ophthalmology**, v. 16, n.8, p.1177–1185, 2023.

BARROS, J.N. *et al.* Impression cytology of the ocular surface: examination technique and staining procedure. **Arq Bras Oftalmol**, v. 64, p.127-31, 2001.

BAUDOIN, C. Un nouveau schéma pour mieux comprendre les maladies de la surface oculaire. **Journal Français d’Ophthalmologie**, v.30, n.3, p.239-246, 2007.

BAYER, I. S. Hyaluronic Acid and Controlled Release: A Review. **Molecules**, v.25, n.11, 2020.

BERTELMANN, E. Immunomodulatory Therapy in Ophthalmology – Is There a Place for Topical Application? **Ophthalmologica**, v. 218, p.359–367, 2004.

BODDUPALLI, B.M. *et al.* Mucoadhesive drug delivery system: An overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 1, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária RESOLUÇÃO RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília 25 de julho de 2017.

BURGALASSI, S. *et al.* Development of a Simple Dry Eye Model in the Albino Rabbit and Evaluation of Some Tear Substitutes. **Ophthalmic Research**, v.31, n.3, p.229–235, 1999.

BURHAN, A.M. *et al.* Posterior Segment Ophthalmic Drug Delivery: Role of Muco-Adhesion with a Special Focus on Chitosan. **Pharmaceutics**, v.13, 2021.

CALZONI, E. *et al.* Biocompatible Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications in Cancer and Neurodegenerative Disorder Therapies. **Journal of Functional Biomaterials**, v.10, n.1, 2019.

CAMARGO, G.A. **Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação da eficiência de encapsulação de nanocápsulas poliméricas contendo tacrolimus**. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2020.

CASTRO, B.F.M. *et al.* Positively charged polymeric nanoparticles improve ocular penetration of tacrolimus after topical administration. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 60, 2020.

CASTRO, B.F.M. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação in vivo de nanocápsulas poliméricas contendo tacrolimus para uso tópico ocular**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

CAZARIN, K. C.C.; CORRÊA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 40, n. 3, jul./set., 2004.

CELIA, C. *et al.* Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 72, p. 155-160. 2009.

COLLIGRIS, B *et al.* Recent developments on dry eye disease treatment compounds. **Saudi Journal of Ophthalmology**. v.28, p.19–30, 2014.

CRAIG, J. P.; DOWNIE, L. E. Tears and contact lenses. In: PHILLIPS, A.J.; SPEEDWELL, L. **Contact Lenses**. Elsevier, 2019. Disponível em : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780702071683000052?via%3Dihub>. Acesso em : Acesso em: 20 de novembro de 2023.

CRAIG, J.P. *et al.* TFOS DEWS II Definition and Classification Report. **The Ocular Surface**, v. 15, p.276-283, 2017.

CRANDALL, D. C.; LEOPOLD, I. H. The Influence of Systemic Drugs on Tear Constituents. **Ophthalmology**, v.86, n.1, p.115–125, 1979.

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering**, v.80, p.771–784, 2017.

DARTT, D. A. Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: Relevance in dry eye diseases. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.28, n.3, p.155–177, 2009.

DAS, S., SURESH, P. K., DESMUKH, R. Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.6, n.2, p.318–323, 2010.

DAS, S.; SURESH, P.K. Nanosuspension: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to amphotericin B. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.7 p. 242–247, 2011.

DAVE, R.S. *et al.* Ocular drug delivery to the anterior segment using nanocarriers: A mucoadhesive/mucopenetrative perspective. **Journal of Controlled Release**, v.336, p.71–88, 2021.

DAVIDOVICH-PINHAS, M; BIANCO-PELED, H. Mucoadhesion: a review of characterization techniques. **Expert Opin. Drug Deliv**.v.7, n.2, 2010.

DESCHAMPS, N.; BAUDOUIN, C. Dry Eye and Biomarkers: Present and Future Dry Eye and Biomarkers: Present and Future. **Curr Ophthalmol Rep** v.1, p.65–74, 2013.

DEWEY-MATTIA, D.; CRAWFORD, K.; MASS, A. The Secret World of Pharmacokinetics, **Review of Ophthalmology**, 2009.

DI PRIMA, G. *et al.* Mucoadhesive PEGylated inulin-based self-assembling nanoparticles: In vitro and ex vivo transcorneal permeation enhancement of corticosteroids. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 49, p. 195–208, 2019.

DIALETACHI, E.L.G. **Espalhamento Dinâmico de Luz em Sistemas Coloidas Diluídos**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de São Paulo, 2017.

DIMER, F.A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Quim. Nova**, v. 36, n. 10, p.1520-1526, 2013.

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G., CALVERY, H.O. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J Pharmacol Exp Ther**, v.82, p.377-90, 1944.

EZINNE, N. *et al.* High Prevalence of Symptomatic Dry Eye Disease Among University Students During the COVID-19 Pandemic in University of West Indies, Trinidad and Tobago. **Clinical Optometry**, v. 15, 2023.

FALLACARA, A. *et al.* Hyaluronic Acid in the Third Millennium. **Polymers**, v.10, n.7, 2018.

FESSI, H. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int. J. Pharm.**, v. 55, p. R1, 1989.

FIEL, L.A. **Espalhamento múltiplo de luz em temperatura variável: um método inovador para determinação dos parâmetros termodinâmicos de dispersões coloidais**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

FRIEDRICH, R.B. **Avaliação das atividades antiedematogênica e imunossupressora de tacrolimus encapsulado em nanocápsulas de núcleo lipídico com diferentes propriedades de superfície**. Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

FONSECA, E.C. *et al.* Olho seco: etiopatogenia e tratamento. **Arq Bras Oftalmol.**, v.73, n.2, p.197-203, 2010.

FUJIMOTO, J.G. Optical Coherence Tomography: An Emerging Technology for Biomedical Imaging and Optical Biopsy. **Neoplasia**. v. 2, p. 9-25, 2000.

FULGÊNCIO, G.O. *et al.* Sistema de liberação contendo ciclosporina para o tratamento de ceratoconjuntivite seca: estudo preliminar. **Rev Bras Oftalmol**. v.72, n.4, p.232-236, 2013.

GARCIA, S.C. *et al.* Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, n. 6, p. 393-401, 2004.

GARG, A.; GARG, R. Current advances in colloidal based delivery systems for Tacrolimus. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.68, 2022.

GOEBEL, A. S. B.; NEUBERT, R. H. H.; WOHLRAB, J. Dermal targeting of tacrolimus using colloidal carrier systems. **Int J Pharm** v. 404, p. 159-168. 2011.

GRAÇA, A. *et al.* Useful In Vitro Techniques to Evaluate the Mucoadhesive Properties of Hyaluronic Acid-Based Ocular Delivery Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, 2018.

HABIB, B; KALSHETTI, M.S. UV spectrophotometric method development and validation of tacrolimus in bulk and formulation. **J. Global Trends Pharm Sci**, v. 12 (3), p. 9660 – 9663, 2021.

HUKINS, D.W.L; MAHOMED, A.; KUKUREKA, S.N. Accelerated aging for testing polymeric biomaterials and medical devices. **Medical Engineering & Physics**, v. 30, p. 1270 –1274, 2008.

HINTZE, V.; SCHNABELRAUCH, M.; ROTHER, S. Chemical Modification of Hyaluronan and Their Biomedical Applications. **Frontiers in Chemistry**, v.10, 2022.

IBRAHIM, H. K.; EL-LEITHY, I. S.; MAKKY, A. A. Mucoadhesive Nanoparticles as Carrier Systems for Prolonged Ocular Delivery of Gatifloxacin/Prednisolone Bitherapy. **Molecular Pharmaceutics**, v.7, n.2, p.576–585, 2010.

ICCVAM. Test method evaluation report: current validation status of *in vitro* test methods proposed for identifying eye injury hazard potential of chemicals and products. NIH Publication No. 10-7553. Research triangle park. 2010.

ICHENBAUM, G. **et al.** Methods to evaluate and improve the injection site tolerability of intravenous formulations prior to first-in-human testing. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 68, n. 3, p. 394-406, 2013.

ICHIHASHI, Y. *et al.* Short break-up time type dry eye has potential ocular surface abnormalities. **Taiwan Journal of Ophthalmology**, v.5, p. 68-71, 2015.

ISO/TR 18401:2017 (EN) – Nanotechnologies - Plain language explanation of selected terms from the ISO/IEC 80004 series.

JANAGAM, D.R.; WU, L.; LOWE, T.L. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. **Adv Drug Deliv Rev.**, v.1; p.31–64, 2017.

JAVADI, M.A; FEIZI, S. Dry Eye Syndrome. **J Ophthalmic Vis Res**, v.6 n.3, p. 192-198, 2011.

JINDAL, A. B. The effect of particle shape on cellular interaction and drug delivery applications of micro- and nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.532, n.1, p.450–465, 2017.

JONES, L. *et al.* TFOS DEWS II Management and Therapy Report. **The Ocular Surface**, v.15, n.3, p. 575–628, 2017.

JUNG-CHO, E. *et al.* Nanoparticle Characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies. **Molecular pharmaceutics**, v. 10, p. 2093-2110. 2013.

KARN, P. R. *et al.*, Supercritical fluid-mediated liposomes containing cyclosporin A for the treatment of dry eye syndrome in a rabbit model: Comparative study with the conventional cyclosporin A emulsion. **International Journal of Nanomedicine**, v.9, n.1, p.3791–3800, 2014.

KATARA, R.; MAJUMDAR, D. K. Eudragit RL 100-based nanoparticulate system of aceclofenac for ocular delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.103, p.455–462, 2013.

KAUR, G.; GREWAL, J.; JYOTI, K.; JAIN, U. K.; CHANDRA, R.;MADAN, J. Oral controlled and sustained drug delivery systems. *In Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems* (pp. 567–626). Elsevier, 2018.

KAUR, I. P.; KAKKAR, S. Nanotherapy for posterior eye diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 100–112, 2014.

KAUR, I. P.; SMITHA, R Penetration Enhancers and Ocular Bioadhesives: Two New Avenues for Ophthalmic Drug Delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.28, n.4, p.353–369, 2002.

KHAN, I. *et al.* Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, 908–931, 2019.

KİLİÇARSLAN, M.; BAYKARA, T. Effects of the permeability characteristics of different polymethacrylates on the pharmaceutical characteristics of verapamil hydrochloride-loaded microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v.21, n.2, p.175–189, 2004.

KOVAČEVIĆA, A.B.; MÜLLERA, R.H.; KECKC, C.M. Formulation development of lipid nanoparticles: improved lipid screening and development of tacrolimus loaded nanostructured lipid carriers (NLC), **International Journal of Pharmaceutics**, v.576, 2019.

LAJAVARDI, L. *et al.* New formulation of vasoactive intestinal peptide using liposomes in hyaluronic acid gel for uveitis. **Journal of Controlled Release**, v.139, n.1, p.22–30, 2009.

LALLEMAND, F. *et al.* Cyclosporine A delivery to the eye: A comprehensive review of academic and industrial efforts. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 117, p.14–28, 2017.

LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREUR, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.58, n.2, p.327–341, 2004.

LEVINGER, E *et al.* Topical 0.03 % tacrolimus for subepithelial infiltrates secondary to adenoviral keratoconjunctivitis. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 252, p. 811-816. 2014.

LI, J. *et al.* Fabrication of a drug delivery system that enhances antifungal drug corneal penetration. **Drug Delivery**, v.25, n.1, p. 938–949, 2018.

LI, N; DENG, XG; HE, MF. Comparison of the Schirmer I test with and without topical anesthesia for diagnosing dry eye. **Int J Ophthalmol**.v.5, p.478–81, 2012.

LIN, H; YIU, S.C. Dry eye disease: A review of diagnostic approaches and treatments. **Saudi Journal of Ophthalmology**, v 28, p.173-181, 2014.

LUACES-RODRÍGUEZ, A. *et al.* Preclinical characterization and clinical evaluation of tacrolimus eye drops. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 120, p.152–161, 2018.

LUEPKE N.P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Fd. Chem. Toxicol.**, v.23, pp. 287-291, 1985.

LV, Z. *et al.* Recent progress of nanomedicine in managing dry eye disease. **Advances in Ophthalmology Practice and Research**, 2024.

MALHOTRA, M.; MAJUMDAR, D. K. Permeation through cornea. **Indian J Exp Biol**, v.39, n.1, p.11–24, 2001.

MAHALING, B.; KATTI, D. S. Understanding the influence of surface properties of nanoparticles and penetration enhancers for improving bioavailability in eye tissues in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, 501, p.1–9, 2016.

MALVERN. A basic guide to particle characterization. Disponível em: https://www.cif.iastate.edu/sites/default/files/uploads/Other_Inst/Particle%20Size/Particle%20Characterization%20Guide.pdf. Acesso em: Agosto, 2021a .

MALVERN. Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. https://macro.lsu.edu/HowTo/MALVERN/PDF/MALVERN_FAQ_OTHER/Dynamic%20Light%20Scattering_An%20Introduction%20in%2030%20Minutes_V4.pdf. Acesso em: Agosto 2021b.

MALVERN. Zeta potential - An introduction in 30 minutes. <https://www.research.colostate.edu/wp-content/uploads/2018/11/ZetaPotential-Introduction-in-30min-Malvern.pdf>. Acesso em: Março 2021c.

MANDAL, B.; ALEXANDER, K. S.; RIGA, A. T. Preparation and physicochemical characterization of Eudragit® RL100 Nanosuspension with potential for Ocular Delivery of Sulfacetamide. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v.13, n.4, 2010.

MARQUARDT, C. *et al.* Evaluation of the tissue toxicity of antiseptics by the hen's egg test on the chorioallantoic membrane (HETCAM). **European Journal of Medical Research**, v. 15, n. 204, 2010.

MARQUES, D. L. *et al.* Lacrimal osmolarity and ocular surface in experimental model of dry eye caused by toxicity. **Rev Bras Oftalmol.**v.74, p.68-72, 2015.

MARTIN, V. *et al.* Reviewing particulate delivery systems loaded with repurposed tetracyclines – From micro to nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 649, 2024.

MASLI, S.; DARTT, D. A. Mouse Models of Sjögren's Syndrome with Ocular Surface Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.23, 2020.

MCDONALD, M. *et al.* Economic and Humanistic Burden of Dry Eye Disease in Europe, North America, and Asia: A Systematic Literature Review. **The Ocular Surface**. v.14, 2016.

MELO C. A. *et al.* Amphotericin B-loaded Eudragit RL100 nanoparticles coated with hyaluronic acid for the treatment of vulvovaginal candidiasis. *Carbohydrate Polymers*, v. 230, 2020.

MENGUAL, O.; MEUNIER, G.; CAYRE, I.; PUECH, K.; SNABRE, P. Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. **Colloids and Surfaces A: Physicochemistry and Engineering Aspects**, v. 152, p. 111-123, 1999a.

MENGUAL, O.; MEUNIER, G.; CAYRÉ, I.; PUECH, K.; SNABRE, P. TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurements for concentrated emulsion and suspension instability analysis. **Talanta**, v. 50, p. 445-456, 1999b.

MOAWAD, P. Evaluation of the effect of topical tacrolimus 0.03% versus cyclosporine 0.05% in the treatment of dry eye secondary to Sjogren syndrome. **European Journal of Ophthalmology**, v32, p. 673-679, 2022.

MODI, D. *et al.* Formulation and development of tacrolimus-gellan gum nanoformulation for treatment of dry eye disease. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 211, 2022.

MOHAMMAD, G. *et al.* Topical Tacrolimus Proglycosomes Nano-Vesicles As a Potential Therapy for Experimental Dry Eye Syndrome. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.111, n.2, p.479–484, 2022.

MORTHEN, M.K. *et al.* The physical and mental burden of dry eye disease: a large population-based study investigating the relationship with health-related quality of life and its determinants. **Ocul Surf**. v.21, p.107–17, 2021.

MOSCOVICI, B.K, *et al.* Treatment of Sjögren's syndrome dry eye using 0.03% tacrolimus eye drop: prospective double-blind randomized study. *Cont Lens Anter Eye*. v. 38(5), p.373-378, 2015.

NAGARWAL, R. C. *et al.* Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v.136, n.1, p.2–13, 2009.

NELSON, J.D. *et al.* TFOS DEWS II Introduction. **The Ocular Surface**, v. 15, p.269-275, 2017.

NORN, M., Desiccation of the precorneal tear film I. Corneal wetting time. **Acta Ophthalmol**. v.47, p.865–880, 1969.

O'NEIL, E.C. *et al.* Advances in dry eye disease treatment. **Curr Opin Ophthalmol**. v. 30, n. 3, p.166-178, 2019.

ONUGWU, A. L. *et al.* Nanotechnology based drug delivery systems for the treatment of anterior segment eye diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 354, p.465–488, 2023.

ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANUSUR, H.S. Biomateriais - Fundamentos e Aplicações. Editora Cultura Médica, 2006.

PAULSEN, A.J. *et al.* Dry eye in the beaver dam offspring study: prevalence, risk factors, and health-related quality of life. **Am J Ophthalmol**, v.157, n.4, p. 799-806, 2014.

PEREIRA, M. P. *et al.* Cationic and anionic unloaded polymeric nanocapsules: Toxicological evaluation in rats shows low toxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 116, 2019.

PFLUGFELDER, S.C; DE PAIVA C.S. The pathophysiology of dry eye disease: what we know and future directions for research. **Ophthalmology**, v.124: S4– S13, 2017.

PFLUGFELDERA, S. C.; STERNA, M.E. Biological functions of tear film. **Experimental Eye Research**, v.197, 2020.

PHAN, H. T.; HAES, A. J. What Does Nanoparticle Stability Mean? **The Journal of Physical Chemistry C**, v.123, n.27, p.16495–16507, 2019.

PIGNATELLO, R.; BUCOLO, C.; PUGLISI, G. Ocular tolerability of Eudragit RS100® and RL100® nanosuspensions as carriers for ophthalmic controlled drug delivery. **J. Pharm. Sci.**, v. 91, n. 12, p. 2636-2641. 2002.

PIRES, P. A. R.; EL SEOUD, O. A. Espalhamento da Luz. In: CANEVAROLO Jr., S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. 1. ed. São Paulo: Artliber, 2003.

PRADO, S.B. Topical Tacrolimus for Córneal Subepithelial Infiltrates Secondary to Adenoviral Keratoconjunctivitis. **Córnea**, v. 36, n.9, 2017.

PUTZ, C. Oftalmologia Ciências Básicas. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 2001.

RAH, M.J. A review of hyaluronan and its ophthalmic applications. **Optometry**, v.82, p.38-43, 2011.

RAHMAN, M.M. *et al.* Experimental Models, Induction Protocols, and Measured Parameters in Dry Eye Disease: Focusing on Practical Implications for Experimental Research. **Int. J. Mol. Sci.** v. 22, 2021.

RATHORE, A.; MAHESH, G. Public perception of nanotechnology: A contrast between developed and developing countries. **Technology in Society**, v. 67, 2021.

REIJNDERS, L. Safer-by-design for nanomaterials. **Nanotoxicity**, p. 215–237, 2020.

REIMONDEZ-TROITIÑO, S. *et al.*; Nanotherapies for the treatment of ocular diseases. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 95 p. 279–293, 2015.

REIS, P. C. *et al.* Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.2, p. 8–21, 2006.

RESEARCH AND MARKETS. Nanotechnology - Global Strategic Business Report. Disponível em: https://www.researchandmarkets.com/reports/338364/nanotechnology_global_strategic_business_report. Acesso em: 10 de dezembro, 2023.

RHEE M.K; MAH F.S. Inflammation in dry eye disease: how do we break the cycle? **Ophthalmology**. v.124: S14– S19, 2017.

RIBEIRO, M. C. S. Neuroprotective effect of siRNA entrapped in hyaluronic acid-coated lipoplexes by intravitreal administration. **Pharmaceutics**, v.13, n.6, 2021.

RIVELLI, G.G. Nanofibras biodegradáveis contendo furoato de mometasona: desenvolvimento, caracterização e avaliação da segurança em modelo experimental. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, 2021.

ROLANDO, M.; ZIERHUT, M.Z. The Ocular Surface and Tear Film and Their Dysfunction in Dry Eye Disease. **Survey of Ophthalmology**, v. 45, p.S203-S210, 2001.

RUPENTHAL, I. D.; GREEN, C. R.; ALANY, R. G. Comparison of ion-activated in situ gelling systems for ocular drug delivery. Part 2: Precorneal retention and *in vivo* pharmacodynamic study. **International journal of pharmaceutics**, v. 411, n. 1-2, p. 78-85, 2011.

SÁNCHEZ-RÍOS, A. et al. Validation of a preclinical dry eye model in New Zealand white rabbits during and following topical instillation of 1% ophthalmic atropine sulfate. **Animal Models And Experimental Medicine**. v.5, p.266–273, 2022;

SAVIĆ, V. *et al.* Tacrolimus-loaded lecithin-based nanostructured lipid carrier and nanoemulsion with propylene glycol monocaprylate as a liquid lipid: Formulation characterization and assessment of dermal delivery compared to referent ointment. **International Journal of Pharmaceutics**, v.569, 2019.

SAVINI, G. *et al.* The challenge of dry eye diagnosis. **Clinical Ophthalmology**. v.2, p.31–55, 2008.

SCHAFFAZICK, S, R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHEIVE, M., YAZDANI, S.; HAJRASOULIHA, A. R. The utility and risks of therapeutic nanotechnology in the retina. **Therapeutic Advances in Ophthalmology**, 13, 2021.

SERRUYA, L. G.; NOGUEIRA, D. C.; HIDA, R. Y. Schirmer test performed with open and closed eyes: variations in normal individuals. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 72, n.1, 2009.

SILVA-CUNHA, A. *et al.* Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arq Bras Oftalmol.**, v. 66 p. 385-91, 2003.

SHOUGHY, S.S. Topical tacrolimus in anterior segment inflammatory disorders. **Eye and Vision**, 2017.

SILVA, R.O. *et al.* Treatment for chemical burning using liquid crystalline nanoparticles as an ophthalmic delivery system for pirfenidone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 568, 2019.

SIMULESCU, V. *et al.* Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. **Carbohydrate Polymers**, v.137, p. 664–668, 2016.

SINGH, S; SHARMA, S; BASU, S . Rabbit models of dry eye disease: Current understanding and unmet needs for translational research. **Experimental Eye Research**, v. 206, 2021.

SMART, J.D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion, **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 57, p.1556–1568, 2005.

SNETKOV, P. *et al.* Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. **Polymers**, v.12, n.8, 2020.

SOETEMAN-HERNÁNDEZ, L. G., *et al.* Challenges of implementing nano-specific safety and safe-by-design principles in academia. **NanoImpact**, v.19, 2020.

SOLTANI, S. Design of eudragit RL nanoparticles by nanoemulsion method as carriers for ophthalmic drug delivery of ketotifen fumarate. **Iran J Basic Med Sci.**, v. 19, 2016.

SOUZA, M. C. M.. **Desenvolvimento de sistemas poliméricos de implantação intraocular contendo tacrolimus para o tratamento de uveítes crônicas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

SOUZA, S.V.C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SRIDHAR, M.S.; MARTIN, R. Anterior segment optical coherence tomography for evaluation of cornea and ocular surface. **Indian J Ophthalmol.** v. 66 (3), p. 367–372, 2018.

SRINIVASARAO, D.A.; LOHIYA G; KATTI, D.S. Fundamentals, challenges, and nanomedicine-based solutions for ocular diseases. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 11, n.4, 2019.

STAPLETON, F. *et al.* TFOS DEWS II Epidemiology Report. **The Ocular Surface**, v.15, p.334 -365, 2017.

STERN, R. *et al.* The many ways to cleave hyaluronan. **Biotechnology Advances**, v.25. n.6, p.537–557, 2007.

SUÁREZ-CORTÉS, T.; MERINO-INDA, N.; BENITEZ-DEL-CASTILLO, J.M. Tear and ocular surface disease biomarkers: A diagnostic and clinical perspective for ocular allergies and dry eye disease. **Experimental Eye Research**, v.221, 2022.

SUBRINHO, F. L. **Validação de Metodologia Analítica por HPLC para Quantificação de Posaconazol em Nanopartículas de PLGA: Análise do Perfil de Liberação e Caracterização das Partículas Poliméricas**. Dissertação (Mestrado) Universidade de Brasília, 2019

SULLIVAN, D.A. *et al.* TFOS DEWS II Sex, Gender, and Hormones Report. **The Ocular Surface**, v. 15, p. 284-333, 2017.

SWEENEY, D. F., MILLAR, T. J.; RAJU, S. R. Tear film stability: A review. **Experimental Eye Research**, v.117, p. 28–38, 2013.

SWETLEDGE, S. *et al.* Distribution of polymeric nanoparticles in the eye: implications in ocular disease therapy. **J Nanobiotechnology**, v. 19, 2021.

TAMURA *et.al.* Tacrolimus is a class II low-solubility high-permeability drug: The effect of P-glycoprotein efflux on regional permeability of tacrolimus in rats **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 719-729, 2002 .

TANG, Z. *et al.* Ocular Nanomedicine. **Adv. Sci.** v.9, 2022.

TAVARES, F.P. *et al.* Dry Eye Disease. **Seminars in Ophthalmology**, v.25, n.3, p.84-93, 2010.

TEIXEIRA L; DUBIELZIG, R.R. Special Senses - Eye. In: WALLIG, M.A.; HASCHEK, W.M.; ROUSSEAU, C.G; BOLON, B. ; MAHLER. B.W. **Fundamentals of Toxicologic Pathology**. 3.ed. Elsevier, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128098417000228?via%3Dihub>. Acesso em: 20 de novembro de 2023.

THAKRAL, S.; THAKRAL, N.K.; MAJUMDAR, D.K. Eudragit®: a technology evaluation. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v.10, p.131-149, 2013.

TOMMASO, C.D. Colloidal systems for the delivery of cyclosporin A to the anterior segment of the eye. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 69, p. 116-123, 2011.

TSUBOTA, K. *et al.* New Perspectives on Dry Eye Definition and Diagnosis: A Consensus Report by the Asia Dry Eye Society. **THE OCULAR SURFACE**, v.15, n.1, 2017.

TURBISCAN, F. smart scientific A. TURBISCAN THE REFERENCE FOR STABILITY ANALYSIS Disponível em: <http://www.gammadata.se/assets/Uploads/Doc-turbiscan.pdf> > Acesso em: Agosto 2021.

UBRICH, N. *et al.* Oral evaluation in rabbits of cyclosporine-loades Edragit RS or RL nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, p.169-175, 2005.

UCHINO, M. *et al* .Prevalence of Dry Eye Disease and its Risk Factors in Visual Display Terminal Users: The Osaka Study. **American Journal of Ophthalmology**, v.156, n.4, p. 759-766, 2013.

UCHINO, M.; TSUBOTA, K.Tear Film Overview. In: Dartt, D.A. **Encyclopedia of the Eye** Elsevier, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123742032000476>. Acesso em: 20 de novembro de 2023.

USP. **United States Pharmacopeia**. 37 ed. RockVile: United States Pharmacopeial Convention, 2014.

USP.**United States Pharmacopeia** 40 ed. RockVile: United States Pharmacopeial Convention, 2017.

VARUM, F.O. Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 44, n. 4, 2008.

VENKATESWARAN, N. *et al* . Optical coherence tomography for ocular surface and corneal diseases: a review. **Eye and Vision**, v.5, n.13, 2018.

WEI, X.E. *et al* .Tear film break-up time in rabbits. **Clinical and Experimental Optometry**, v.96, p.70-75, 2013.

WENG, Y.*et al* . Nanotechnology-based strategies for treatment of ocular disease. **Acta Pharmaceutica Sinica B.**, v. 7, p.281-291, 2017.

WENG SCHICK, S. Method for measuring mucoadhesion of ophthalmica considering regulatory aspects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 174, p. 101-105, 2022.

WORLD HEATH ORGANIZATION. Blindness and vision impairment. Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/blindness-and-visual-impairment>. Acesso: 10 de dezembro, 2023.

WILHELMUS, K. R. The Draize Eye Test. **Surv Ophthalmol.**, v.45, n.6, p.493–515, 2001.

WILLCOX, M. D. P. *et al* . TFOS DEWS II Tear Film Report. **The Ocular Surface**, v.15 n.3, p.366–403, 2017.

WOERTZ, C. Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85 p.843–853, 2013.

WOLFFSOHN, J.S. *et al* . TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report. **The Ocular Surface**, v. 15, p. 539 -574, 2017.

WU, Y. *et al.* Enhanced and sustained topical ocular delivery of cyclosporine a in thermosensitive hyaluronic acid-based in situ forming microgels. **International Journal of Nanomedicine**, v.8, p.3587–3601, 2013.

WU, Y. *et al.* Advances in Dry Eye Disease Examination Techniques. **Frontiers in Medicine**, v.8, 2022.

YAMAGUCHI, T. Inflammatory response in dry eye. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 59, 2018.

YANG, X. *et al.* Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer. **Cancer Letters**, v.334, n.2, p.338–345, 2013.

YAZDANI, M., *et al.* Tear Metabolomics in Dry Eye Disease: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n.15, 2019.

YOKOI, N. *et al.* Classification of Fluorescein Breakup Patterns: A Novel Method of Differential Diagnosis for Dry Eye. **American Journal of Ophthalmology**, v.180, p.72–85, 2017.

YOKOI, N.; GEORGIEV, G.A. Tear Film-Oriented Diagnosis and Tear Film-Oriented Therapy for Dry Eye Based on Tear Film Dynamics. **Investigative. Ophthalmology & Visual Sciences**, v.59, 2018.

YOKOI, N.; GEORGIEV, G.A. Tear-film-oriented diagnosis for dry eye. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v.63, p. 127–136, 2019.

YU, S. *et al.* Liposome incorporated ion sensitive in situ gels for ocular delivery of timolol maleate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 480, p.128–136, 2015.

ZENG, W. *et al.* Hyaluronic acid-coated niosomes facilitate tacrolimus ocular delivery: Mucoadhesion, precorneal retention, aqueous humor pharmacokinetics, and transcorneal permeability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.141, p.28–35, (2016).

ZHAI, J.; GU, J.; YUAN, J.; CHEN, J. Tacrolimus in the Treatment of Ocular Diseases. **Biodrugs**, v.25, n.2, p.89–103, 2011.

ZHMUD, T, *et al.* Dry eye disease severity and impact on quality of life in type II diabetes mellitus. **Front. Med.**, v.10, 2023.

ZHU, X *et al.*, Synthesis of thiolated chitosan and preparation nanoparticles with sodium alginate for ocular drug delivery. **Molecular Vision**, v.18, p.1973–1982, 2012.

ZIELIŃSKA, A. *et al.* Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. **Molecules**, v.25, 2020.

ANEXOS

ANEXO I – Ofício de aprovação do projeto do projeto pela comissão de ética no uso de animais da Fundação Ezequiel Dias para a realização do teste *in vivo* de avaliação da segurança biológica das formulações desenvolvidas.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS


Certificamos que o projeto intitulado “**Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo tacrolimo para o tratamento da doença do olho seco**”, registrado com o nº **030/2021**, sob a responsabilidade de **Silvia 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, em 04/02/2022.

Finalidade	Pesquisa
Vigência da autorização	14/02/2022 a 02/01/2025
Espécie/linhagem/raça	Coelhos Nova Zelândia
Nº de animais	12
Peso/Idade	-
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa

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 **02/02/2025**.

Belo Horizonte, 09 de fevereiro de 2022.


 Clara Guerra Duarte
 Coordenadora da CEUA/FUNED

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

Recebido em: ____ / ____ / ____

Ass: _____

ANEXO II – Ofício de aprovação do projeto pela comissão de ética no uso de animais da Fundação Ezequiel Dias para a realização do teste *in vivo* de avaliação da eficácia das formulações desenvolvidas.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS


Certificamos que o projeto intitulado “Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo tacrolimo para o tratamento da doença do olho seco”, registrado com o nº **023/2022**, sob a responsabilidade de **Silvia 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, em 23/02/2023.

Finalidade	Pesquisa
Vigência da autorização	23/02/2023 a 23/02/2025
Espécie/linhagem/raça	Coelhos Nova Zelândia
Nº de animais	16
Peso/Idade	2Kg/ 3 meses
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa

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 **23/03/2025**.

Belo Horizonte, 03 de março de 2023.

Documento assinado digitalmente
 RITA FLÁVIA LAURENTI RIBEIRO
 Data: 03/03/2023 13:29:32-0300
 Verifique em <https://verificador.itb.br>

Rita Flávia Laurenti Ribeiro
 Coordenadora da CEUA/FUNED

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