

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Ciências da Saúde

GEISA NASCIMENTO BARBALHO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS
PARA AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO E EFICÁCIA DE PRODUTOS
FARMACÊUTICOS INOVADORES DE APLICAÇÃO OFTÁLMICA**

BRASÍLIA - DF

2023

Geisa Nascimento Barbalho

Desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais para avaliação do desempenho e eficácia de produtos farmacêuticos inovadores de aplicação oftálmica

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Tais Gratieri

BRASÍLIA – DF

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

BB229d Barbalho, Geisa Nasimento
Desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais para avaliação do desempenho e eficácia de produtos farmacêuticos inovadores de aplicação oftálmica. / Geisa Nasimento Barbalho; orientador Tais Gratieri. -- Brasília, 2023.
134 p.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2023.

1. Modelo dinâmico ex vivo. 2. Compartimento doador do modelo dinâmico ex vivo. 3. Modelo in vitro ``OphthalMimic``. 4. Membrana polimérica. 5. Membrana híbrida baseada em hidrogel. I. Gratieri, Tais , orient. II. Título.

Geisa Nascimento Barbalho

Título do trabalho: Desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais para avaliação do desempenho e eficácia de produtos farmacêuticos inovadores de aplicação oftálmica.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Tese aprovada em: 05/10/2023

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a. Taís Gratieri
Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília

Prof^a Dr^a. Pérola de Oliveira Magalhães
Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília

Prof Dr. Armando da Silva Cunha Júnior
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

Prof^a Dr^a. Stephânia Fleury Taveira
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás

Lute como uma cientista!
“autor desconhecido”

Dedicatória

À minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Tais Gratieri**, que idealizou, planejou e pensou em cada detalhe e acreditou em mim para desenvolvimento deste trabalho. Por estar junto a mim desde o primeiro projeto de iniciação científica e acompanhar toda minha trajetória. Por me dar conselhos, ouvir meus choros e desesperos nos momentos difíceis e compartilhar as alegrias de cada passo realizado. Obrigada por ser literalmente minha segunda mãe, uma inspiração de mulher e pesquisadora.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais, Gildson Silva Barbalho e Selimar da Cunha Nascimento e aos meus irmãos Caio, Victor, Aliucha e Breno, pelo apoio nos meus estudos, por acreditar nos meus sonhos e ter paciência para ajudar a realizá-los.

Aos meus tios Gilsomar Silva Barbalho (*in memoriam*) e Gilsivam da Silva Barbalho (*in memoriam*), por sempre terem orgulho de mim e me ensinarem que o melhor caminho são os estudos.

À toda família do Laboratório de Tecnologia, Medicamentos, Alimentos e Cosméticos - LTMAC que acaba se tornando nossa família e compartilhando muitos momentos dentro e fora do laboratório. Em especial aos meus amigos Breno Matos, Seila Tolentino e Rayssa Hellen que sempre me acompanharam nessa jornada.

Ao Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso por todo apoio durante meu tempo no LTMAC.

Ao Dr. Manuel Falcão, ao Dr. Venâncio Amaral, ao Dr. Jefferson Lopes por todo conhecimento compartilhado nesse trabalho e aos alunos Jonad Contarato e Júlia Martins que me auxiliaram nos experimentos.

A meu amigo Stefan Brugger, por me ajudar quando eu estava perdida em Auckland.

A minha amiga Aldina e meu amigo Janailton por sempre estarem comigo e proporcionar momentos de descanso e alegrias em nossas trilhas.

À Via Carnes por ceder os olhos de suíno utilizadas nos experimentos de penetração ocular.

À Profa. Dr^a. Ilva Ruphental, por me acolher no seu grupo de pesquisa Buchanan Ocular Therapeutics Unit (BOTU) na University of Auckland, pela orientação e cuidado comigo durante o período na Nova Zelândia.

À Dr^a Priyanka Argawal e Dr^a Yoshara Agban, por me auxiliarem e orientar nos experimentos no laboratório BOTU.

À Universidade de Brasília (UNB), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), pela oportunidade de aperfeiçoamento e continuidade nos estudos.

Às agências de fomento, Coordenação de Apoio a Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento durante o doutorado, que me deu a oportunidade de estar em Brasília e realizar este trabalho, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela oportunidade de aperfeiçoamento no doutorado sanduíche e a Fundação de Apoio a pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo financiamento deste projeto.

RESUMO

BARBALHO, G. **Desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais para avaliação do desempenho e eficácia de produtos farmacêuticos inovadores de aplicação oftálmica**. 2023. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade de Brasília, Brasília, 2023.

Modelos animais *in vivo* ou tecidos oculares excisados em modelos *in vitro* são atualmente utilizados na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos oftálmicos. No entanto, todos esses modelos apresentam limitações em simular condições fisiológicas naturais, seja pela falta de mecanismos de proteção dinâmica (como fluxo e drenagem lacrimal) ou pelas diferenças anatômicas em relação ao olho humano. O objetivo deste trabalho foi desenvolver modelos alternativos *ex vivo* e *in vitro* simulando as barreiras fisiológicas dinâmicas e físico-químicas a que estão submetidos os produtos farmacêuticos oftálmicos como forma de melhor avaliar seu desempenho. Para isso foram desenvolvidos dois modelos alternativos complementares: (i) o modelo *ex vivo* “dinâmico”, utilizando olho de porco inteiro e fluxo lacrimal simulado e (ii) o modelo “OphthalMimic”, completamente artificial para avaliação do desempenho de formulações. O primeiro modelo teve seu desenho otimizado de forma que no compartimento doador se atingisse um fluxo lacrimal simulado representativo da taxa de renovação fisiológica. Assim, para uma aplicação de 300 μL de formulação, considerou-se adequado um fluxo de fluido lacrimal simulado de 48 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante os primeiros 2 min + 33 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 13 min de experimento. O sistema foi desafiado pela análise de formulações de géis de poloxamer (PLX) com diferentes concentrações e diferentes propriedades mucoadesivas (adição de quitosana (CS) em diferentes proporções) contendo fluconazol 0,2%. Em uma segunda etapa foram avaliadas formulações inovadoras (lipossomas e nanoemulsão) utilizando curcumina 0,01%. O modelo dinâmico *ex vivo* desenvolvido foi capaz de diferenciar formulações que continham componente mucoadesivo (CS) em relação à quantidade de fármaco que penetrou a córnea ($p < 0,05$). O segundo modelo foi projetado e suas peças produzidas por impressão 3D. O sistema foi composto por uma bomba peristáltica, entrada e saída de fluxo lacrimal simulado, uma área de *cul-de-sac* e uma pálpebra móvel projetada para se mover entre 0° e 50° para replicar o movimento de piscagem através de uma base reutilizável contendo uma membrana, polimérica ou de hidrogel, simulando a superfície corneana. Os resultados evidenciaram a capacidade das membranas desenvolvidas e do próprio modelo, o “OphthalMimic” em diferenciar as formulações quanto a capacidade resistir aos mecanismos de drenagem ocular. O trabalho resultou, portanto, em dois modelos alternativos ao uso de animais promissores para avaliar o desempenho de produtos farmacêuticos tópicos oftálmicos. Além do potencial de redução do uso de animais em pesquisa, tais modelos representam novas ferramentas para a pesquisa e desenvolvimento de formulações farmacêuticas, na medida que são modelos de fácil implementação, baixo custo e alta reprodutibilidade.

Palavras-chaves: penetração ocular dinâmico *ex vivo*, OphthalMimic, tempo de residência, fluxo lacrimal simulado.

ABSTRACT

BARBALHO, G. **Development of alternative methods to the use of animals to evaluate the performance and efficacy of innovative pharmaceutical products for ophthalmic application.** 2023. Thesis (Doctoral) Faculty of Health Sciences - University of Brasília, Brasília, 2023.

In vivo animal models or ocular tissues excised in in vitro models are currently used in the research and development of ophthalmic drugs. However, all of these models have limitations in simulating natural physiological conditions, either due to the lack of dynamic protection mechanisms (such as tear flow and drainage) or due to anatomical differences in relation to the human eye. The objective of this work was to develop alternative ex vivo and in vitro models simulating the dynamic physiological and physicochemical barriers to which ophthalmic pharmaceutical products are subjected as a way of better evaluating their performance. For this, two complementary alternative models were developed: (i) the “dynamic” ex vivo model, using whole pig eye and simulated tear flow and (ii) the “OphthalMimic” model, completely artificial to evaluate the performance of formulations. The first model had its design optimized so that a simulated tear flow representative of the physiological renewal rate was achieved in the donor compartment. Thus, for an application of 300 μL of formulation, a simulated tear fluid flow of 48 $\mu\text{L}/\text{min}$ during the first 2 min + 33 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 13 min of the experiment was considered adequate. The system was challenged by the analysis of poloxamer (PLX) gel formulations with different concentrations and different mucoadhesive properties (addition of chitosan (CS) in different proportions) containing 0.2% fluconazole. In a second stage, innovative formulations (liposomes and nanoemulsion) using 0.01% curcumin were evaluated. The ex vivo dynamic model developed was able to differentiate formulations that contained a mucoadhesive component (CS) in relation to the amount of drug that penetrated the cornea ($p < 0.05$). The second model was designed and its parts were produced by 3D printing. The system was comprised of a peristaltic pump, simulated tear flow inlet and outlet, a cul-de-sac area and a movable eyelid designed to move between 0° and 50° to replicate the blinking movement via a reusable base. containing a polymeric or hydrogel membrane, simulating the corneal surface. The results highlighted the ability of the developed membranes and the model itself, the “Ophthalmimic”, to differentiate formulations in terms of their ability to resist ocular drainage mechanisms. The work has therefore resulted in two promising alternative animal models for evaluating the performance of ophthalmic topical pharmaceuticals. In addition to the potential to reduce the use of animals in research, such models represent new tools for the research and development of pharmaceutical formulations, as they are models that are easy to implement, low cost and highly reproducible.

Keywords: OphthalMimic, ex vivo ocular penetration, residence time, simulated lacrimal flow.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia externa e interna do globo ocular. Imagem Adaptada de Estlack et al., (2017).....	24
Figura 2. A) Esquema da direção do fluxo lacrimal e B) Camadas do fluido lacrimal. Imagem adaptada de Estlack et al., (2017).	26
Figura 3. Esquema representativo das camadas da córnea e filme lacrimal. Imagem Adaptada de Estlack et al., (2017).....	28
Figura 4. Total de procedimentos científicos por tipo no período de 2010 a 2019. Pesquisa realizada em: Annual Statistics of Scientific Procedures on Living Animals, Great Britain 2019, Table 1.2. And Annual Statistics of Scientific Procedures on Living Animals, Great Britain 2017, Table 1. Acesso em: 02/08/2022.	33
Figura 5. Representação esquemática do design do modelo dinâmico.	39
Figura 6. Esquema de dissecação da córnea e montagem das células de difusão do tipo Franz modificada para o ensaio de permeação ocular <i>ex vivo</i> . A) Parte interna da córnea com a íris; B) Parte interna da córnea sem a íris; C) Parte frontal da córnea com as laterais replicadas; D) Vista superior da célula de difusão apresentando a córnea ao centro do compartimento doador; E) Células de difusão montadas; F) Córnea excisada pronta para o processo de extração.	43
Figura 7. Modelos de penetração. A) Modelo de penetração ocular com fluxo e B) Modelo de penetração ocular sem fluxo, C) Amostras de pálpebra, córnea e conjuntivas coletadas para análises.	45
Figura 8. Esquema representativo de tecidos de córnea, conjuntiva e pálpebra excisadas e secções representativas para cada imagem capturadas em microscópio de fluorescência.....	46
Figura 9. Representação esquemática das partes constituintes do modelo OphthalMimic: (a) área exposta; (b) área simulada de <i>cul-de-sac</i> ; (c) entrada para fluxo lacrimal aquoso simulado; (d) entrada para fluxo de lacrimal lipídico simulado; (e) porta de drenagem; (f) sonda usada para stress mecânico; (g) membrana polimérica com mucina e (h) plataforma de suporte.	47
Figura 10. Representação esquemática do modelo OphthalMimic montado com uma bomba de perfusão e um sistema de engrenagem para mover a plataforma como um balanço de maneira a produzir movimento horizontal da sonda móvel em cima da	

superfície exposta (i), simulando a piscagem. A tampa de fechamento é aderida à plataforma de suporte usando grampos personalizados (j).....	48
Figura 11. Esquema representativo da síntese das membranas poliméricas contendo mucina.	49
Figura 12. Esquema representativo do teste de propriedade mecânica realizado em texturômetro (Stable Micro Systems TA-XT Plus) com as membranas poliméricas contendo mucina.....	51
Figura 13. Teste adaptado de intumescimento por contato das membranas poliméricas utilizando célula de difusão de Franz.	52
Figura 14. Reação da síntese de gelatina tipo A metacrilato. Imagens adaptadas de Duffy; David; Crouzier, (2015); Nichol et al., (2011).	52
Figura 15. Reação da síntese de Mucina tipo II metacrilato. Imagens adaptadas de Duffy; David; Crouzier, (2015); Nichol et al., (2011).	53
Figura 16. Esquema da composição das membranas híbridas baseadas em hidrogel de três camadas.	54
Figura 17. Esquema representativo dos parâmetros característicos do meio doador para fixação ocular no modelo dinâmico <i>ex vivo</i> de penetração ocular indicando as dimensões alteradas. Imagem adaptada de Barbalho et al., (2023).	57
Figura 18. Imagens das versões dos compartimentos doadores fabricadas em vidro. Imagem adaptada de Barbalho et al., (2023).	58
Figura 19. Imagem do compartimento doador, fabricado via impressão 3D.	60
Figura 20. Simulação matemática da evolução temporal do percentual de volume disponível no meio doador em função da depuração empregada. Fluxos lacrimais de 33 μ L/ min, 48 μ L/min e da combinação de ambos são representados em verde, vermelho e azul, respectivamente. Imagem adaptada de Barbalho et al., (2023).....	62
Figura 21. Dissecção ocular. A) Globo ocular com pálpebras. B) remoção das pálpebras do globo ocular. C) Globo ocular limpo, pronto para o experimento.....	65
Figura 22. Montagem da base de encaixe dos globos oculares. D) placa de 12 poços posicionada junto ao suporte 3D inferior. E) e F) Posicionamento do globo ocular. G) Quadruplicata de globo ocular posicionada na placa.	65
Figura 23. Montagem superior do modelo dinâmico. H) Graxa de silicone passada nas laterais do meio doador para evitar vazamento da formulação. I) Meios doadores fixados aos globos oculares. J) Fechamento do sistema com a tampa superior	

impressa em 3D. K) Montagem do modelo finalizada para acoplar as mangueiras de fluxo.	66
Figura 24. L) Modelo mostrando as córneas expostas. M) Mangueiras de fluxo acopladas a entrada do meio doador. N) Modelo dinâmico completamente montado: à esquerda os meios doadores e receptores fixados, ao centro a bomba peristáltica e à direita um béquer contendo a solução lacrimal.	66
Figura 25. O) Retirada do Globo ocular após o teste. P) Lavagem do Globo ocular inteiro com água ultrapura para retirada do excesso de formulação. Q) Perfuração do globo ocular com bisturi. R) Remoção da córnea. S) Lavagem da córnea após remoção. T) Córnea excisa pronta para o processo de extração do fármaco.....	67
Figura 26. Esquema operacional do modelo dinâmico destacando a condição de operação.	69
Figura 27. Resultados do ensaio de permeação do FLU em diferentes formulações de PLX e PLX contendo QS nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,25%. A) Resultados de penetração do FLU em córnea no modelo ESTÁTICO <i>ex vivo</i> por 15 min. B) Resultados de penetração do FLU em córnea sob ação de FLUXO LACRIMAL seguindo a 3ª condição do modelo (2 minutos sob depuração de 16 %/min + 13 minutos sob depuração de 11%/min). Imagem adaptada de Barbalho et al., (2023).	70
Figura 28. Formulação de lipossomas (LP-CUR) contendo curcumina.....	72
Figura 29. Formulação de nanoemulsão (NANE - CUR) contendo curcumina.....	72
Figura 30. Solução oleosa (MCT - CUR) contendo curcumina.....	73
Figura 31. Resultado representativo das imagens capturadas por microscopia de fluorescência da penetração de CUR no epitélio corneano no modelo de penetração de olho inteiro dinâmico (com fluxo) e no modelo estático (sem fluxo), na região central da córnea através das formulações MCT-CUR, LP-CUR, NANE. A posição das imagens está representada dos números de 1-5.	74
Figura 32. Resultado representativo das imagens capturadas por microscopia de fluorescência da penetração de CUR no epitélio corneano no modelo de penetração de olho inteiro dinâmico (com fluxo) e no modelo estático (sem fluxo), na região lateral da córnea através das formulações MCT-CUR, LP-CUR, NANE. A posição das imagens está representada dos números de 1-5.	77
Figura 33. Resultado representativo das imagens capturadas por microscopia de fluorescência da penetração de CUR no modelo de penetração de olho inteiro	

<p>dinâmico (com fluxo) e no modelo estático (sem fluxo), na conjuntiva através das formulações MCT-CUR, LP-CUR, NANE. A posição das imagens está representada dos números de 1-5.....</p> <p>Figura 34. Resultado representativo das imagens capturadas por microscopia de fluorescência da penetração de CUR no modelo de penetração de olho inteiro dinâmico (com fluxo) e no modelo estático (sem fluxo), na pálpebra através das formulações MCT-CUR, LP-CUR, NANE. A posição das imagens está representada dos números de 1-5.....</p> <p>Figura 35. Resultados de intensidade de fluorescência de penetração da CUR. Comparações realizadas entre influência do modelo (dinâmico e estático), formulações (MCT-CUR, LP-CUR e NANE-CUR) e tecidos (córnea, conjuntiva e pálpebra). As comparações estatísticas foram realizadas entre os tecidos e por modelo, sendo em cinza claro estatística referentes ao modelo estático e cinza escuro estatística referente ao modelo dinâmico.</p> <p>Figura 36. Resultados do ensaio de penetração de curcumina por profundidade das diferentes formulações LP-CUR, NANE-CUR e MCT-CUR em córnea suína no modelo estático de olho inteiro e no modelo dinâmico ex vivo por 15 min.....</p> <p>Figura 37. Imagem do dispositivo OphthalMimic da patente BR 10 2022009997 para avaliação do desempenho de formulações oftálmicas impresso em 3D indicando as seguintes partes correspondentes. Em (B), ao centro: área exposta (1); área simulada de <i>cul-de-sac</i> (2); entrada para fluxo lacrimal aquoso simulado (3); entrada para fluxo de lacrimal lipídico simulado (4) e porta de drenagem (5). Em (C), a direita: sonda usada para stress mecânico (6) e, em (A) a esquerda: plataforma de suporte (8). ..</p> <p>Figura 38. Foto do dispositivo OphthalMimic da patente BR 10 2022 00999 7 para avaliação do desempenho de formulações oftálmicas impresso em 3D acoplado a uma bomba de peristáltica e um sistema de engrenagem (9) para mover a plataforma. A tampa de fechamento é aderida à plataforma de suporte usando grampos apropriados (10).....</p> <p>Figura 39. Imagens do modelo OphthalMimic em testes iniciais demonstrando o surgimento de caminhos preferenciais.</p> <p>Figura 40. Imagens demonstrando a modificação do dispositivo OphthalMimic.</p> <p>Figura 41. Imagens do dispositivo OphthalMimic impresso em 3D com material ABS, e devidas modificações para 2 versão. A) base do dispositivo que acopla a membrana polimérica. B) Parte superior com simulação da bolsa de <i>cul-de sac</i>, entrada de fluxo</p>	<p>79</p> <p>82</p> <p>83</p> <p>84</p> <p>86</p> <p>86</p> <p>87</p> <p>89</p> <p></p>
--	---

lacrimar (lateral superior direita) e saída de fluxo lacrimal simulado na região central do dispositivo. C) Dispositivo com montagem completa.....	89
Figura 42. Imagem das membranas após a secagem com as composições apresentados na tabela 5.	92
Figura 43. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier dos componentes isolados e das membranas após a secagem.	93
Figura 44. Calorimetria diferencial exploratória dos componentes da membrana isoladas e das membranas completas.....	95
Figura 45. Análise termogravimétrica dos componentes da membrana isoladas e das membranas completas.....	97
Figura 46. Percentual de intumescimento das membranas poliméricas M1, M2 e M3.	101
Figura 47. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da córnea região superior superficial e da membrana híbrida na região superior. A) Córnea superior no aumento de 10 μm B) Córnea superior no aumento de 1 μm C) Membrana polimérica região superior no aumento de 10 μm D) Membrana polimérica região superior no aumento de 1 μm	102
Figura 48. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da córnea transversal e da membrana híbrida transversal. A) Córnea transversal no aumento de 10 μm B) Córnea transversal no aumento de 1 μm C) Membrana polimérica transversal no aumento de 10 μm D) Membrana polimérica transversal no aumento de 1 μm	103
Figura 49. Porcentagem de FLU drenado no modelo OphthalMimic a partir das formulações de PLX16% e PLX16QS1,0%. A) Formulações testadas na membrana 1. B) Formulações testadas na membrana 2. C) Formulações testadas na membrana 3. As diferenças estatísticas foram verificadas pelo teste <i>t-test</i> . * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$	105
Figura 50. Imagens demonstrando as melhorias na segunda modificação do modelo OphthalMimic.	106
Figura 51. Imagens demonstrando as melhorias na segunda modificação do modelo OphthalMimic completo.	107
Figura 52. Imagem passo-a-passo da montagem das membranas híbridas baseadas em hidrogel na base do modelo OphthalMimic. A) A saída de fluxo lacrimal simulado é vedada com uma fita. B) Adição da gelatina metacrilato. C) Formação da primeira camada base da membrana. D) Fotopolimerização opôs a adição de cada camada. E)	

Adição da mucina metacrilato. F) Movimento da base para mistura das camadas. G) Adição da camada de fosfolípido. H) Armazenamento das membranas em placa de petri para ser submetida ao tempo de cura por 3 dias.	108
Figura 53. Imagem da membrana híbrida baseada em hidrogel de três camadas.	109
Figura 54. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier dos componentes isolados e da membrana híbrida baseada em hidrogel completa.	110
Figura 55. Calorimetria diferencial exploratória dos componentes isolados e das membranas híbridas baseada em hidrogel completa.	112
Figura 56. Análise termogravimétrica dos componentes isolados e das membranas híbridas baseadas em hidrogel completa.	114
Figura 57. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da córnea região superior superficial e da membrana híbrida na região superior. A) Córnea região superior no aumento de 10 μm B) Córnea região superior no aumento de 1 μm C) Membrana híbrida região superior no aumento de 1 μm C) Membrana híbrida região superior no aumento de 10 μm D) Membrana híbrida região superior transversal no aumento de 1 μm	115
Figura 58. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da córnea transversal e da membrana híbrida transversal. A) córnea transversal no aumento de 10 μm B) córnea transversal no aumento de 1 μm C) Membrana híbrida transversal no aumento de 10 μm D) Membrana híbrida transversal no aumento de 1 μm	116
Figura 59. Modelo OphthalMimic modificado com a pálpebra simulada em movimentação, vídeo do dispositivo em funcionamento disponível no QRcode.	117
Figura 60. Resultados de porcentagem de FLU drenado no modelo OphthalMimic comparando sete formulações distintas contendo solução aquosa de FLU 0,2%: PLX14; PLX16; PLX20; PLX16QS0,5%; PLX16QS1,0%; PLX16QS1,25%.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das formulações biocompatíveis contendo FLU.....	41
Tabela 2. Parâmetros de fluxo e geométricos avaliados nas versões testadas do compartimento doador.....	59
Tabela 3. Volume percentual disponível no compartimento doador no modelo dinâmico de penetração ocular previsto matematicamente em função das condições de depuração adotadas.....	63
Tabela 4. Composição das membranas poliméricas.....	91
Tabela 5. Composição em porcentagem das membranas poliméricas selecionadas, variando as concentrações de mucina e poloxamer.....	91
Tabela 6. Condições de secagem das membranas em estufa com ventilação.....	92
Tabela 7. Propriedades mecânicas das membranas poliméricas, M1, M2 e M3.....	99

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Descrição matemática dos efeitos da depuração do sistema.

Equação 2. Percentual de deformação das membranas quanto a propriedades mecânicas.

Equação 3. Percentual do grau de intumescimento das membranas poliméricas.

Equação 4. Percentual do conteúdo de água na membrana híbrida baseada em hidrogel.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CUR	Curcumina
FLU	Fluconazol
PLX	Poloxamer 407®
QS	Quitosana
PVA	Poly (vinyl alcohol)
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
TGA	Análise termogravimétrica
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)1-piperazinil] -etanosulfônico
(m/m)	Massa/ Massa
(m/v)	Massa/ Volume
(v/v)	Volume/ Volume
LP- CUR	Lipossomas contendo curcumina
MCT-CUR	Solução oleosa de Triglicerídeo Caprílico contendo curcumina
NANE-CUR	Nanoemulsão não aquosa contendo curcumina
PLX16QS0,5%	Poloxamer 16% + Quitosana 0,5% contendo fluconazol 0,2%
PLX16QS1,0%	Poloxamer 16% + Quitosana 1,0% contendo fluconazol 0,2%
PLX16QS1,25%	Poloxamer 16% + Quitosana 1,25% contendo fluconazol 0,2%
PLX 14	Poloxamer 14 % contendo fluconazol 0,2%
PLX 16	Poloxamer 16 % contendo fluconazol 0,2%
PLX 20	Poloxamer 20 % contendo fluconazol 0,2%
LTMAC	Laboratório de Tecnologia, Medicamentos, Alimentos e Cosméticos
BOTU	Buchanan Ocular Therapeutics Unit
OphthalMimic	Modelo <i>in vitro</i> para avaliação do desempenho de formulações oftálmicas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1. Anatomia ocular	23
2.1.2. Filme lacrimal e o seu impacto na administração ocular de fármacos	25
2.1.3. Córnea	27
2.2 Epidemiologia das doenças oculares	28
2.1 Administração ocular de fármacos.....	28
2.3 Métodos alternativos.....	31
3. OBJETIVO GERAL	36
3.1. Objetivos específicos	36
3.1.1. Parte 1: Modelo dinâmico	36
3.1.2. Parte 2: Modelo “OphthalMimic”	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. Material	38
4.1.1. Obtenção de córneas suínas e bovinas.....	38
4.2. Métodos	39
4.2.1. Parte 1: Concepção do compartimento doador do modelo dinâmico <i>ex vivo</i> ..	39
4.4.2. Descrição matemática dos efeitos da depuração do sistema.....	39
4.4.3. Determinação do fluxo simulado na bomba peristáltica	40
4.2.4. Fármacos modelos	40
4.2.4.2. Preparo das formulações contendo fluconazol.....	41
4.2.4.3. Preparo das formulações contendo curcumina	41
4.2.4.3.1. Lipossomas.....	42
4.2.4.3.2. Nanoemulsão não aquosa baseada em solventes alcano semifluoranato contendo curcumina.....	42
4.2.4.3.3. Solução Oleosa.....	42
4.4.3. Ensaio de penetração estática <i>ex vivo</i> em córnea suína.....	42
4.5. Estudo de penetração dinâmico <i>ex vivo</i> em córnea suína	43
3.2.1. Estudo de penetração ocular de curcumina em modelos de olho inteiro <i>ex vivo</i> com e sem fluxo lacrimal simulado	44
3.2.2. Preparo das amostras para análise por microscopia de fluorescência	45
4.5. Parte 2: Concepção do modelo conceitual <i>in vitro</i> para simulação do fluxo lacrimal e movimento de piscagem - “OphthalMimic”	47
4.6. Desenvolvimento de uma membrana polimérica contendo mucina dispersa.....	48

4.6.1. Caracterização das membranas poliméricas.....	49
4.6.1.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR.....	49
4.6.1.3. Calorimetria exploratória diferencial – DSC.....	49
4.6.1.4. Análise termogravimétrica – TGA.....	49
4.9.1.5. Propriedades mecânicas	50
4.6.1.6. Eficiência de intumescimento	51
4.7. Síntese de membranas híbridas baseadas em hidrogel contendo mucina dispersa	52
4.7.1. Síntese de Gelatina Metacrilato.....	52
4.7.2. Síntese de Mucina Metacrilato.....	52
4.7.4. Caracterização das Membranas Híbridas Baseadas em Hidrogel	54
4.7.4.1. Caracterização das membranas híbridas baseadas em hidrogel quanto ao conteúdo de água	54
Onde mu é a massa do hidrogel úmido e ms a massa do hidrogel seco. O experimento foi realizado em triplicata.	54
4.7.4.1. Análise morfológica das Membranas.....	55
4.7.5. Prova de conceito para avaliação do modelo OphthalMimic.....	55
4.8. Análises estatísticas	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
Parte 1.	56
5.1. Concepção do compartimento doador no modelo dinâmico.....	56
5.2. Descrição matemática dos efeitos da depuração do sistema.....	61
5.3. Fixação dos globos oculares e montagem do modelo <i>dinâmico</i> (passo a passo)	64
5.4. Estabelecimento das condições de operação do modelo dinâmico de penetração ocular	68
5.5. Estudos de penetração com formulações contendo fármaco modelo (FLU).....	69
5.6. Formulações contendo curcumina.....	71
5.6.1 Lipossomas.....	71
5.6.2 Nanoemulsão não aquosa baseada em solventes Alcanos Semifluoratos ..	72
5.6.3 Solução oleosa	72
5.7.1 Penetração ocular <i>ex vivo</i> de curcumina na região central e lateral da córnea nos modelos dinâmico e estático.....	73
5.7.2 Penetração <i>ex vivo</i> de curcumina na conjuntiva nos modelos dinâmico e estático.....	78
5.7.3 Penetração <i>ex vivo</i> de curcumina na pálpebra nos modelos dinâmico e estático	81
5.7 Parte 2: Modelo OphthalMimic.....	85
5.7.1 Desenvolvimento e montagem do modelo <i>in vitro</i> OphthalMimic.....	85

5.8 Testes exploratórios do modelo OPHTHALMIMIC	87
5.9 Otimização de design do modelo OphthalMimic.....	88
5.10. Síntese de uma membrana polimérica contendo mucina dispersa	90
5.11. Caracterização das membranas poliméricas	93
5.11.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR.....	93
5.11.2. Calorimetria diferencial exploratória – DSC.....	95
5.11.4. Análise termogravimétrica – TGA	97
5.11.5. Propriedades mecânicas	99
5.11.5. Intumescimento.....	100
5.8.12.4 Análise de morfologia da membrana polimérica.....	102
5.11.6. Desafio das membranas poliméricas no modelo <i>in vitro</i> OphthalMimic	103
5.11.7. Otimização do modelo “OphthalMimic”	106
5.8.11. Desenvolvimento das membranas híbridas baseada em hidrogel.	107
5.8.12. Caracterização das membranas híbridas baseada em hidrogel.....	110
5.8.12.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR.	110
5.8.12.2. Calorimetria exploratória diferencial – DSC.....	112
5.8.12.3. Análise termogravimétrica – TGA	113
5.8.12.3 Análise do conteúdo de água da membrana híbrida baseada em hidrogel	115
5.8.12.4 Análise de morfologia da membrana híbrida baseada em hidrogel.....	115
5.8.13. Montagem do protótipo com as membranas híbridas em hidrogel e realização dos testes desafios formulações.....	116
6. Resumo dos Resultados.....	119
Parte 1: Modelo dinâmico	119
Parte 2: Modelo “OphthalMimic”	120
7. CONCLUSÃO	122
8. Outras considerações.....	123
8.1. Produtos indiretos do trabalho.....	124
8. REFERÊNCIAS	125

1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios atuais, ainda pouco abordado, e mais importante, ainda pouco incentivado, é a substituição dos modelos animais nas etapas de pesquisa, desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos. Esforços nesse sentido são urgentemente necessários, principalmente considerando que métodos *in vitro*, além de pouparem os animais, podem fornecer resultados confiáveis e reprodutíveis, de maneira mais prática e com menor custo.

É notório o surgimento de alternativas à experimentação animal na última década. Diversas dessas “Novas Abordagens Metodológicas” (NAMs) são inclusive validadas e previstas na regulação de diversos produtos farmacêuticos, principalmente cosméticos. No entanto, a quase totalidade dessas metodologias estão voltadas à avaliação de segurança dos produtos farmacêuticos e cosméticos.

Para que o cenário seja revertido e metodologias alternativas ultrapassem a academia e se tornem uma realidade também no setor produtivo, é de extrema importância que métodos alternativos ao uso de animais sejam aplicados também para avaliação de desempenho e eficácia de produtos farmacêuticos. Para que isso ocorra, logicamente, métodos alternativos devem de fato ter sua aplicabilidade e até sua superioridade em relação aos modelos animais comprovada na avaliação de produtos farmacêuticos.

Dentre as diversas áreas da tecnologia farmacêutica, os estudos de pesquisa e desenvolvimento de formulações oftálmicas utilizam, particularmente, um número muito elevado de animais de experimentação (DÍAZ et al., 2020; KIANI et al., 2022). Isso ocorre devido às dificuldades em realizar múltiplas amostragens em um mesmo animal durante a experimentação e também em simular *in vitro* os múltiplos fatores que afetam a eficácia de formulações oftálmicas, como exemplo, os modelos de estudos de liberação de fármacos, que apresentam limitações em simular as condições fisiológicas naturais, seja pela falta de mecanismos de proteção dinâmica (como fluxo e drenagem lacrimal) ou pelas diferenças anatômicas em relação ao olho humano. Além disso, enfrenta-se uma grande dificuldade na obtenção de olhos de animais (membranas *ex vivo*) durante o processo de abate.

Dessa forma, este trabalho apresenta duas propostas complementares de métodos alternativos ao uso de animais para a avaliação do desempenho de formulações oftálmicas durante as etapas de pesquisa e desenvolvimento. O modelo

(i) *ex vivo* “dinâmico”, utilizando olho de porco inteiro e fluxo lacrimal simulado e (ii) o modelo “OphthalMimic”, completamente artificial, sem tecido animal, contendo uma pálpebra móvel para a avaliação de desempenho de formulações quanto a capacidade de resistir aos mecanismos de drenagem ocular.

O racional por trás dessas propostas é que formulações com características inovadoras podem ter seus desempenhos desafiados, a fim de confirmar que tais propriedades que se supõem inovadoras de fato irão se traduzir em desempenhos desejados, permitindo a seleção das melhores formulações. Tal “*screening*” de formulações, que pode ser utilizado tanto durante o desenvolvimento dos produtos, quanto para comprovações de desempenho e eficácia para fins regulatórios, como testes de dissolução, que possuem potencial de diminuir drasticamente o número de animais utilizados em pesquisa.

Logicamente, trata-se de um processo complexo constituído por múltiplas etapas. Além disso, a perspectiva apresentada aqui é de que tais métodos possam ser refinados de modo a substituir o uso de animais durante o desenvolvimento de produtos farmacêuticos inovadores de aplicação oftálmica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Anatomia ocular

O olho é um órgão sofisticado, considerado um dos mais importantes do nosso corpo, vital para o sentido da visão. O olho é cercado por uma órbita protetora óssea que fornece proteção, medindo cerca de 22 a 27 mm no diâmetro posterior e 69 a 85 mm em sua circunferência (Kels; Grzybowski; Grant-kels, 2015). Devido a sua sensibilidade e exposição, o olho possui diversos mecanismos de defesa altamente eficientes (Gaudana et al., 2010).

Externamente, o olho é composto pelas pálpebras e por seis músculos extraoculares que auxiliam no movimento dos olhos (o músculo reto superior, o músculo reto inferior, o músculo reto medial, o músculo reto lateral, o músculo oblíquo superior e o músculo oblíquo inferior). Os quatro músculos retos medem cerca de 40 mm de comprimento e 10 mm de largura. Além disso, os músculos ciliares se contraem e dilatam para ajustar a potência da lente a focar os objetos (Abdelbary; Amin; Zakaria, 2017; Fangueiro et al., 2016; Mohammadi, 2016).

O espaço entre as pálpebras é chamado de “fissura” ou “abertura ocular”. As fibras do músculo orbicular formam um anel ao redor da abertura palpebral e sua contração leva ao seu fechamento.

A abertura palpebral é controlada principalmente pelo músculo elevador da pálpebra superior, embora ainda existam túnicas fibrosas que agem na retração da pálpebra inferior. O músculo elevador se origina no ápice da órbita, percorre anteriormente sobre o músculo reto superior e se insere na placa tarsal e na pele da pálpebra superior. As pálpebras são firmemente aderidas às margens da órbita pelos ligamentos palpebrais medial e lateral, possibilitando o movimento de piscar que distribui a lágrima através da córnea, mantendo uma superfície lisa e atuando como um importante fator de proteção e remoção tanto de substâncias exógenas, quanto para formulações oculares (Ludwig, 2005).

O globo ocular é composto por três camadas principais. No segmento anterior, encontramos a camada de suporte mais externa do olho, que é composta pela córnea transparente, a esclera e a úvea, que representa a camada vascular central do olho e engloba estruturas essenciais como a íris, o corpo ciliar e a coroide.

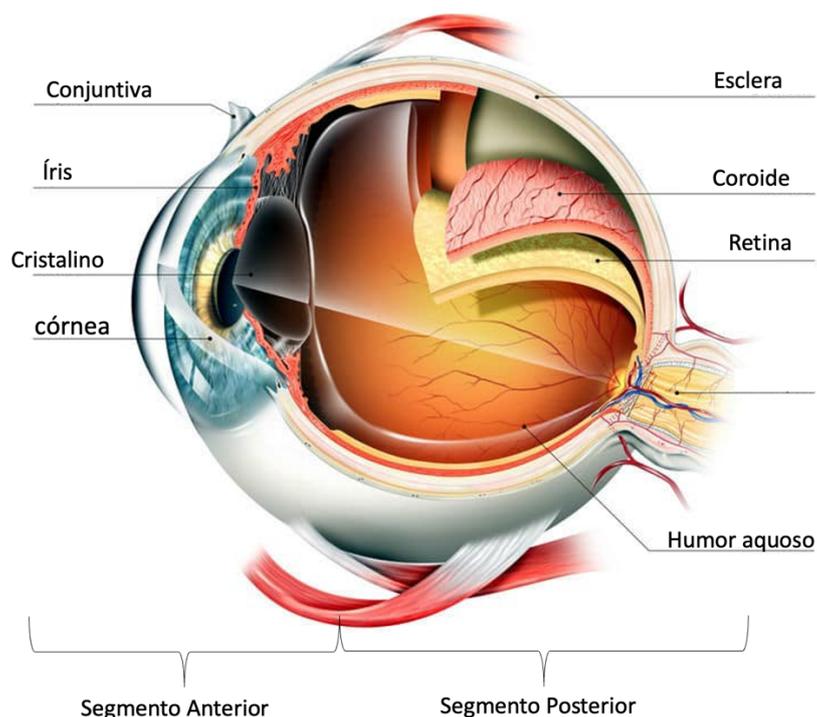


Figura 1. Anatomia externa e interna do globo ocular. Imagem Adaptada de Estlack et al., (2017).

No segmento posterior estão localizados o humor aquoso e o humor vítreo. O humor aquoso é um líquido produzido pelo corpo ciliar por ultra filtração e por secreções ativas estritamente reguladas para excluir proteínas de alto peso molecular e células. O humor aquoso contém glicose, oxigênio e aminoácidos para suprir a córnea e o cristalino, preenchendo as câmaras anterior (espaço entre a córnea e a íris) e posterior do olho (localizada atrás da íris e anteriormente ao cristalino (Miesfeld; Brown, 2019)). O humor vítreo, por sua vez, ajuda no amortecimento do globo ocular e é composto de 99% de água, mas também contém fibras de colágeno e de ácido hialurônico, promovendo coesão e uma consistência gelatinosa. Com o avançar da idade, o vítreo sofre uma progressiva degeneração, sendo aderido à retina em certos pontos (Miesfeld; Brown, 2019).

Na extremidade do globo ocular se encontra o nervo óptico, formado por cerca de um milhão de axônios das células ganglionares presentes na camada de fibras nervosas da retina. Esses axônios tornam-se mielinizados e o nervo óptico é revestido pelo fluido cérebro-espinhal do espaço subaracnóideo, sendo protegido por uma

bainha contínua com as meninges cerebrais, o que permite o transporte de informações até o sistema nervoso.

2.1.2. Filme lacrimal e o seu impacto na administração ocular de fármacos

O filme lacrimal compõe a primeira barreira fisiológica a ser vencida na administração ocular de fármacos. Com espessura de $5,1 \pm 0,5 \mu\text{m}$ (Schmoll et al., 2012), juntamente com as células do epitélio corneano interage com o ambiente externo. É dividida em 3 camadas distintas: (i) uma camada lipídica externa produzida pelas glândulas meibomianas nas pálpebras, (ii) a camada aquosa produzida pelas glândulas lacrimais contendo lisozimas e várias proteínas (Hodges; Dartt, 2013) e (iii) a camada mucosa interna produzida por células caliciformes no epitélio da conjuntiva que contêm glicoproteínas.

A camada lipídica (i) do filme lacrimal é composta por ácidos graxos livres, esteroides e fosfolipídios, originada principalmente pelas glândulas meibomiana e de Zeiss, que ajudam a reduzir a taxa de evaporação do fluido lacrimal, permitindo a manutenção de sua osmolaridade (Delmonte; Kim, 2011). Uma larga porção do filme lacrimal é ocupada por uma camada intermediária (ii), composta principalmente por água, eletrólitos e proteínas (inclusive imunoglobulinas e defensivas) produzidas pelas glândulas lacrimais. E a camada mucosa (iii), viscosa e altamente hidrofílica, que atua na proteção física e na facilitação do espalhamento do filme lacrimal ao longo da superfície ocular.

Outra parte importante para o componente lacrimal basal é a conjuntiva, uma membrana mucosa fina e vascularizada que cobre o globo anterior e a superfície interna das pálpebras. Este é outro fator que influencia na liberação de fármacos, pois é a primeira barreira de via não corneana para a permeação de fármacos de aplicação tópica (Ruponen; Urtti, 2015). As camadas conjuntivais são ricas em células epiteliais e caliciformes que produzem mucina, a qual é distribuída na camada do filme lacrimal. A mucina, uma glicoproteína produzida pelas células de goblet, determina muitas das propriedades reológicas do filme lacrimal devido a sua capacidade de mucoadesão (Hodges; Dartt, 2013).

As lágrimas são secretadas pelas glândulas lacrimais acessórias para proteger e lubrificar os olhos. O pH das lágrimas é cerca de 7,4 (Yamaguchi et al., 2009),

portanto, as preparações oftálmicas são geralmente ajustadas para o pH na faixa de 6,6 a 7,8.

Devido à produção permanente das lágrimas, o tempo de contato do fármaco com os tecidos da superfície ocular é relativamente curto, de aproximadamente 2 a 5 minutos (Estlack et al., 2017). Isso faz com que formas convencionais de medicamentos sejam rapidamente eliminados pelo ducto nasolacrimal e absorvidos pela circulação sistêmica, reduzindo o efeito local (Agrahari et al., 2016; Sánchez-López et al., 2017).

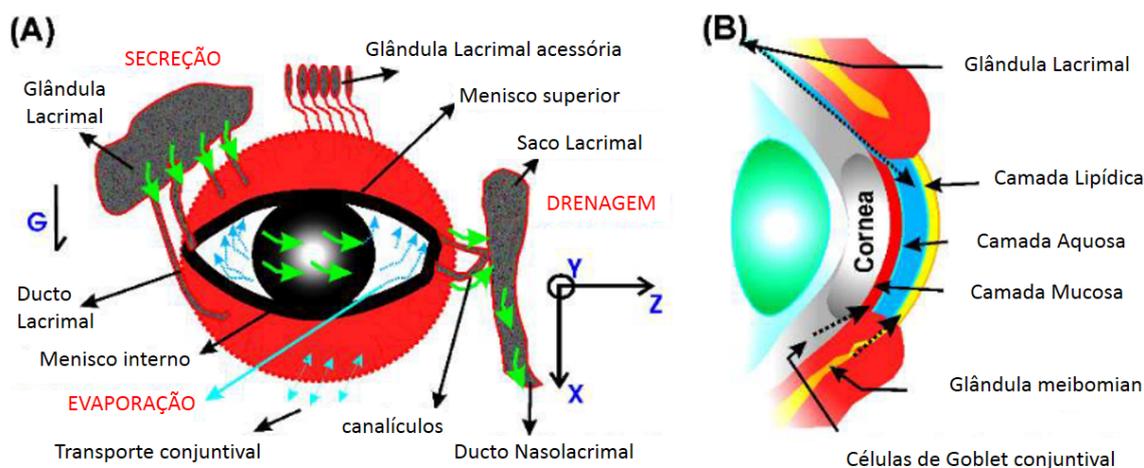


Figura 2. A) Esquema da direção do fluxo lacrimal e B) Camadas do fluido lacrimal. Imagem adaptada de Estlack et al., (2017).

A drenagem é um mecanismo de proteção natural que permite sempre manter o volume de líquido pré-corneano em torno de 7 a 10 μL (Agrahari et al., 2016; Bachu et al., 2018). Esse mecanismo pode variar dependendo da idade, chegando a 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ para 16 anos e 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ para indivíduos com idade superior a 50 anos (Mishima; Gasset; Klyce, 1966). Esse processo é afetado pela renovação constante do fluido lacrimal de aproximadamente 11-16% de depuração por minuto, comportando um volume máximo de 30 μL sem extravasamento (Estlack et al., 2017; Mishima; Gasset; Klyce, 1966) e resultando em valores de biodisponibilidade entre 1 a 5% do medicamento aplicado (Mazet et al., 2020).

Portanto, os medicamentos instilados topicamente costumam necessitar de aplicações frequentes e altas concentrações de ativo, o que pode resultar em reações adversas causadas pela absorção sistêmica (Awwad et al., 2017; Paulsamy et al., 2018).

2.1.3. Córnea

A córnea é uma via importante de absorção e um alvo para a entrega de fármacos aplicados topicamente. A estrutura da córnea é dividida em cinco camadas: (i) o Epitélio, (ii) a Camada de Bowmans, (iii) o Estroma, (iv) a Membrana descendente e (v) o Endotélio (Reinstein et al., 2009; Schmoll et al., 2012).

A primeira camada da córnea em contato com o meio externo é o epitélio, que mede $5,8 \pm 3,3 \mu\text{m}$ de espessura (Du et al., 2012). É constituído por epitélio escamoso estratificado não queratinizado, derivado do ectoderma superficial entre quinta e sexta semana da gestação. Sua característica lipofílica contribui como barreira, principalmente para fármacos hidrofílicos. Além disso, as *tight junction* do epitélio corneano atuam como uma barreira limitante para a permeação de fármacos (Balasopoulou et al., 2017; Bennet et al., 2018).

Uma fina camada de $18,7 \pm 2,5 \mu\text{m}$ localizada entre o epitélio e o estroma (Beer, Wartak, Pircher, 2018), denominada de camada de bowmans, ajuda a manter a forma da córnea através da condensação de fibras de colágeno tipo I e V, juntamente com proteoglicanos (Estlack et al., 2017). Essa camada é acelular e ordenada, porém, não tem habilidade regeneração, dificultando a sua recuperação em casos de danos físicos.

Logo após a camada de bowmans, localiza-se o estroma, a porção mais espessa da córnea, com cerca de 465 a 500 μm (Reinstein, et al., 2009). Essa camada apresenta característica hidrofílica devido a presença de fibrilas de colágeno, empacotadas em lamelas paralelas, e a uma matriz extracelular composta principalmente de água, além de sais inorgânicos, proteoglicanos e glicoproteínas produzidas pelos queratócitos. O Estroma evita a difusão de agentes mais lipofílicos, representando um fator limitante à absorção ocular (Delmonte; Kim, 2011; Estlack et al., 2017).

A Membrana descendente é a membrana basal do endotélio da córnea, com uma espessura de 10,1 μm , formada por fibrilas de colágeno que desempenham um papel importante no componente aquoso da córnea (Agrahari et al., 2016; Delmonte; Kim, 2011; Eghrari; Riazuddin; Gottsch, 2015).

Finalmente, o Endotélio é outra camada com característica lipofílica com apenas 4.0 μm de espessura (Beer; Wartak; Pircher, 2018). Consiste em uma monocamada de células hexagonais metabolicamente ativas. Esse ambiente é

mantido relativamente desidratado devido a uma bomba de sódio e potássio endotelial, que regula os níveis de água entre as “*tight junctions*” e as células endoteliais, movendo ativamente o fluido do estroma de volta para a câmara anterior do olho. Isso ocorre através da transferência ativa de sódio e de potássio, transportando água a uma taxa de velocidade de 6,5 $\mu\text{L}/\text{cm}/\text{h}$, mantendo um estado de relativa desidratação da córnea (Bennet et al., 2018; Sánchez-lópez et al., 2017).

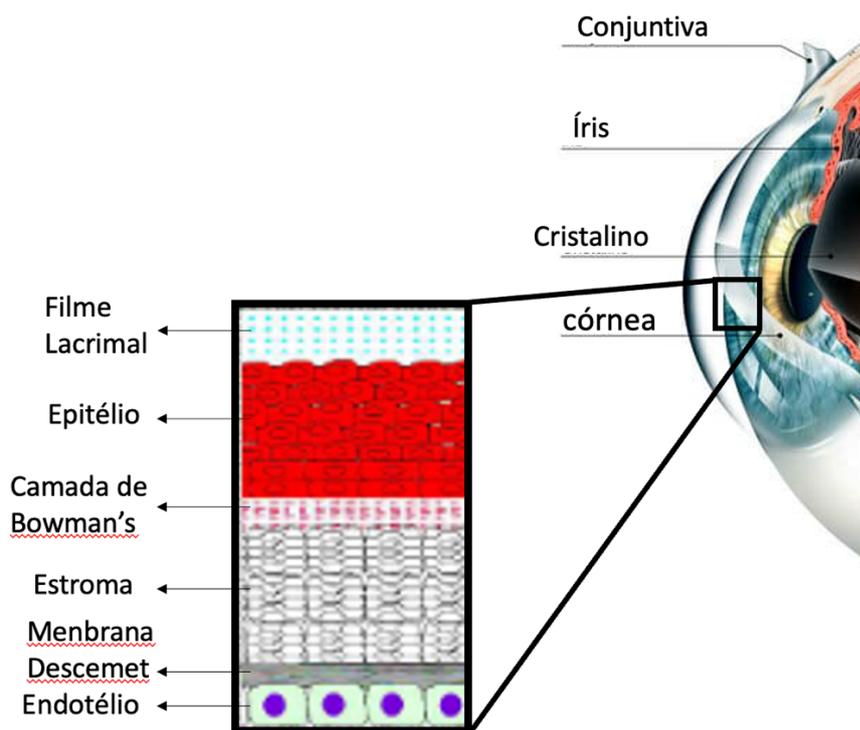


Figura 3. Esquema representativo das camadas da córnea e filme lacrimal. Imagem Adaptada de Estlack et al., (2017).

A permeabilidade de um fármaco através da córnea é afetada por diversas propriedades físico-químicas do fármaco (Huang; Schoenwald; Lach, 1983). Essas propriedades incluem peso molecular, carga, tamanho, grau de ionização e equilíbrio hidrofílico-lipofílico.

2.2 Epidemiologia das doenças oculares

2.1 Administração ocular de fármacos

Soluções, suspensões, emulsões, géis e pomadas são as formulações mais comuns utilizadas na administração ocular por via tópica. No entanto, essas formas farmacêuticas enfrentam perdas significativas, podendo chegar a até 90% antes de atingirem a córnea. Devido a essas perdas, muitos fármacos que necessitam de uma

maior biodisponibilidade para exercer sua ação precisam ser utilizados por diversas vezes ao longo do dia. Em alguns casos é preciso fazer o uso de técnicas invasivas e desconfortáveis realizando a administração intraocular. Esses tipos de tratamento aumentam o risco de reações adversas, sendo que o desconforto reduz a adesão dos pacientes ao tratamento e pode levar a complicações no quadro clínico (Gaudana et al., 2010; Gratieri et al., 2010; Kaur et al., 2004; Sun et al., 2006).

A fim de eliminar esses problemas, há uma busca constante por novos medicamentos com formulações inovadoras para a entrega de fármacos. No entanto, essa busca envolve um longo processo até a aprovação regulatória, seguindo pelas etapas de pesquisa experimental (fase pré-clínica), com testes realizados em células e em animais, seguida pela fase de pesquisa clínica em seres humanos, e, finalmente, a aprovação regulatória que pode levar anos.

Na fase pré-clínica, particularmente nos estudos de pesquisa e desenvolvimento de formulações oftálmicas há o desafio de utilizar um grande número de animais de experimentação (Abdelbary; Amin; Zakaria, 2017; Li et al., 2017). Isso ocorre devido à dificuldade de simular *in vitro* os múltiplos fatores que afetam a eficácia das formulações e a necessidade de realizar múltiplas amostragens em um mesmo animal durante os experimentos.

Diferente de outras vias de administração, a avaliação da eficácia de formulações oftálmicas não se limita apenas a avaliar o perfil de dissolução do fármaco ou sua permeabilidade através de membranas biológicas. Após a aplicação tópica, essas formulações oftálmicas estão sujeitas a diversos processos fisiológicos de proteção do organismo, como já mencionado por Ali et al., (2007).

A eficácia dos produtos medicamentosos oftálmicos tópicos depende diretamente do tempo de residência da formulação no olho, que deve ser suficiente para que o fármaco penetre as barreiras oculares atingindo o local de ação em níveis terapêuticos (Fangueiro et al., 2016).

Para superar esses obstáculos, o desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos mais eficazes tem sido a adição de promotores de penetração, que modificam a integridade do epitélio da córnea e aumentam a permeabilidade ao fármaco (Gratieri et al., 2011). A adição de polímeros que aumentam a viscosidade pode aumentar a resistência da formulação aos mecanismos dinâmicos de proteção ocular. Além disso, formulações que contenham componentes mucoadesivos interagem com a camada mucosa, cobrindo a superfície do olho

(Gratieri et al., 2010) e melhorando o tempo de residência da formulação exposta aos mecanismos de drenagem (Fangueiro et al., 2016; Gratieri et al., 2010).

2.3. Métodos experimentais *ex vivos* e *in vitro*

Os métodos experimentais (*ex vivo* e *in vitro*) para avaliar todos os atributos possíveis de formulações oftálmicas são essenciais durante o estágio de pesquisa e desenvolvimento para rastrear as abordagens mais promissoras. Os estudos *in vitro* negligenciam os principais fatores, como drenagem e absorção improdutivo, que em condições fisiológicas são responsáveis pelos principais caminhos de eliminação. A maioria dos estudos *in vivo* são feitos em regime de dose única com condições subótimas óbvias em relação à córnea. Muitos experimentos com animais também já foram realizados com anestesia, onde a produção lacrimal é reduzida (Sukhbir, Chrai, Patton, 1973; Thomas, Patton, 1976).

Dessa forma, alguns modelos de estudos *ex vivo* podem prever muitos resultados diante de uma nova formulação farmacêutica. Estudos de permeabilidade corneana *ex vivo* em que o vetor estiver em contato com a córnea por 2 ou 4 h não refletem a condição fisiológica, e deve ser usado apenas para entender melhor os resultados *in vivo*. Mesmo assim, modelos estáticos de avaliação da permeação de compostos por tecidos biológicos ou modelos de cultura celular fornecem informações limitadas quanto ao desempenho real da formulação *in vivo* (Pepic et al., 2014).

Existem diversos modelos experimentais descritos na literatura para a avaliação estática do perfil de penetração de fármaco na córnea, aplicando tecidos de animais excisados ou culturas celulares (Agarwal et al., 2016; Gratieri et al., 2010; Pepic et al., 2014).

Uma das deficiências desses modelos é a incapacidade de detectar o fármaco em vários compartimentos do globo ocular, como córnea, conjuntiva e humor aquoso. Por esse motivo, na literatura podem ser encontrados alguns estudos usando olhos inteiros excisados, como exemplo, olhos bovinos excisados incubados em tampão (Kompella et al., 2006) ou dispostos em Becker com uma câmara doadora no topo (Morrison; Connon; Khutoryanskiy, 2013; Morrison; Khutoryanskiy, 2014). Outra abordagem descrita envolve a utilização de olhos de porco excisados, posicionados de forma invertida, de modo que a córnea fique voltada para baixo e em contato com a formulação teste (Thiel et al., 2002).

No entanto, esses modelos têm limitações, já que a córnea fica exposta a uma quantidade excessiva da formulação, levando a um intumescimento e hidratação exacerbados que comprometem a integridade do tecido. Além disso, a exposição da córnea a concentrações muito elevadas de fármaco por períodos prolongados pode resultar em uma superestimação dos resultados obtidos (Pepic et al., 2014).

Os modelos animais ainda são imprescindíveis para avaliar o desempenho de formulações oftálmicas, apesar de todas as limitações que apresentam em simular condições fisiológicas naturais. Isso se deve pela falta de mecanismos de proteção dinâmica, como drenagem lacrimal, a falta de mecanismo para simular a diluição e a depuração da formulação, bem como pelas diferenças anatômicas e fisiológicas em relação aos olhos humanos e a capacidade limitada de amostragem (Abdelbary; Amin; Zakaria, 2017; Kumar, 2016).

Mesmo que os olhos inteiros possam ser úteis na estimativa do perfil de permeação de fármacos, até o momento não há um modelo alternativo ao uso de animais para avaliação do desempenho de formulações oftálmicas. Portanto, se torna necessário desenvolver modelos oftálmicos alternativos que possam avaliar a penetração de fármacos na córnea aplicando “barreiras de proteção” dinâmicas.

2.3 Métodos alternativos

Em grande parte, devido aos esforços da Rede Nacional de Métodos Alternativos ao uso de animais (RENAMA), o Brasil tem lançado avanços significativos nos últimos anos em relação a testes toxicológicos alternativos ao uso de animais de experimentação. Embora as metodologias alternativas para testes de toxicidade sejam imprescindíveis para se alinhar com o panorama internacional que fomenta e privilegia o princípio dos 3Rs (***replacement, reduction e refinement***), o país ainda precisa avançar no desenvolvimento de metodologias que visam avaliar o desempenho e eficácia de produtos farmacêuticos. Isso é necessário para diminuir o número de animais usados em experimentação durante as etapas de pesquisa e desenvolvimento. Porém, ainda estamos longe de alcançar plenamente os 3 Rs.

O número de procedimentos realizados em animais vivos é determinado por vários fatores, incluindo o enfoque das atividades científicas e médicas, as condições econômicas e as tendências globais em novas tecnologias ou áreas de pesquisa.

O sétimo relatório da Comissão ao Conselho e ao Parlamento Europeu sobre as estatísticas e número de animais utilizados para fins experimentais e científicos nos Estados membros da União Europeia, reportou que em 2011 houve uma queda no uso de mais de 500.000 animais (4,3%) em relação ao ano de 2008. No entanto, uma análise mais cuidadosa dos dados revela algumas contradições. Embora o número total de animais tenha diminuído significativamente, o relatório indica que houve um aumento de 7,5% no número de coelhos usados em experimentação. Dentre esses coelhos, 70,8% (253.488) foram usados com o propósito de “pesquisa, desenvolvimento e controle de qualidade de produtos e dispositivos para medicina humana, odontológica e veterinária”. Cabe ressaltar que nessa estatística não estão incluídos os 6,5% (total de 23.185 coelhos) utilizados para “avaliações toxicológicas e outras avaliações de segurança (incluindo avaliação de segurança de produtos)”. Além disso, outros coelhos foram usados para pesquisas biológicas básicas (3,5%), pesquisas acerca de diagnósticos de doenças (1,7%), fins educacionais (0,6%) e outros propósitos (17%). Em relação a camundongos, ratos e outros roedores, 33,6%, 45,2% e 64,4%, respectivamente, foram usados em experimentos de pesquisa e desenvolvimento, enquanto, 6,6%, 17,0% e 12,7%, respectivamente, foram usados em avaliações toxicológicas (European, 2013).

O número total de procedimentos estava aumentando antes de 2013, principalmente devido ao aumento dos procedimentos para criação e reprodução de animais geneticamente alterados. Este aumento na primeira parte da década pode ser atribuído principalmente à disponibilidade de novas tecnologias que levaram a novas oportunidades de pesquisa. Após 2001, os procedimentos aumentaram, atingindo um pico de 4,14 milhões em 2015. Porém, recentemente, o número de procedimentos para criação e reprodução de animais geneticamente alterados apresentou diminuição de 14% entre 2019 e 2020, e queda de 11% de 2010 a 2020 (Government, 2014).

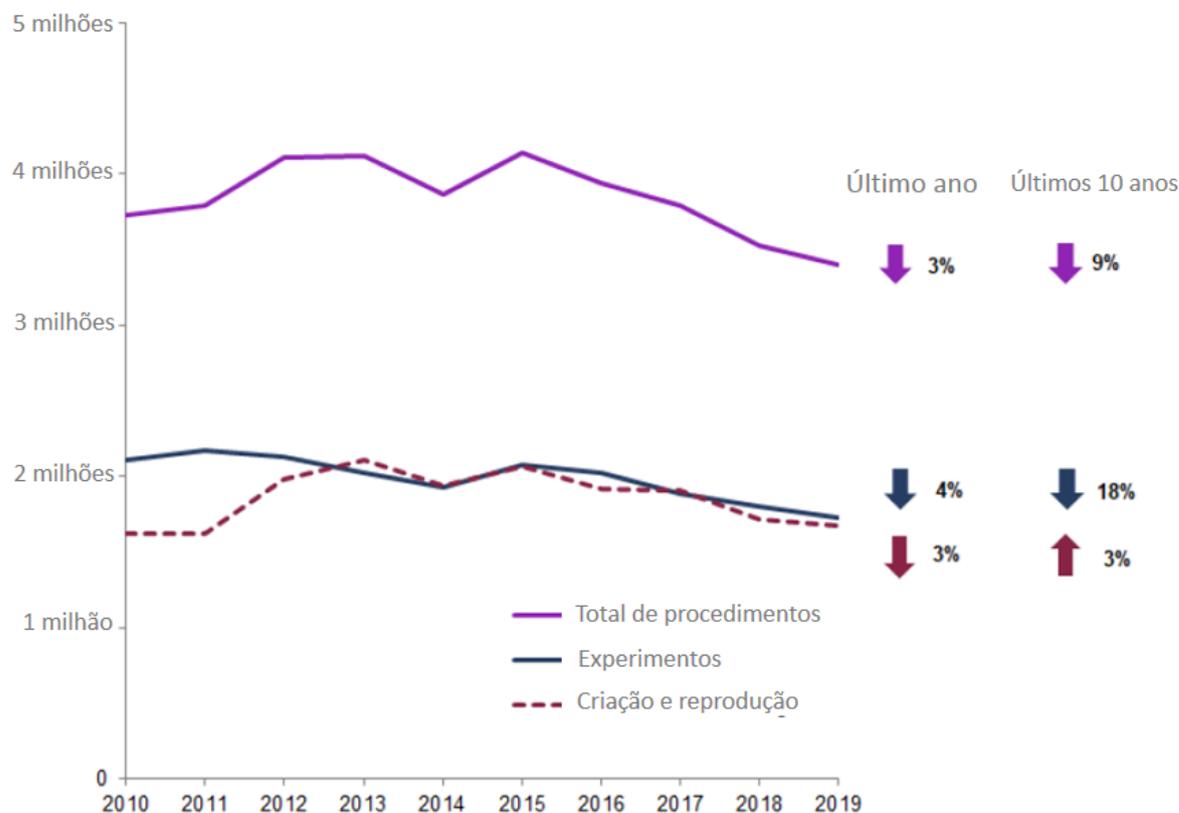


Figura 4. Total de procedimentos científicos por tipo no período de 2010 a 2019. Pesquisa realizada em: Annual Statistics of Scientific Procedures on Living Animals, Great Britain 2019, Table 1.2. And Annual Statistics of Scientific Procedures on Living Animals, Great Britain 2017, Table 1. Acesso em: 02/08/2022.

O relatório anual sobre as estatísticas e número de animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos na Grã-Bretanha, reportou que em 2018 o número de procedimentos (3,52 milhões) em animais diminuiu 7%. Sendo o menor número em um único ano desde 2007; dos valores apresentados, 97% de todos os procedimentos são realizados em ratos, peixes e pássaros, enquanto os cães e primatas representam 16% e 8%, respectivamente.

Em 2019 o relatório reportou uma queda de apenas 3% em relação a 2018, contabilizando ainda 3,40 milhões de procedimentos em animais vivos, deste total, 57% dos procedimentos são destinados à pesquisa básica. Os animais mais utilizados nesse período, foram camundongos (437.124), ratos (132.849) e 'Guinea-pig' porquinho da índia (36.895). Os coelhos ocuparam ainda o 8º lugar, sendo do total de 10.188; onde 608 animais foram utilizados em pesquisa aplicada, 8.631 para fins regulatórios e não foi reportado nenhum animal utilizado para proteção e preservação da espécie (Government, 2019).

No ano de 2020 o relatório reportou uma queda expressiva, da ordem de 15%, contabilizando 2,8 milhões de procedimentos em relação ao ano de 2019 – antes o menor número de procedimentos em animais havia sido reportado em 2004. Deste total, 1,44 milhões de procedimentos realizados para fins experimentais, no entanto, mais da metade foram utilizados em pesquisa básica (53%), contabilizando 758.000 procedimentos. Mesmo havendo uma redução no número de coelhos, roedores e aves, o número de peixes aumentou. Este grande decréscimo pode ser parcialmente explicado pelos dois lockdowns por conta da pandemia de Covid-19 durante 2020, que podem ter afetado a atividade nos estabelecimentos (Government, 2020).

Em 2021 foram realizados 3,06 milhões de procedimentos científicos envolvendo animais vivos na Grã-Bretanha. Isso representa um aumento de 6% em relação ao ano anterior, porém, uma queda de aproximadamente 10% em relação a 2019. Este é o segundo valor mais baixo desde 2007 e vem diminuindo devido à redução da utilização de animais em ensino. Mesmo assim, cerca de metade (51%) dos procedimentos experimentais continuam sendo realizados para pesquisa básica. Os procedimentos experimentais aumentaram 20% e os procedimentos para criação e reprodução diminuíram 8% em relação ao ano anterior. Na maioria dos procedimentos (96%) tanto para fins experimentais, quanto de reprodução, foram utilizados em maior número camundongos, peixes, pássaros ou ratos; espécies mais utilizadas há mais de uma década (Government, 2021).

Estes dados corroboram a observação de que o mundo vem avançando na substituição de animais para avaliações toxicológicas de insumos e produtos. O que muito provavelmente faz com que o número total de animais usados em experimentação venha caindo. Um exemplo claro disso, é a utilização de estudos de microdiálise em coelhos como uma alternativa para reduzir o número animais ao avaliar o desempenho de formulações oftálmicas. Embora representem um avanço significativo, esses estudos ainda enfrentam desafios consideráveis, por serem complexos, delicados e apresentarem alta variabilidade individual. No entanto, tal avanço só não é maior porque modelos animais são ainda imprescindíveis nas etapas iniciais da pesquisa científica.

Outros fatores que podem influenciar nos resultados dos experimentos com animais incluem fatores ambientais externos, como luz, ruído, umidade relativa, dieta, trocas de ar, temperatura das salas e da cama dos animais. Além disso, fatores sociais dos animais também são importantes, pois alguns vivem em grupos, e o tamanho do

grupo e o espaço em que estão alocados devem ser observados. Outros fatores, como medo, transporte e a técnica dos experimentos, também podem influenciar nos resultados.

Como esses animais não podem escapar das condições que lhe são fornecidas, todos os fatores citados acima têm que ser levados em consideração. Devido ao quão sensíveis são esses animais, é necessário assegurar sua saúde e diminuir vieses da experimentação (Andrade; Pinto; Oliveira, 2006).

Mesmo com o relatório da UE voltado a esforços para a redução de uso de animais em pesquisa de 2010, torna-se necessário o desenvolvimento de novos métodos alternativos para a substituição e redução dos animais. Ainda que estudos usando animais sigam diretrizes de ética restritivas, as desvantagens da experimentação animal vão muito além das questões éticas. Estudos em animais são dispendiosos, demorados e carecem de sensibilidade em diferenciar formulações devido à grande variabilidade dos resultados.

É importante notar que os testes em animais vertebrados deve ser realizado apenas como último recurso, ou seja, quando nenhuma informação que satisfaça os requisitos de informação esteja disponível, e onde nenhuma adaptação (por exemplo, onde não existem testes alternativos) possa ser aplicada (Pistollato et al., 2021).

No entanto, várias questões ainda precisam ser enfrentadas, como a necessidade de melhorar a caracterização das vias de toxicidade; o desenvolvimento de ensaios adequados para preencher as lacunas científicas atualmente descobertas; aumentar nossa compreensão das ligações entre leituras *in vitro* e os resultados (adversos) nas espécies-alvo; definir melhor os domínios de aplicabilidade para métodos alternativos, observando formas de promover uma implementação ampla e harmonizada.

Logo, o objetivo deste trabalho desenvolver métodos alternativos para avaliação de desempenho de formulações oftálmicas. Estes métodos podem ser utilizados no “*screening*” de formulações, durante o desenvolvimento dos produtos, nas comprovações de desempenho e eficácia, e para fins regulatórios e controle de qualidade, possuindo potencial para redução drástica do número de animais.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho é desenvolver dois métodos complementares alternativos ao uso de animais de experimentação para avaliação do desempenho e eficácia de produtos farmacêuticos de administração oftálmica. O primeiro método, ao utilizar globo ocular excisado de porco, possui o objetivo de avaliar o desempenho das formulações quanto à penetração do fármaco na córnea. O segundo método, ao simular artificialmente a superfície mucoadesiva, possui o objetivo de avaliar o desempenho das formulações quanto ao tempo de retenção na superfície ocular.

3.1. Objetivos específicos

3.1.1. Parte 1: Modelo dinâmico

- Desenvolver um modelo sensível de penetração ocular *ex vivo* com fluxo lacrimal simulado para avaliação do desempenho de formulações oftálmicas em relação à sua capacidade de resistir às barreiras dinâmicas que levam à drenagem;
- Desenvolver um modelo de compartimento doador com fluxo para penetração de fármacos em globo ocular inteiro;
- Estabelecer condições de operação do modelo dinâmico de penetração ocular *ex vivo* com fluxo lacrimal simulado;
- Descrição matemática dos efeitos da depuração do sistema;
- Obter formulações para teste do modelo dinâmico;
- Estudar a penetração e retenção de Fluconazol (FLU) na córnea *ex vivo* a partir de géis de poloxamer com e sem aditivo mucoadesivo e solução aquosa contendo 0,2% de fármaco para estabelecimento de parâmetros operacionais do modelo;
- Comparar a penetração e retenção de Curcumina (CUR) no modelo desenvolvido de penetração ocular com fluxo lacrimal simulado e estático.

3.1.2. Parte 2: Modelo “OphthalMimic”

- Desenvolver um modelo sensível totalmente *in vitro* para avaliação do desempenho de formulações oftálmicas em relação à sua capacidade de resistir às barreiras dinâmicas que levam à drenagem;
- Obter e caracterizar membranas poliméricas que simulem a superfície ocular;

- Obter e caracterizar uma membrana híbrida baseada em hidrogel que simule a superfície ocular;
- Realizar testes de drenagem de Fluconazol (FLU) no modelo desenvolvido totalmente *in vitro* a partir de géis de poloxamer em diferentes concentrações e géis de poloxamer com aditivo mucoadesivo e solução aquosa contendo 0,2% de fármaco para estabelecimento de parâmetros operacionais do modelo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Curcumina (*Rhizoma curcumae Longae pulvis*) (Receptura Apotheke, Cornelius-Apothekenbetriebs-OHG, Altenhoferallee5, 60438 Frankfurt, Alemanha; Lote No: 3419M-1311). Fluconazol ($\geq 99\%$), quitosana de médio peso molecular (PM 50-190 kDa, 75% de desacetilação), poloxamer 407®, PVA - (Poly (vinyl alcohol) 87-90% hydrolyzed, mol 30,000-70,000, mucina de estômago suíno (Tipo II) e (Tipo A), 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy) -2-methylpropiophenone Irgacure®, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, ureia (reagente ACS), Acetonitrila e metanol grau HPLC, tampão HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico, sal sódico) 25 mM isotonzado em pH 7,4; comprados da J.T Barker (Philisburg, Estados Unidos). Etanol (P.A), Tween 80®; comprados na Merck (Alemanha). Hidróxido de sódio e graxa de silicone; adquiridos na Dinâmica Química Contemporânea (São Paulo, Brasil). Acrinolitrla Butadieno Estireno (ABS), Citrato de sódio di-hidratado, ortofosfato de hidrogênio di-sódico anidro, Cloreto de cálcio; comprados na AnalaR, BDH laboratory Supplies, (Inglaterra). Cloreto de sódio e D (+) -Glucose anidra; adquiridos na Scharlau Chemie S.A (Sentmenat, Espanha). Phospholipon 90G Lipoid GmbH (Alemanha). Span 80® (Croda, Singapoura). Triglicerídeo caprílico – (*MCT oil*) Labrafac® Lipophile WL 1349; adquirido por Gattefossé (Paris, França). Tampão fosfato de sódio (Oxoid, Irlanda). Placa de 12 poços Kasvi (China). Gelatina industrial incolor, adquirida na Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Tissue-Tek® O.C.T (*optimal cutting temperature*) (Sakura® Finetekd, USA). Todas as análises foram realizadas com água ultra pura (Mili-Q) (Milipore, Illkirch-Graffenstaden, França).

4.1.1. Obtenção de córneas suínas e bovinas

Os estudos de penetração ocular que foram realizados nos Laboratórios de Tecnologia, Medicamentos e Alimentos e Cosméticos (LTMAC) em Brasília, Brasil e no Laboratório Buchanan Ocular Therapeutics Unit (BOTU) em Auckland, Nova Zelândia, utilizaram córneas de suínos e bovinos. Essas córneas foram obtidas a partir de olhos de suínos e bovinos após o abate e antes do processo de escalda, adquiridas da empresa Via Carnes Ltda (Formosa, Brasil) e Fresh Pork (Auckland, Nova Zelândia).

Os olhos foram armazenados em caixa térmica para transporte até o local da realização dos experimentos. As córneas foram dissecadas e utilizadas no mesmo dia do abate. Todos os olhos foram inspecionados quanto a danos ou lacerações na córnea e apenas olhos saudáveis foram usados nos experimentos.

4.2. Métodos

4.2.1. Parte 1: Concepção do compartimento doador do modelo dinâmico *ex vivo*

A partir da ideia conceitual (Figura 5), foram produzidos compartimentos doadores de vidro para os testes iniciais. Diferentes compartimentos doadores foram produzidos variando-se a altura da saída, de modo que o volume máximo de formulação em contato com a superfície ocular seja aumentado. Após a produção dos compartimentos doadores, foram realizados testes com diferentes volumes da formulação, pigmentada com corante azul de metileno para facilitar a visualização do espalhamento sobre a córnea, determinando o volume máximo suportado pelo compartimento doador. Seguiu-se a realização dos testes exploratórios o protótipo foi otimizado.

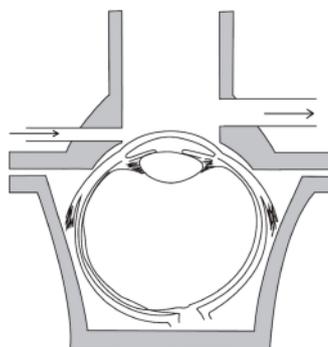


Figura 5. Representação esquemática do design do modelo dinâmico.

4.4.2. Descrição matemática dos efeitos da depuração do sistema

Para o cálculo dos efeitos de depuração do sistema foi descrito um perfil exponencial decrescente associado à depuração do volume de formulação em relação ao tempo de penetração com fluxo, o que permitiu o desenvolvimento da **Equação 1** mostrada à seguir, aonde $V(t)$, representam o volume disponível após passado um intervalo de tempo (t) sob ação da depuração; V_0 , o volume inicial da formulação; e β

um coeficiente relacionado à velocidade de depuração do volume inicial cuja unidade é definida como o recíproco da unidade de tempo, s^{-1} .

$$V(t) = V_0 e^{-\beta t}$$

Equação 1

4.4.3. Determinação do fluxo simulado na bomba peristáltica

Para definir o fluxo simulado com a bomba peristáltica (MINIPLUS 40volution, Gilson, Middleton, EUA) foi montado todo o protocolo de permeação como descrito no item 5.4. Assim, a bomba rotativa foi ajustada em rotações por minuto (RPM) para produzir um fluxo, de modo que o compartimento doador foi perfundido com fluido lacrimal simulado em uma taxa de fluxo equivalente a 11% de depuração e 16% de depuração; compatível com a depuração ocular *in vivo* quando adicionados ao volume de formulação no meio doador. A bomba ficou em funcionamento por 1 minuto e o volume do compartimento de saída foi coletado, aferido com uma pipeta automática e comparado aos volumes pré-estabelecidos. Para o fluxo lacrimal simulado foi utilizado (NaHCO_3 0.2%/ NaCl 0,67%/ CaCl_2 0.008%) descrito por Miyazaki et al. (2001).

4.2.4. Fármacos modelos

O fluconazol – FLU (MW 355,34 g/mol, Log P 0.5, Solubilidade em água 1.39 mg/mL) (ALOGPS) foi utilizado como fármaco modelo hidrossolúvel. As análises foram realizadas por *High-performance liquid chromatography* - HPLC (LC-20CE— Shimadzu, Kyoto, Japan), utilizou-se fase móvel acetonitrila, metanol e água (15:5:80 v/v) com vazão de 0,8mL/min, coluna C18 (150 x 4.6mm, 5 μ m, Sulpeco Discovery BIO Wide-Pore), temperatura do forno a 40° C, comprimento de onda em 210nm e volume de injeção de 20 μ L. A curva padrão foi seletiva e linear ($y = 30.676x \cdot 10^6 + 2.843,9$ e $R^2=0,9992$) para uma faixa de concentração de 0,5 –10 μ g/mL. O Limite de Detecção e o Limite de Quantificação foram determinados em 0,007 e 0,021 μ g/mL, respectivamente. Para a extração do fármaco da córnea suína foi utilizado 5mL de solução tampão HEPES isotônico com cloreto de sódio (pH = 7,4) e processada com o auxílio de um homogeneizador de tecidos Ultra Turrax (marca IKA, modelo T25 digital) durante 30 segundos, conforme Gratieri et al. (2010). Todas as amostras foram

analisadas em quadruplicata e filtradas em filtros hidrofílicos (0,45µm) para posterior análise e quantificação.

A curcumina – CUR (MW 368.4 g/mol, Log P 3,29, Solubilidade em água 3.12 mg/L) (US EPA) foi utilizada como fármaco modelo hidrofóbico. A penetração da CUR nas camadas da córnea suína foi analisada por microscopia de fluorescência (Olympus Fluoview FV1000). Um laser com LED 475 nm, com intensidade do laser em 25%, foi usado para iluminar a amostra e o sinal foi coletado usando a objetiva da câmera (20x /0,5 Axicam 506). O filtro (FITC-109) 38 pront de fluorescência verde (BP 450-490/BS495/BP 500-500) foi o utilizado. O tempo de exposição correspondeu a 1000 milisimems (ms) e intensidade 100%. Balanço de luz branca em 3200k e gama 1.0 Linear. As mesmas configurações também foram usadas para analisar a penetração da CUR na conjuntiva e na pálpebra suína no método dinâmico com fluxo lacrimal simulado e no método estático sem fluxo lacrimal simulado. Também foram verificadas as autofluorescências de cada tecido sem o fármaco.

4.2.4.2. Preparo das formulações contendo fluconazol

As formulações contendo 0,2% de FLU, foram preparadas seguindo Gratieri (2010). As formulações com poloxamer 14% (PLX 14%), 16% (PLX 16%) e 20% (PLX 20%) (m/m) foram preparadas para aumentar a viscosidade do sistema, pesando o polímero e deixando-o em contato com água ultrapura a 4°C por 24h. Foram preparas formulações PLX16 e quitosana 0,5% (PLX16QS0,5%), 1,0% (PLX16QS1,0%) e 1,25% (PLX16QS1,25%) (m/m) com o intuito de promover maior mucoadesividade ao sistema. Para tanto, foi preparada uma solução aquosa de ácido acético 0,5% (m/v), e adicionada QS nas suas proporções selecionadas até completa dissolução, depois adiciona-se o poloxamer a 4°C por um período de 24 h em repouso.

Tabela 1. Composição das formulações biocompatíveis contendo FLU.

Formulação	Poloxamer	QS	Água (qsp 100 mL)	FLU
PLX 14	14%	-	85.8	0,2%
PLX 16	16%	-	83.8	0,2%
PLX 20	20%	-	79.8	0,2%
QS0,5PLX16	16%	0,5%	83.3	0,2%
QS1,0PLX16	16%	1,0%	82.8	0,2%
QS1,25PLX16	16%	1,25%	82.5	0,2%

4.2.4.3. Preparo das formulações contendo curcumina

Foram utilizadas duas formulações inovadoras e uma formulação convencional contendo CUR em uma concentração de 1 mg/mL, a fim de comparar o perfil de penetração do ativo em estudos *ex vivos* com olhos suínos inteiros, tanto na presença quanto na ausência de fluxo lacrimal simulado, conforme descrito a seguir.

4.2.4.3.1. Lipossomas

Os lipossomas foram desenvolvidos utilizando a técnica de hidratação de camada de filme fino, conforme descrito anteriormente por Ahad et al. (2018). Os lipossomas foram preparados pesando os componentes Phospholipon 90G (90 mg), Tween 80[®] (10 mg) e CUR (5mg) e dissolvendo-os em 10 mL de uma mistura de solventes orgânicos metanol:clorofórmio 1:2 (v/v). O residual de solvente orgânico foi removido por rotaevaporação em um Rotavapor R-215 (Büchi, Suíça), e os filmes foram secos sob uma corrente de nitrogênio por um período de 5 min, sendo posteriormente armazenados em dessecador a vácuo *overnight*. Após isso, os filmes secos foram reconstituídos através da adição de 5 mL de água ultrapura, previamente aquecida a 35°C. Os lipossomas foram, então, submetidos a um processo de extrusão utilizando uma extrusora de seringa com membranas de poros de 100 nm.

4.2.4.3.2. Nanoemulsão não aquosa baseada em solventes alcano semifluorato contendo curcumina

Inicialmente foi preparada uma solução estoque de 2% (m/v) de lecitina de soja em veículo de alcano semifluorato e misturada em vórtice em VX100 (Labnet, EUA). Após foram pesados Tween 80[®] (20 mg) e Span 80[®] (40 mg) e adicionados ao veículo junto à CUR. A formulação foi agitada em vórtex até homogeneidade.

4.2.4.3.3. Solução Oleosa

Foi preparada uma solução de triglicerídeo caprílico contendo CUR 1:1 (v/m). Inicialmente 1mg do ativo foi adicionado à solução oleosa sob agitação até completa solubilização da substância.

4.4.3. Ensaio de penetração estática *ex vivo* em córnea suína

Para os estudos de penetração estática *ex vivo*, foram utilizadas células de difusão tipo Franz modificadas, conforme demonstrado na Figura 6. Uma inspeção foi

realizada e qualquer olho com câmara anterior colapsada foi descartado. A córnea de suíno excisada foi posicionada entre o compartimento doador e o receptor. Foram adicionadas alíquotas de 300 μ L dos géis e da solução aquosa de FLU (0,2%) no meio doador. Na solução receptora foi adicionado 15 mL de tampão HEPES a 25mM com NaCl a 133 mM pH 7,4. A solução receptora foi mantida sob agitação magnética constante a 500 rpm para assegurar a homogeneidade da solução receptora em banho aquecido a $32 \pm 2^\circ$ C. Cada amostra foi testada em cinco replicatas. O estudo teve duração de 15 minutos.

Após o período de teste, o excesso de fármaco da superfície da córnea foi retirado com água ultrapura, e em seguida, foram picotadas e inseridas em frascos de vidro âmbar, onde foram adicionados 5 mL de Tampão HEPES para recuperação do fármaco, seguindo o protocolo de extração do FLU, conforme já citado no item 4.2.

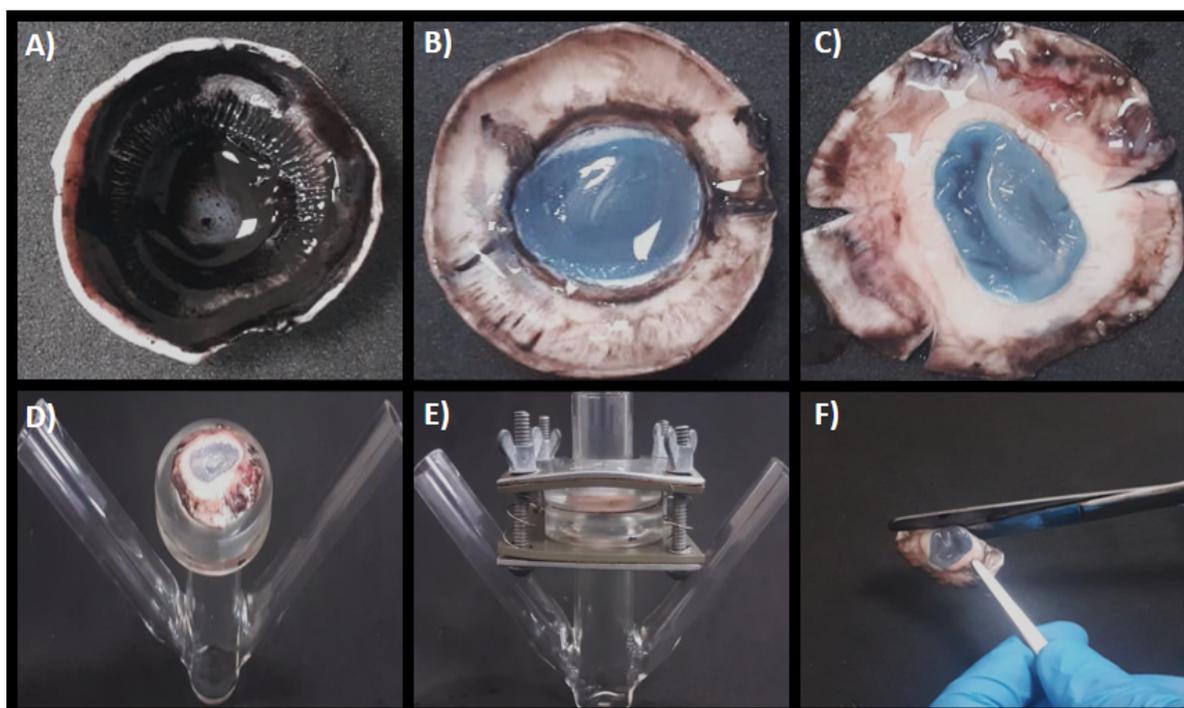


Figura 6. Esquema de dissecação da córnea e montagem das células de difusão do tipo Franz modificada para o ensaio de permeação ocular *ex vivo*. A) Parte interna da córnea com a íris; B) Parte interna da córnea sem a íris; C) Parte frontal da córnea com as laterais replicadas; D) Vista superior da célula de difusão apresentando a córnea ao centro do compartimento doador; E) Células de difusão montadas; F) Córnea excisada pronta para o processo de extração.

4.5. Estudo de penetração dinâmico *ex vivo* em córnea suína

Para estudar os efeitos do modelo de penetração dinâmico com fluxo lacrimal simulado desenvolvido neste trabalho, foram realizados testes com sete formulações de FLU 0,2%: três formulações de poloxamer PLX16, PLX14 e PLX20 e três formulações contendo componente mucoadesivo PLX16Q0,5%, PLX16Q1,0% e PLX16Q1,25%; que possui maior viscosidade e propriedades mucoadesivas; e uma solução aquosa.

3.2.1. Estudo de penetração ocular de curcumina em modelos de olho inteiro *ex vivo* com e sem fluxo lacrimal simulado

Os parâmetros para observação de penetração ocular de CUR no modelo dinâmico com simulação do fluxo lacrimal foram determinados utilizando uma bomba peristáltica (MINI PLUS evolution, Gilson, Middleton, EUA), conforme descrito neste trabalho e por Barbalho et al., (2023). O método de preparação de olhos inteiros no modelo estático foi realizado conforme o protocolo desenvolvido por Agarwal et al. (2018). Em resumo, os olhos foram colocados em placas de seis poços contendo papel filtro com cerca 2 mL de uma solução balanceada de sal de Hank para manter a hidratação do globo ocular. Foram utilizados também anéis personalizados de policarbonato, fabricados pela Oficina de Engenharia Biomédica da Universidade de Auckland, posicionados sob cada olho para delimitar a região de aplicação da formulação, conforme a Figura 7.

Antes de aplicar a formulação, ambos os sistemas de penetração com os olhos suínos já acoplados foram colocados 5 minutos em banho-maria (BIO-STRATEGY BS- 21) a $35 \pm 3^{\circ}\text{C}$ para atingir uma temperatura de equilíbrio. Foram aplicados 300 μL de formulação no topo de cada globo ocular. O teste de penetração teve duração de 15 minutos. Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

Neste procedimento, foram avaliados outros tecidos para determinar a penetração da CUR. Após a conclusão do estudo de penetração, foram coletadas amostras das córneas, conjuntivas e pálpebras. Todas as amostras foram devidamente armazenadas a $- 80^{\circ}\text{C}$ para posterior análise por microscopia de fluorescência.

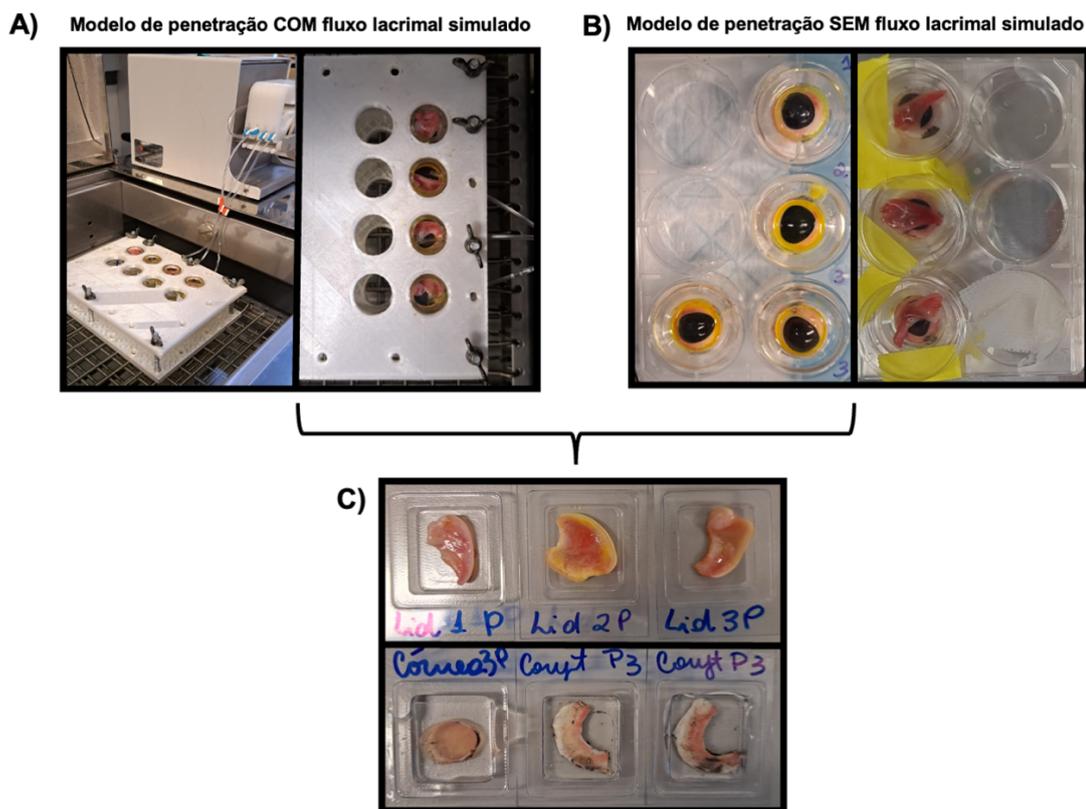


Figura 7. Modelos de penetração. A) Modelo de penetração ocular com fluxo e B) Modelo de penetração ocular sem fluxo, C) Amostras de pálpebra, córnea e conjuntivas coletadas para análises.

3.2.2. Preparo das amostras para análise por microscopia de fluorescência

As amostras congeladas em gel (*optimal cutting temperature*) O.C.T e foram cortadas com o auxílio de um criomicrotomo (CryoStar NX50, Thermo Scientific, USA) e as imagens capturadas em microscópio de fluorescência no mesmo dia de acordo com os parâmetros descritos no item 4.3. As amostras de córnea foram seccionadas em 12 regiões na porção central e lateral. Foram capturadas imagens em 5 posições, conforme demonstrado na Figura 8. Totalizando assim, 60 fotos por região de cada olho e um total de 2160 fotos para todas as formulações. Nas amostras da conjuntiva, foi selecionada a parte mais próxima da córnea. Foram feitas 12 seções de cada amostra, com a captura de uma imagem por corte, totalizando 216 fotos. Já as amostras das pálpebras foram analisadas apenas na região central, com 12 seções e a captura de 3 fotos por corte, totalizando 108 fotos. Todas as fotos foram utilizadas para análise estatística da penetração de CUR através da intensidade de fluorescência.

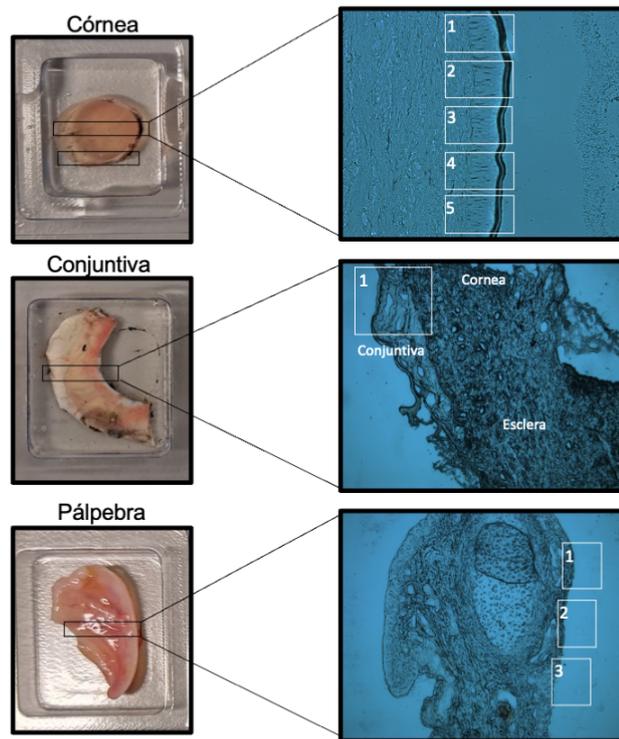


Figura 8. Esquema representativo de tecidos de córnea, conjuntiva e pálpebra excisadas e secções representativas para cada imagem capturadas em microscópio de fluorescência.

4.5. Parte 2: Concepção do modelo conceitual *in vitro* para simulação do fluxo lacrimal e movimento de piscagem - “OphthalMimic”

Para a montagem do modelo OphthalMimic partiu-se da ideia conceitual apresentada nas Figuras 9 e 10. O modelo é composto por uma entrada de fluxo lacrimal (c e d) e um canal de drenagem (e), com fluxo lacrimal artificial contínuo. Um espaço entre a tampa de fechamento e a entrada de fluxo lacrimal para simulação de uma bolsa de *cul-de-sac* (b). O desgaste mecânico é alcançado usando um sistema de engrenagem para mover a plataforma como um balanço. Uma sonda móvel movimenta-se horizontalmente na superfície exposta, para simular o reflexo de piscagem. Uma base reutilizável (h) suporta a membrana artificial (g). Foi aplicado ao design do modelo as proporções médias do olho humano em relação à área de superfície exposta e área de *cul-de-sac* (Palermo et al., 2013).

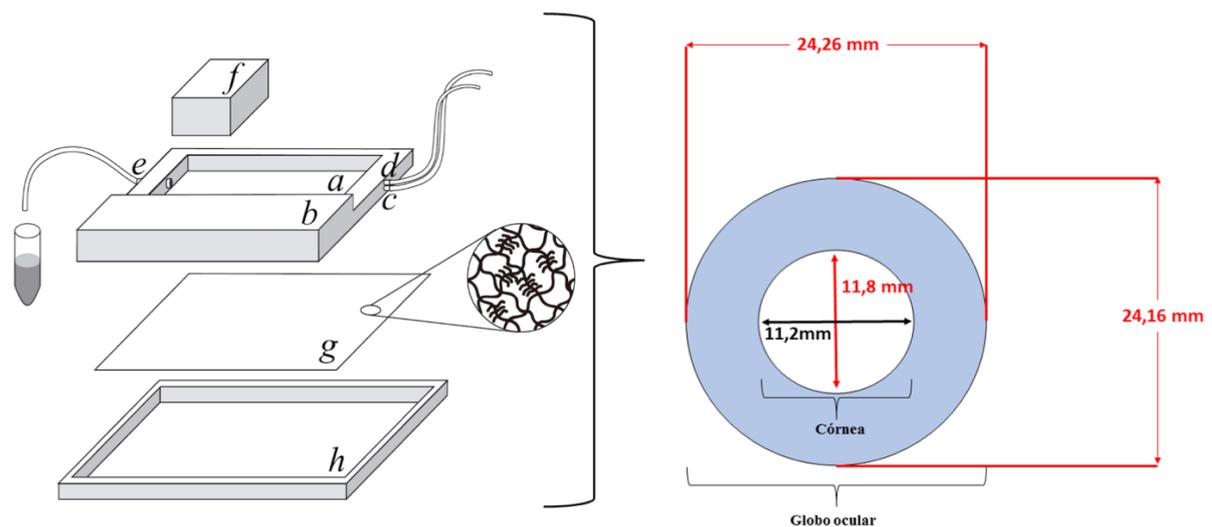


Figura 9. Representação esquemática das partes constituintes do modelo OphthalMimic: (a) área exposta; (b) área simulada de *cul-de-sac*; (c) entrada para fluxo lacrimal aquoso simulado; (d) entrada para fluxo de lacrimal lipídico simulado; (e) porta de drenagem; (f) sonda usada para stress mecânico; (g) membrana polimérica com mucina e (h) plataforma de suporte.

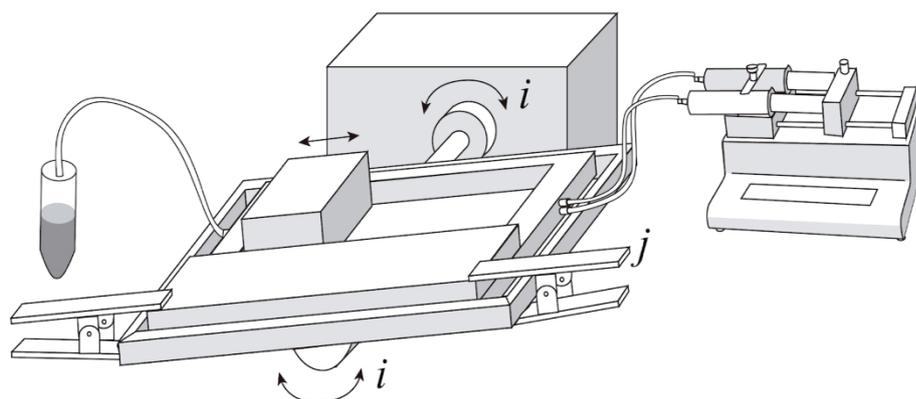


Figura 10. Representação esquemática do modelo OphthalMimic montado com uma bomba de perfusão e um sistema de engrenagem para mover a plataforma como um balanço de maneira a produzir movimento horizontal da sonda móvel em cima da superfície exposta (i), simulando a piscagem. A tampa de fechamento é aderida à plataforma de suporte usando grampos personalizados (j).

Uma bomba peristáltica comercial foi integrada com a plataforma para emular a secreção lacrimal simulada (Figura 10). Os parâmetros críticos testados são a dimensão, material, densidade da sonda móvel, velocidade e ângulo de movimento da plataforma (i).

4.6. Desenvolvimento de uma membrana polimérica contendo mucina dispersa.

As membranas foram obtidas pela técnica de *casting*, utilizando como matéria-prima o PVA, gelatina, mucina suína tipo II e PLX (Figura 11), adaptado de Kunal (2006). Uma solução estoque de mucina foi previamente preparada e estocada sob refrigeração a 4°C na proporção de 1:1 (m/v). No primeiro momento, o PVA (10% m/v) e a gelatina (2,5% m/v) foram solubilizados separadamente em tampão HEPES (pH 7,4) por agitação magnética durante 24 horas. No mesmo dia de preparo o poloxamer foi solubilizado por resfriamento a 4°C. Após esse período, para obtenção das membranas F1, F2 e F3, a mucina e o poloxamer são combinados nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 (m/m) e misturadas com a base PVA/gelatina. Todos os compostos foram aquecidos continuamente com agitação mecânica a 100 rpm por 30 minutos após atingirem a temperatura de $70 \pm 3^\circ\text{C}$. Em seguida, o volume foi ajustado com tampão HEPES, para compensar a perda de massa durante o aquecimento. Ao final, foi pesado 20 g da dispersão em placas de Petri de plástico. As membranas foram secas por 24 horas em estufa a $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ com fluxo de ar de 40%.

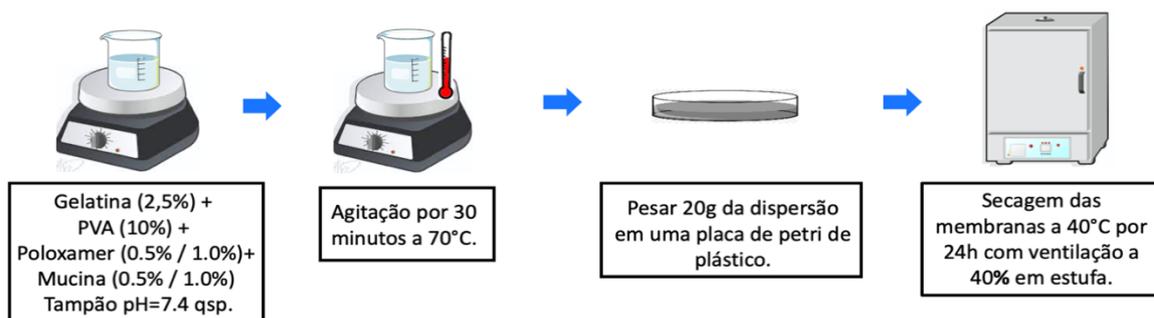


Figura 11. Esquema representativo da síntese das membranas poliméricas contendo mucina.

4.6.1. Caracterização das membranas poliméricas

4.6.1.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

As membranas produzidas e os componentes isolados foram analisados utilizando um espectrômetro Varian 640-IR FTIR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) com um acessório de imagem ATR (Reflectância Total Atenuada) no modo de transmitância. Os espectros foram registrados em comprimentos de onda entre $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$, com 64 scans e resolução de 4 cm^{-1} (Silva et al., 2022).

4.6.1.3. Calorimetria exploratória diferencial – DSC

A calorimetria exploratória diferencial foi realizada por um DSC-60 (Shimadzu®, Kyoto, Japão) sob uma atmosfera controlada por nitrogênio com fluxo de 50 mL min^{-1} . Amostras de aproximadamente 3 mg foram analisadas em uma panela de alumínio na faixa de temperatura de 25 a 230°C usando uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$. Os testes foram realizados com as membranas e os componentes isolados. Os dados térmicos foram analisados usando o software TA-60 Shimadzu® (Kyoto, Japão).

4.6.1.4. Análise termogravimétrica – TGA

As análises termogravimétricas foram obtidas por um DTG-60H (Shimadzu®, Kyoto, Japão) em panela de platina sob uma atmosfera controlada de nitrogênio com fluxo de 50 mL min^{-1} . Amostras de 3-5 mg foram analisadas na faixa de temperatura de 25 a 500°C a uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$. Os testes foram realizados com as membranas e os componentes isolados. As curvas da primeira derivada da

análise termogravimétrica (DTG) foram analisadas usando o software TA-60 Shimadzu® (Kyoto, Japão).

4.9.1.5. Propriedades mecânicas

A análise do perfil de textura foi realizada para medir as propriedades mecânicas das membranas, e um teste de tração foi realizado para mensurar sua força de ruptura, alongamento, tensão de ruptura e deformação (n=3). As análises foram realizadas utilizando um texturômetro (Stable Micro Systems TA-XT Plus) equipado com uma célula de carga de 5 Kg utilizando garras do tipo cunha que se movem horizontalmente para apertar e fixar a membrana (antes da análise) e verticalmente para realizar o teste de alongamento. As membranas com uma área de 10 cm² foram hidratadas em água por 1 min, o excesso foi retirado com papel filtro absorvente e fixadas adequadamente no aparato. A velocidade do teste foi definida para uma taxa de 2 mm.s⁻¹, o espaço entre as garras foi definido em 30 mm e a força inicial foi de 0,049N (Tensile strength/ Extensibility/Elongation – Tensile Grips, Ref: TRT1/TG). As amostras foram esticadas até a ruptura, e a tensão foi medida dividindo a força gerada durante a extensão pela área da seção transversal. O módulo de Young foi calculado pela relação entre a tensão e a deformação das membranas após a aplicação de uma força de tração (Figura 12). O alongamento (Δl) foi medido pela diferença entre o comprimento final (l_f) e o comprimento inicial (l_0). Por fim, o percentual da deformação (ϵ) foi calculado pela equação (2):

$$\epsilon (\%) = \frac{\Delta l}{l_0} \times 100$$

Equação 2

Onde Δl é o alongamento e l_0 o comprimento inicial, ambos obtidos em milímetros (mm).

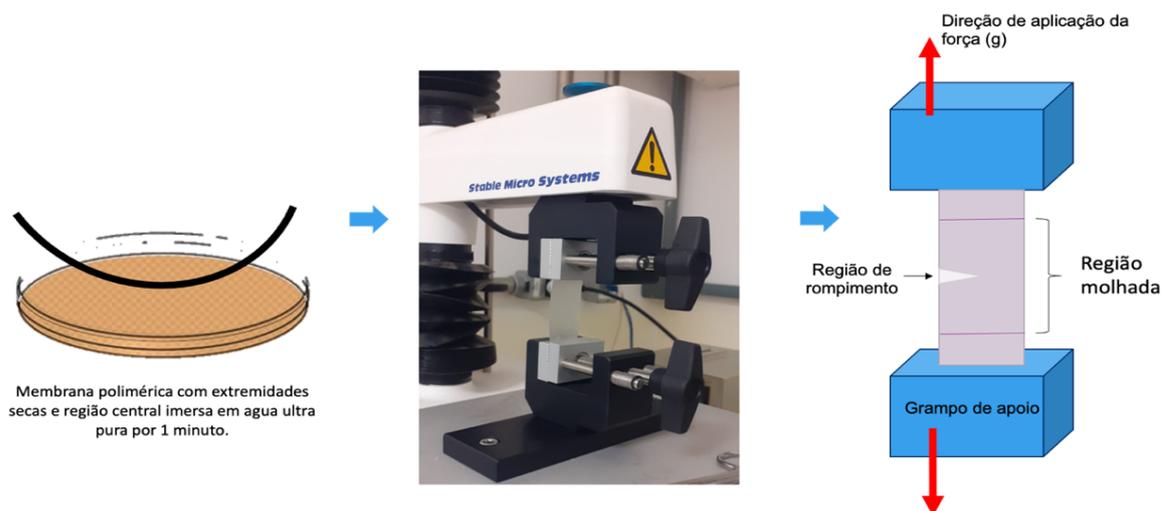


Figura 12. Esquema representativo do teste de propriedade mecânica realizado em texturômetro (Stable Micro Systems TA-XT Plus) com as membranas poliméricas contendo mucina.

4.6.1.6. Eficiência de intumescimento

O estudo de intumescimento das membranas foi realizado por contato em dispositivo com superfície hidratada, conforme a Figura 13. Para isso, um papel de filtro de 7 cm² foi fixado em cima do compartimento receptor das células de Franz para manter a água destilada em contato constante com o líquido que se difunde da câmara através do papel de filtro criando uma superfície hidratada. A membrana polimérica foi cortada em formato quadrado (1 cm²), pesada e então colocada em contato com a superfície hidratada do dispositivo por até 40 minutos. Em períodos definidos de tempos (1, 5, 10, 20, 30 e 40 minutos) a membrana foi removida do dispositivo e as medidas de massa foram mensuradas em balança analítica para avaliar a capacidade de reter o líquido. O grau de intumescimento (GI) foi obtido a partir do ganho percentual de massa da membrana úmida e calculado pela equação (3):

$$GI(\%) = \left(\frac{mf - mi}{mi} \right) \times 100$$

Equação 3

Onde *mf* é a massa final da membrana úmida e *mi* a massa seca da membrana. Cada amostra foi medida em triplicata.

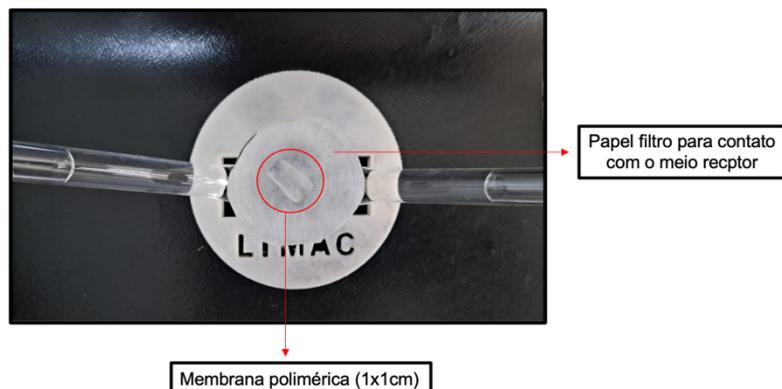


Figura 13. Teste adaptado de intumescimento por contato das membranas poliméricas utilizando célula de difusão de Franz.

4.7. Síntese de membranas híbridas baseadas em hidrogel contendo mucina dispersa

4.7.1. Síntese de Gelatina Metacrilato

Para a síntese de Gelatina Metacrilato (Figura 14), primeiro a gelatina tipo A foi dissolvida em tampão PBS pH 7,4 a 50°C. Após agitação, adicionou-se lentamente anidrido metacrílico e incubou-se por 4 horas, sob agitação e protegida da luz. Após a incubação realizou-se a precipitação da gelatina em acetona a 0°C e secagem do produto na estufa por 24h.

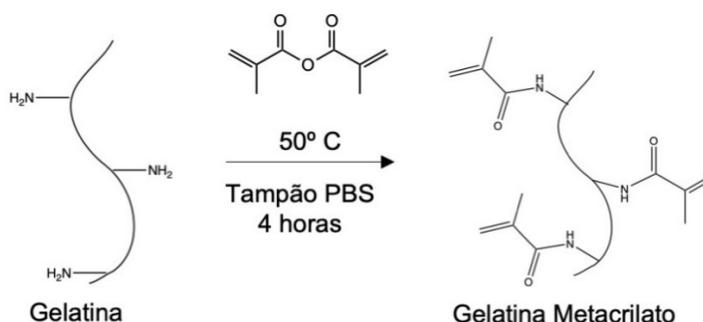


Figura 14. Reação da síntese de gelatina tipo A metacrilato. Imagens adaptadas de Duffy; David; Crouzier, (2015); Nichol et al., (2011).

4.7.2. Síntese de Mucina Metacrilato

A síntese de Mucina Metacrilato (Figura 15) foi realizada dissolvendo mucina tipo 2 em tampão PBS pH 7,4 a 50°C. Após agitação, adicionou-se lentamente

anidrido metacrílico e incubou-se por 6 horas, sob agitação e protegido da luz. Após a incubação realizou-se a precipitação da mucina em acetona a 0°C e secagem do produto na estufa a 40°C por 24h.

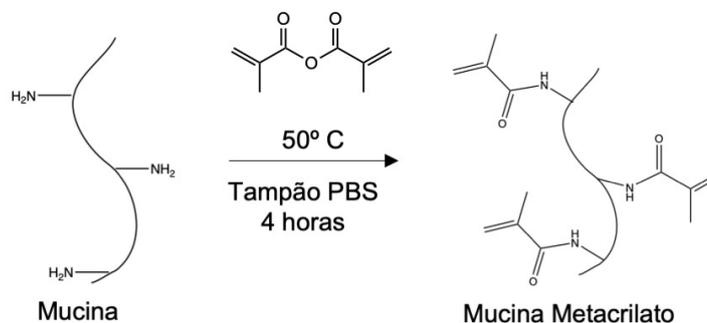


Figura 15. Reação da síntese de Mucina tipo II metacrilato. Imagens adaptadas de Duffy; David; Crouzier, (2015); Nichol et al., (2011).

4.7.3. Síntese das Membranas Híbridas Baseadas em Hidrogel.

As membranas híbridas baseadas em hidrogéis foram sintetizados por fotopolimerização dos macrómeros quando em solução com o fotoiniciador e expostos a luz UV (365 nm). Em um primeiro momento, a gelatina metacrilato é solubilizada em água de 40 a 50°C (protegida da luz) com variações de concentração de 1 a 50% (m/m), em seguida se adiciona uma solução de Irgacure® (100 mg/mL em etanol). Esta solução foi dispersa sobre um molde de forma que a altura do líquido ficasse entre 1 e 10 mm. Em seguida o molde foi exposto à luz UV (365 nm) por 8 min.

Sobre a primeira camada foi dispersa uma solução de Mucina Metacrilato - previamente solubilizada em água de 40 a 50°C (protegida da luz) com variações de concentração de 1 a 50 % (p/p) com uma solução Irgacure® (100 mg/mL em etanol) – de forma que a altura do líquido ficasse de 1 a 10 mm. O molde foi novamente exposto à luz UV (365 nm) por mais 3 minutos. Após o tempo de polimerização da segunda camada, uma terceira camada contendo 2-metacrilóioxetil fosforilcolina de 1 a 50% (m/m) solubilizada em água e com adição de Irgacure® (100 mg/mL em etanol) foi dispersa sobre o molde de forma que a altura do líquido também ficasse de 1 a 10 mm.

O molde foi novamente exposto à luz UV (365 nm) por 40 min. Após a cura por luz UV os moldes foram refrigerados de 2 – 8° C por 72 horas.

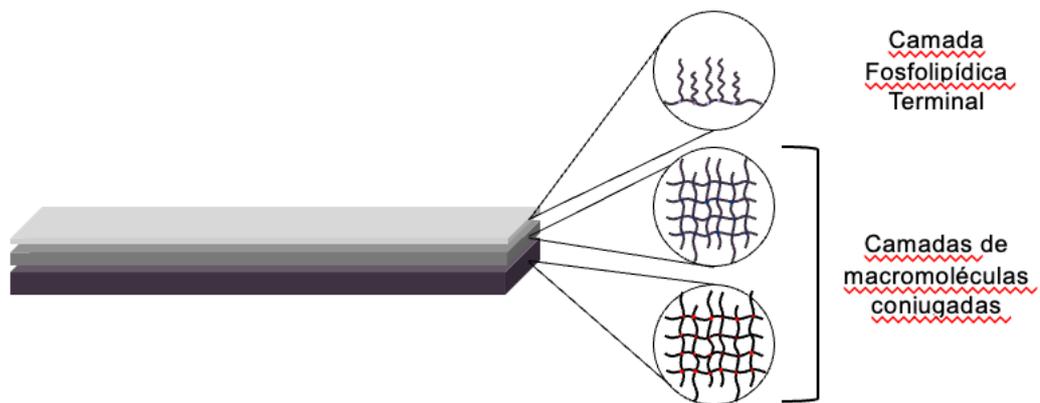


Figura 16. Esquema da composição das membranas híbridas baseadas em hidrogel de três camadas.

4.7.4. Caracterização das Membranas Híbridas Baseadas em Hidrogel

As caracterizações das membranas híbridas baseadas em hidrogel quanto a FTIR, DSC e TGA foram realizadas de acordo com os itens 4.6.1.2 a 4.6.1.4.

4.7.4.1. Caracterização das membranas híbridas baseadas em hidrogel quanto ao conteúdo de água

O conteúdo de água da membrana híbrida baseada em hidrogel foi medido gravimetricamente. Para isso, cada amostra foi levemente tocada em papel filtro para remover o excesso de água da superfície. Em seguida, foram pesadas em uma balança analítica. As amostras foram então secas durante 48 horas em estufa a 40°C com fluxo de ar de 40%. O conteúdo de água foi calculado pela equação abaixo:

$$CA (\%) = \frac{(mu - ms)}{mu} \times 100$$

Equação 4

Onde mu é a massa do hidrogel úmido e ms a massa do hidrogel seco. O experimento foi realizado em triplicata.

4.7.4.1. Análise morfológica das Membranas

A morfologia das membranas poliméricas e da membrana híbrida baseada em hidrogel, foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV JOEL, JSM-7000 IF). Para a análise, foram utilizadas membranas com área de 1x1mm na posição vertical e horizontal em um suporte. Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro e analisadas em aumento de 10 μm e 1 μm .

4.7.5. Prova de conceito para avaliação do modelo OphthalMimic

As membranas poliméricas (item 4.6) acopladas ao modelo OphthalMimic foram desafiadas utilizando as amostras de gel PLX16 e PLX16QS1,0 contendo FLU 0,2%, conforme descrito no item 4.2.4.2. Já a membrana híbrida baseada em hidrogel foi desafiada utilizando as formulações de gel PLX 14, PLX 16, PLX20, PLX16QS05, PLX16QS10, PLX16QS125 e uma solução aquosa de FLU 0,2%. Para isso, as formulações foram colocadas em contato com as membranas contendo mucina e depois lavadas com o fluxo lacrimal simulado.

A formulação lavada continuamente foi coletada e analisada quanto ao conteúdo de fármaco. A quantidade de fármaco coletada em vários tempos foi avaliada de acordo com a concentração inicial de fármaco adicionada à superfície da membrana mucoadesiva.

4.8. Análises estatísticas

A análise estatística dos dados foi conduzida com testes ANOVA one-way e *t-test* utilizando auxílio do software *GraphPad Prism 6 v.3.00* (La Jolla California, USA). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como critério para rejeitar a hipótese nula. Para a construção e análise dos gráficos, foi utilizado o programa *Oringin 8*. Já os dados referentes à penetração da CUR na córnea, obtidos através de fluorescência, foram processados utilizando o software *ImageJ*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte 1.

5.1. Concepção do compartimento doador no modelo dinâmico

A montagem e aperfeiçoamento do compartimento doador do modelo dinâmico contou com o total de seis versões, das quais cinco foram fabricadas em vidro (Unividros, Ribeirão Preto, São Paulo). A penúltima foi obtida via impressão 3D (FDM Voolt 3D, modelo Gi3) com polímero acrilonitrila butadieno estireno (ABS) para o refinamento das alturas dos canais (entrada e saída) e, assim, finalização em vidro.

O canal de saída foi produzido com diâmetro superior ao da entrada para evitar a pressão induzida. Uma bomba rotativa comercial integrada ao sistema fornece um fluxo adequado de fluido lacrimal simulado. Dois parâmetros críticos deste modelo foram (i) a altura do canal de saída, que determina o volume máximo de fluido acumulado na superfície ocular e (ii) o fluxo gerado pela bomba, que determina a drenagem da formulação.

Conforme ilustrado na Figura 17

, as diferenças entre as versões produzidas foram caracterizadas por nove parâmetros organizados entre aqueles capazes de afetar diretamente o fluxo lacrimal (associados ao eixo horizontal do compartimento doador) e a fatores geométricos relacionados às entregas das formulações em teste e acomodação do globo ocular (dispostos no eixo vertical do compartimento doador).

No primeiro caso, são considerados: (i) a direção mútua de entrada e saída do fluxo lacrimal representada pelo ângulo Θ ; (ii) a altura de entrada (H_{in}) e saída (H_{out}) do fluxo e; (iii) o diâmetro para entrada e saída do fluxo (d_{in} e d_{out}).

No que diz respeito aos parâmetros geométricos, além da altura global (H) do meio doador foram definidos dois casos específicos relacionados ao diâmetro interno no seu eixo vertical. No primeiro caso, foram considerados modelos que possuem um único diâmetro interno ao longo de toda sua altura, caracterizados apenas pelo parâmetro D_t . No segundo caso, são avaliados modelos que possuem alargamentos nas suas partes inferiores, empregados para facilitar o acoplamento do globo ocular, levando as versões a serem descritas tanto pelo diâmetro superior D_t , quanto por um novo diâmetro (maior), definido como o diâmetro inferior D_b .

Neste segundo caso é importante considerar a altura a partir de qual se inicia o alargamento do meio doador (H_b , H_{in} e H_{out}), uma vez que tal parâmetro demonstrou considerável impacto sobre a acomodação do globo ocular, conforme discutido a seguir.

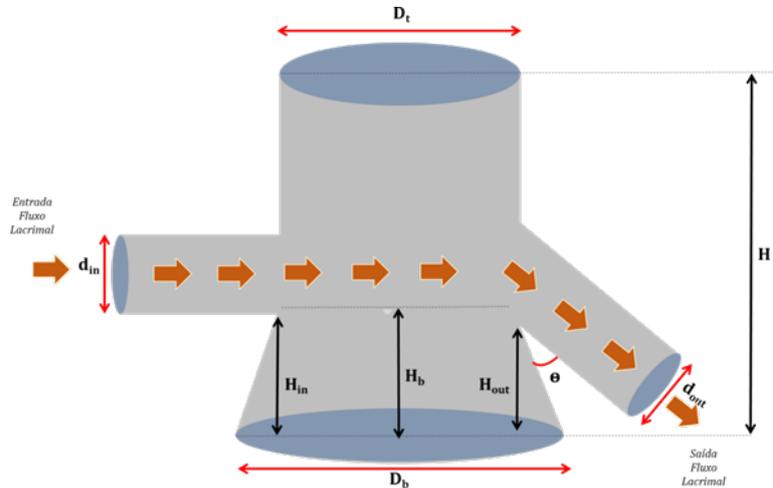


Figura 17. Esquema representativo dos parâmetros característicos do meio doador para fixação ocular no modelo dinâmico *ex vivo* de penetração ocular indicando as dimensões alteradas. Imagem adaptada de Barbalho et al., (2023).

Considerando-se a Figura 18 e a tabela 2, a primeira versão do compartimento doador contou com altura global (H) de 43,96 mm e é descrita por um único valor de D_t , ou seja, não apresentou alargamento inferior. No que diz respeito aos parâmetros de fluxo, foram obtidos valores similares entre si para as alturas H_{in} (8,70mm) e H_{out} (7,44mm). Os diâmetros de entrada e saída do fluxo lacrimal exibiram os valores de 2,05mm (d_{in}) e 3,61mm (d_{out}), respectivamente.

A direção do fluxo lacrimal, neste caso, foi estabelecida como colinear, ou seja, os fluxos de entrada e saída seguiram a mesma direção entre si, ambos formando um ângulo de 90° em relação ao eixo vertical (altura do compartimento doador). Esta versão se mostrou problemática por diferentes motivos, entre os quais se destaca a dificuldade de acoplar o globo ocular ao sistema e o represamento de fluidos (fluido lacrimal e formulação) em contato com a superfície ocular.

Buscando evitar a ocorrência do represamento de fluidos, alterações foram propostas tanto nos parâmetros de fluxo, quanto nos parâmetros geométricos (versões 2, 3 e 4).

Nas versões 2 e 3 optou-se por empregar ângulos $\Theta < 90^\circ$ na direção de saída do fluxo, buscando aumentar a ejeção de possíveis volumes de fluido represado, o que se mostrou uma abordagem bem-sucedida. Ainda nestas versões, os diâmetros

de entrada e saída do fluxo foram variados de modo que as razões entre os valores de d_{out} e d_{in} fossem sempre maiores em comparação com a primeira versão (Tabela 2). Isto de fato auxiliou na redução da quantidade de fluido represado no comportamento doador. É importante ressaltar que apesar das versões 2 e 3 apresentarem menor altura global (H) em relação ao primeiro compartimento doador, os valores de H_{in} , H_{out} , D_t , D_b , e H foram mantidos praticamente inalterados entre essas versões.

Portanto, tais versões permitiram explorar o papel da angulação e das razões entre os diâmetros de entrada e saída, demonstrando que estes são fatores chave para evitar o represamento de fluidos.

Levando em consideração as versões 3 e 4, buscou-se avaliar o papel do alargamento da parte inferior do meio doador, a fim de otimizar o acoplamento do globo ocular no sistema. Conforme mostrado na Tabela 2, observa-se que apesar do diâmetro inferior D_b ser igual nas duas versões, o parâmetro H_b (altura de onde se inicia o alargamento) assume os valores de 9,30 mm e 7,15 mm nas versões 3 e 4, respectivamente. Os testes de acomodação do globo ocular indicaram uma melhor performance para o maior valor de H_b (versão 3).



Figura 18. Imagens das versões dos compartimentos doadores fabricadas em vidro. Imagem adaptada de Barbalho et al., (2023).

Tabela 2. Parâmetros de fluxo e geométricos avaliados nas versões testadas do compartimento doador.

Versão	Parâmetros Fluxo							Parâmetros Geométricos			
	d _{in} (mm)	d _{out} (mm)	d _{out} / d _{in}	H _{in} (mm)	H _{out} (mm)	H _{in} / H _{out}	Θ	D _t (mm)	D _b (mm)	H _b (mm)	H (mm)
1	2,05	3,61	1,76	7,44	8,70	0,85	90°	12,18	-	-	43,96
2	2,61	5,34	2,04	4,30	3,00	1,43	< 90°	14,27	-	-	30,17
3	1,29	2,9	2,24	13,0	13,0	1,00	< 90°	14,37	20	9,30	28,08
4	1,26	2,95	2,34	10,8	11,5	0,93	90°	14,37	20	7,15	20,14
5	2,43	5,00	2,05	10,1	5,60	1,8 0	< 90°	13,38	20	12,7 2	18,63
6 (3D)	2,49	3,00	1,20	7,0	3,00	2,33	< 90°	12,14	20	8,44	18,12

Na versão 5 finalmente são combinadas todas as variáveis de otimização exploradas, como a angulação Θ , os diâmetros de entrada e saída e o alargamento inferior do meio doador; esta última variável teve um aumento do H_b para 12,72 mm. Além disso, outra variável ainda não explorada baseada no escoamento hidrodinâmico do fluido represado foi testada neste modelo.

Para esta finalidade, a versão 5 foi produzida buscando estabelecer um desnível mais significativo entre as alturas de entrada e saída do fluxo lacrimal. Esse desnível é indicado tanto na Figura 18, quanto através da razão H_{in}/H_{out} entre as alturas H_{in} e H_{out} (Tabela 2). Conforme esperado, o escoamento hidrodinâmico garantiu outra abordagem de otimização no compartimento doador, evitando o represamento de fluidos. Assim, a versão 5 foi escolhida para ser utilizada como compartimento doador no modelo dinâmico.

No que diz respeito à versão 6, obtida via impressão 3D (Figura 19), é importante destacar que, apesar de ser o mais fácil de produzir e ajustar seus parâmetros (além de potencialmente possuir o menor custo de fabricação), ao longo dos testes preliminares houve preocupação no que diz respeito à sua durabilidade e ao contato dos fármacos testados com as paredes poliméricas de tal compartimento. Desta forma, para prevenir a liberação de possíveis interferentes oriundos do material polimérico durante os testes, tal versão não foi considerada para as próximas fases do projeto.

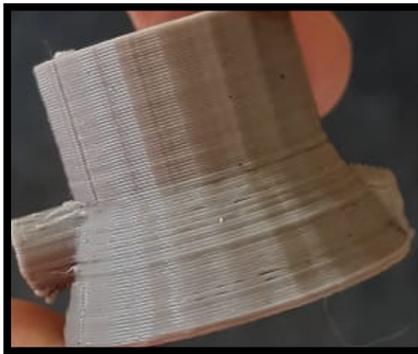


Figura 19. Imagem do compartimento doador, fabricado via impressão 3D.

A adaptação de testes estáticos de permeação de fármacos na via ocular, através da criação de canais adicionais relacionados a linhas de perfusão que simulam o fluxo lacrimal e a drenagem da superfície ocular, acrescentam uma maior complexidade a esses testes. Isso permite o estabelecimento de um modelo mais sensível para evidenciar o impacto no perfil de permeação do fármaco resultante de pequenas diferenças entre as formulações testadas.

Isso ocorre porque a dinâmica da área pré-corneal tem um impacto extremo na absorção do fármaco, pois diminui o tempo de contato da formulação com a superfície de absorção (Almeida et al., 2015).

No entanto, existem diversos fatores que influenciam o desempenho da formulação em termos de permeação de fármacos e tempo de permanência (Estlack et al., 2017). Muitos desses fatores ou características da formulação podem não ser evidenciados por experimentos de permeação estática, por isso métodos incluindo variáveis dinâmicas podem ser mais sensíveis do que métodos estáticos.

Em condições fisiológicas, o filme lacrimal é submetido a um ciclo contínuo de produção, evaporação, absorção e drenagem, o que leva a um equilíbrio dinâmico. Logicamente o “*clearance*” da formulação não pode ser extrapolado levando-se em consideração apenas a renovação basal, visto que, após a administração oftálmica, inicia-se o mecanismo de reflexo de defesa. Esse mecanismo tem início com a produção extra de fluido lacrimal e reflexos mecânicos, como a alteração da frequência do piscar, incrementando a drenagem.

Portanto, a drenagem de fármaco da câmara doadora proposta aqui não tem a pretensão de produzir resultados que possam ser diretamente correlacionados com a biodisponibilidade *in vivo*. Ainda assim, um experimento de permeação *ex vivo* que

leva em consideração, pelo menos a depuração basal esperada, pode fornecer muita informação sobre o desempenho esperado de uma formulação *in vivo*, sendo útil, portanto, para comparar conjuntos de formulações.

5.2. Descrição matemática dos efeitos da depuração do sistema

Considerando que a depuração do sistema pode levar à ejeção de uma quantidade considerável da formulação em contato com a superfície ocular, buscou-se através de uma abordagem matemática obter o entendimento quantitativo sobre o volume disponível no sistema em função do tempo. Assumindo que as depurações adotadas aqui (11 %/min, 16%/min e 2min a 16% + 13 min a 11%) são constantes e levam a uma redução progressiva e não linear da quantidade de formulação no compartimento doador, foi possível estimar a evolução temporal do volume disponível neste compartimento.

Tomando inicialmente como caso de estudo a menor depuração de 11%/min, verificou-se que após os três primeiros minutos de ensaio o volume disponível foi para 89%; 79,21%; e 70,51% do seu valor inicial, respectivamente. Este comportamento revela um perfil exponencial decrescente associado a depuração do volume de formulação, demonstrado pela Equação 1.

Sem perda de generalidade, esta abordagem matemática também foi aplicada para o caso da depuração ajustada em 16%/min. A Figura 20 demonstra a evolução do percentual de volume disponível no meio doador em função do tempo para as depurações de 11%/min (linha verde) e 16 %/min (linha vermelha), respectivamente, rendendo os coeficientes de depuração de $0,117 \text{ s}^{-1}$ e $0,174 \text{ s}^{-1}$ para estas condições.

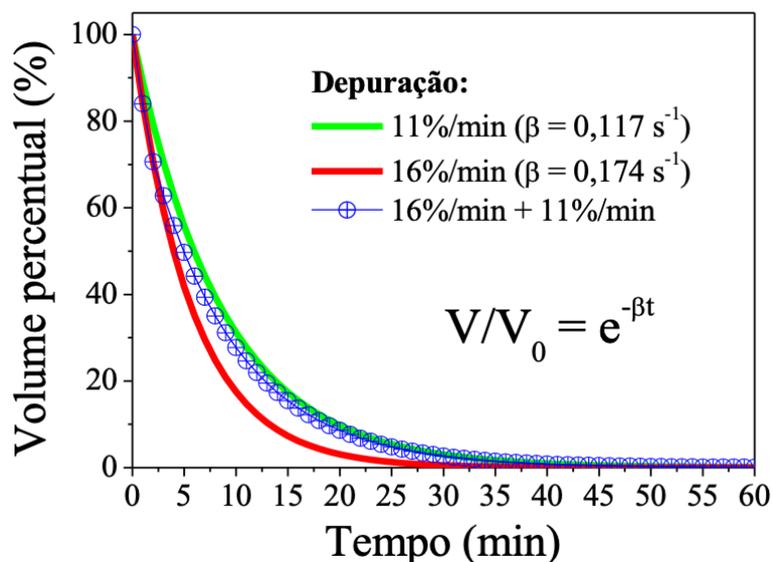


Figura 20. Simulação matemática da evolução temporal do percentual de volume disponível no meio doador em função da depuração empregada. Fluxos lacrimais de $33 \mu\text{L}/\text{min}$, $48 \mu\text{L}/\text{min}$ e da combinação de ambos são representados em verde, vermelho e azul, respectivamente. Imagem adaptada de Barbalho et al., (2023).

Conforme esperado, para tempos fixos o volume disponível é maior quanto menor o coeficiente de depuração. Por exemplo, comparando ambos os casos, após 15 minutos de operação do sistema o volume foi reduzido para 17,29% e 7,35% do seu valor inicial sob depurações de 11 e 16 %/min, respectivamente. Conforme mostrado na Tabela 3, um aspecto central desta modelagem matemática da depuração do sistema foi a possibilidade de correlacionar o volume disponível de formulação com os resultados obtidos nos ensaios de permeação.

Tabela 3. Volume percentual disponível no compartimento doador no modelo dinâmico de penetração ocular previsto matematicamente em função das condições de depuração adotadas.

Tempo (min)	Volume Percentual disponível (%)		
	1° Condição (11%/min)	2° Condição (16%/min)	3° Condição (16%/min-11%/min)
0	100	100	100
1	88,96	84,03	84,03
2	79,14	70,61	70,61
3	70,40	59,33	62,81
4	62,63	49,86	55,88
5	55,71	41,90	49,71
6	49,56	35,20	44,22
7	44,09	29,58	39,34
8	39,22	24,86	34,99
9	34,89	20,89	31,13
10	31,04	17,55	27,69
11	27,61	14,75	24,64
12	24,56	12,39	21,92
13	21,85	10,41	19,50
14	19,44	8,75	17,34
15	17,29	7,35	15,43

No que diz respeito à terceira condição, a adoção de dois regimes de fluxo (depuração) pode ser modelada sequencialmente, estimando-se a evolução percentual em dois estágios. O primeiro estágio obedecendo à expressão $V(t) = 300e^{-0,174t}$, equivalente aos primeiros dois minutos, e o segundo estágio sendo expresso pela equação $V(t) = 211,83e^{-0,117(t-2)}$ nos tempos posteriores.

É importante notar que na primeira expressão, o coeficiente β equivale ao valor encontrado para a maior depuração (16%/min) e o volume inicial corresponde ao volume total no compartimento doador (300 μ L). Por outro lado, na segunda expressão assume-se como volume inicial a quantidade disponível após este primeiro regime de depuração (ocorrido nos primeiros dois minutos), ou seja, 211,83 μ L. Além disso, é importante notar que o coeficiente de depuração nesta segunda expressão corresponde àquele encontrado para a depuração de 11%/min. A alteração sutil no parâmetro temporal levou à mudança de t para $(t - 2)$, que foi necessária pois, neste segundo estágio, os primeiros dois minutos já foram decorridos. Através desta

descrição sequencial foi mostrado que operando-se o sistema à 16%/min nos primeiros 2 minutos e continuando a operação por mais 13 minutos, o valor percentual de volume disponível resulta em 15,43%, diferindo do que é encontrado no mesmo tempo para as outras condições. A evolução do percentual de volume disponível em função do tempo neste caso segue o perfil bi-exponencial, demonstrado pelas esferas azuis da Figura 20.

5.3. Fixação dos globos oculares e montagem do modelo *dinâmico* (passo a passo)

Para a fixação dos globos oculares no modelo dinâmico foram necessárias adaptações da montagem tradicionalmente adotada nos testes estáticos. Neste caso, uma placa de cultura celular de doze poços foi adaptada para atuar como compartimento receptor, onde o globo ocular foi inserido, entre o poço desta placa e o compartimento doador (Figuras 21 a 25).

Vale destacar que os poços vazios adjacentes foram utilizados como recipientes para coleta do fluxo lacrimal. Ou seja, ao lado de cada poço contendo o globo ocular, também há um poço específico para a coleta de fluidos que escoam pela superfície ocular durante o teste.

Para a fixação adequada de todos os elementos no sistema, foram projetadas por meio de impressão 3D, duas placas planas poliméricas. E com o auxílio de parafusos geometricamente equilibrados foi possível garantir o melhor ajuste do sistema. Ambas as placas possuem as mesmas dimensões e diferenciam-se apenas pelo fato de que a placa inferior é totalmente plana, enquanto a placa superior possui oito aberturas que se encaixam perfeitamente ao diâmetro D_t do compartimento doador.

Passo a passo da montagem do Modelo Dinâmico *ex vivo* de olho suíno

1º passo:

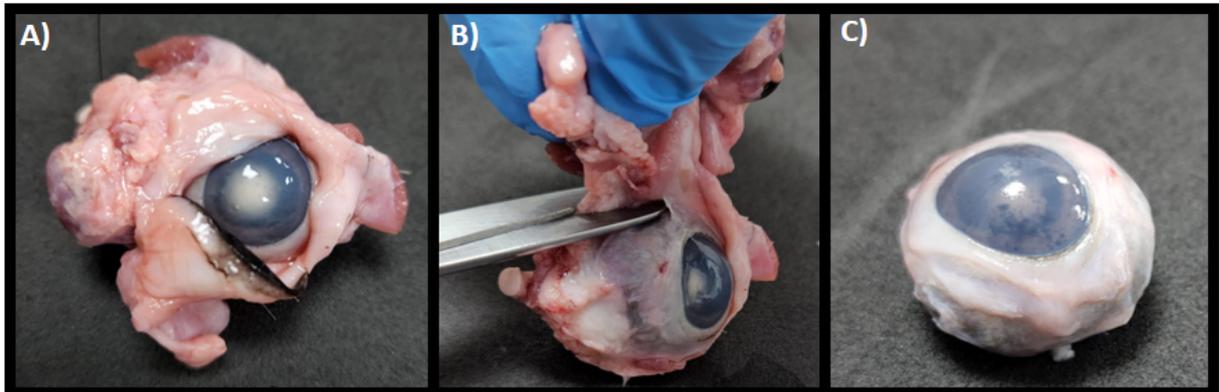


Figura 21. Dissecação ocular. A) Globo ocular com pálpebras. B) remoção das pálpebras do globo ocular. C) Globo ocular limpo, pronto para o experimento.

2º passo:

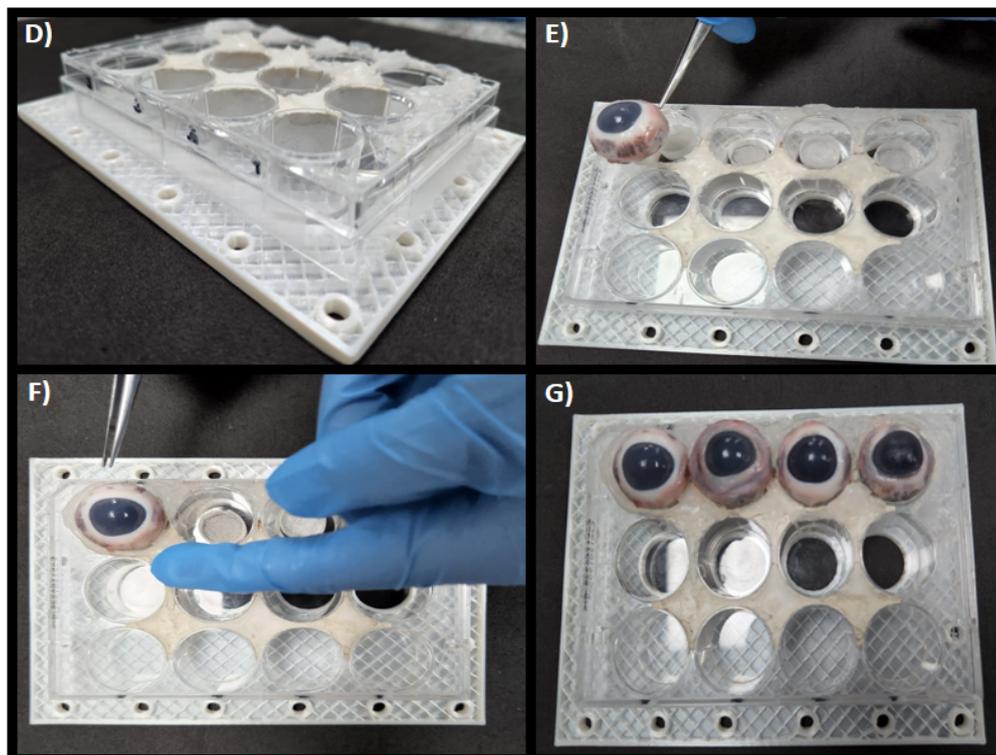


Figura 22. Montagem da base de encaixe dos globos oculares. D) placa de 12 poços posicionada junto ao suporte 3D inferior. E) e F) Posicionamento do globo ocular. G) Quadruplicata de globo ocular posicionada na placa.

3° Passo:

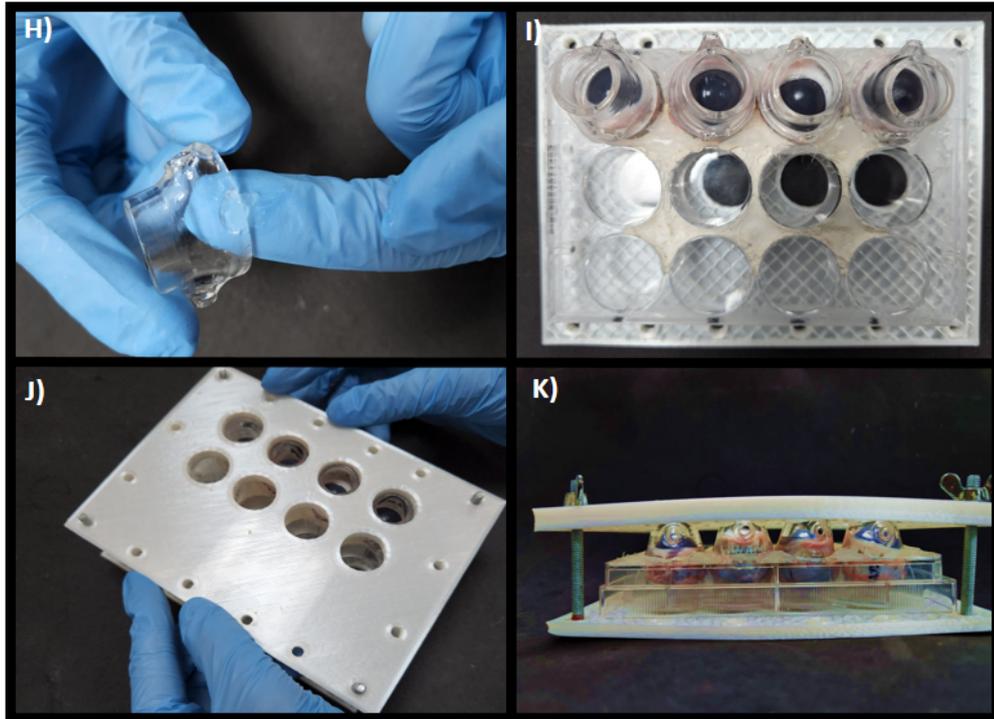


Figura 23. Montagem superior do modelo dinâmico. H) Graxa de silicone passada nas laterais do meio doador para evitar vazamento da formulação. I) Meios doadores fixados aos globos oculares. J) Fechamento do sistema com a tampa superior impressa em 3D. K) Montagem do modelo finalizada para acoplar as mangueiras de fluxo.

4° passo:

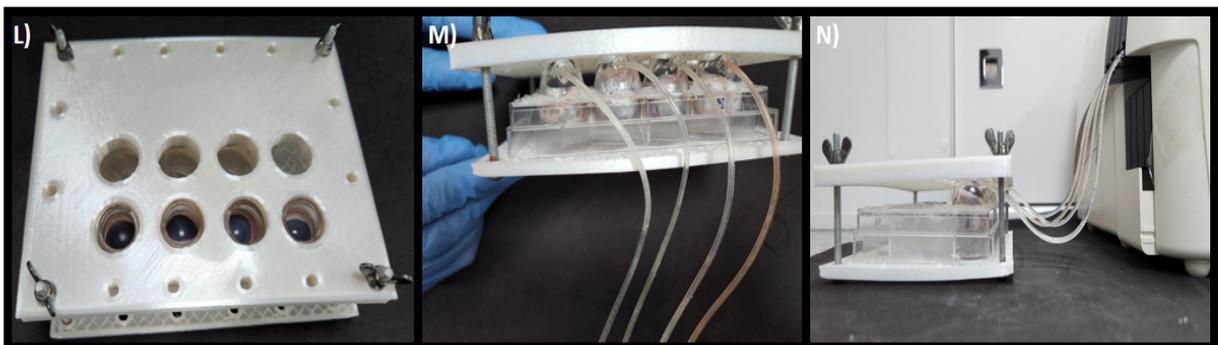


Figura 24. L) Modelo mostrando as córneas expostas. M) Mangueiras de fluxo acopladas a entrada do meio doador. N) Modelo dinâmico completamente montado: à esquerda os meios doadores e receptores fixados, ao centro a bomba peristáltica e à direita um béquero contendo a solução lacrimal.

5º passo:

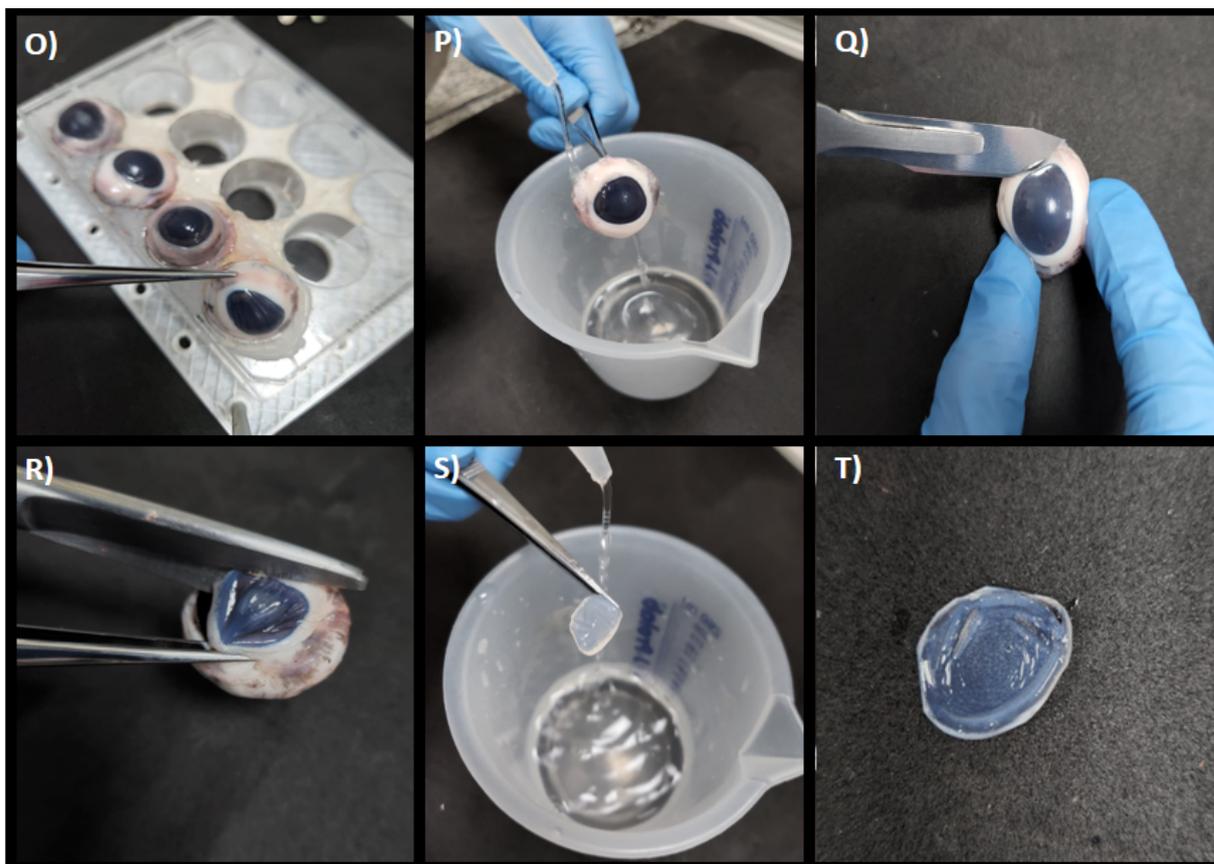


Figura 25. O) Retirada do Globo ocular após o teste. P) Lavagem do Globo ocular inteiro com água ultrapura para retirada do excesso de formulação. Q) Perfuração do globo ocular com bisturi. R) Remoção da córnea. S) Lavagem da córnea após remoção. T) Córnea excisa pronta para o processo de extração do fármaco.

O compartimento doador do sistema foi projetado e construído para ser conectado a uma bomba peristáltica (MINIPLUS evolution, Gilson, Middleton, EUA), mantendo uma vazão de tampão fosfato isotônico pH 7,4, com o objetivo de mimetizar o fluxo lacrimal sobre a superfície do olho. Assim, o compartimento doador foi preenchido com o volume das formulações em gel ou solução aquosa de FLU. Imediatamente após a instilação de cada formulação, a bomba peristáltica foi ligada e o fluxo de solvente aquoso iniciado.

Após os 15 minutos totais de experimento, o globo ocular foi removido do dispositivo, e as córneas foram separadas para extração dos fármacos (Figura 25). Para retirar o excesso de fármaco da superfície da córnea, o globo ocular inteiro foi lavado com água ultrapura. Em seguida, após a córnea ser excisada, foi lavada novamente. Por fim, as córneas foram picotadas e inseridas em frascos de vidro

âmbar, onde foram adicionados 5 mL de tampão HEPES para recuperação do fármaco, seguindo o protocolo de extração do FLU. Ao fim, foi realizada a coleta e filtração (em membrana de 0,45 µm) de cada amostra para análise em HPLC.

5.4. Estabelecimento das condições de operação do modelo dinâmico de penetração ocular

Após a montagem do sistema, as placas fixadas contendo os globos oculares foram conectadas à bomba peristáltica conforme mostrado na Figura 24. Isto permitiu a exploração das variáveis de operação do modelo dinâmico de penetração ocular como: (i) o volume de formulações aplicado no compartimento doador, (ii) as configurações de fluxo da bomba peristáltica, e (iii) o tempo de residência da formulação sobre o globo ocular.

A respeito da primeira variável optou-se por injetar o volume máximo de formulação que o compartimento doador é capaz de comportar. Assim, ficou padronizada a aplicação de 300 µL das formulações em teste para todos os ensaios, garantindo o fluxo e depuração adequado produzido pela bomba peristáltica.

Sendo a depuração um fator crucial para a performance do modelo, buscou-se realizar os testes em condições capazes de emular o comportamento descrito em condições *in vivo*, ou seja, depurações de ~11-16% /min. Essa finalidade foi alcançada operando a bomba peristáltica sob rotações de 9 rpm e 11 rpm, o que estabelece fluxos de 33 µL/min e 48 µL/min no sistema, os quais, por sua vez, correspondem a depurações de 11%/ min e 16 %/min, respectivamente. Tais valores foram adotados ao longo dos ensaios.

Buscando estabelecer relações entre o tempo de penetração da formulação e a performance do modelo, foram estabelecidas condições de operação de acordo com a simulação matemática da evolução temporal do percentual de volume disponível no meio doador em função da depuração empregada, conforme descrito na Figura 26.

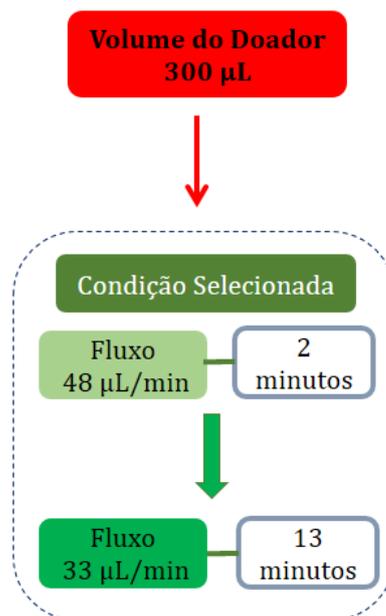


Figura 26. Esquema operacional do modelo dinâmico destacando a condição de operação.

Com base na simulação matemática foram estabelecidos 2 diferentes regimes de fluxo e tempo de operação, da seguinte maneira: com um volume no compartimento doador de 300 μL o sistema foi inicialmente operado sob um fluxo de 48 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante os primeiros 2 minutos de teste. Posteriormente, o fluxo foi reduzido para 33 $\mu\text{L}/\text{min}$, mantido até completar o tempo de 15 minutos. Ou seja, sob um fluxo lacrimal menor, o sistema continuou operando por mais 13 minutos.

5.5. Estudos de penetração com formulações contendo fármaco modelo (FLU)

A escolha dos géis de PLX/FLU e PLX/QS/FLU permitiram a avaliação da capacidade do sistema em interagir com formulações, apresentando propriedades de viscosidade e mucoadesão distintas. Considerando inicialmente os géis de PLX/FLU, conforme apresentado na Figura 27, foi possível verificar que a quantidade de FLU permeado na córnea não apresentou diferença estatística significativa, demonstrando que os resultados independem das porcentagens de PLX que alteram de forma direta a viscosidade da formulação. Apesar desse fato, os resultados apresentados em ambos os modelos (estático e dinâmico) sugerem que a permeação não é favorecida por este parâmetro físico.

Contudo, comparando o mesmo grupo de amostras de PLX/FLU, podemos observar na relação entre modelos que os resultados apresentados no ensaio estático

com células de difusão de Franz são maiores em relação ao grupo submetido ao modelo dinâmico.

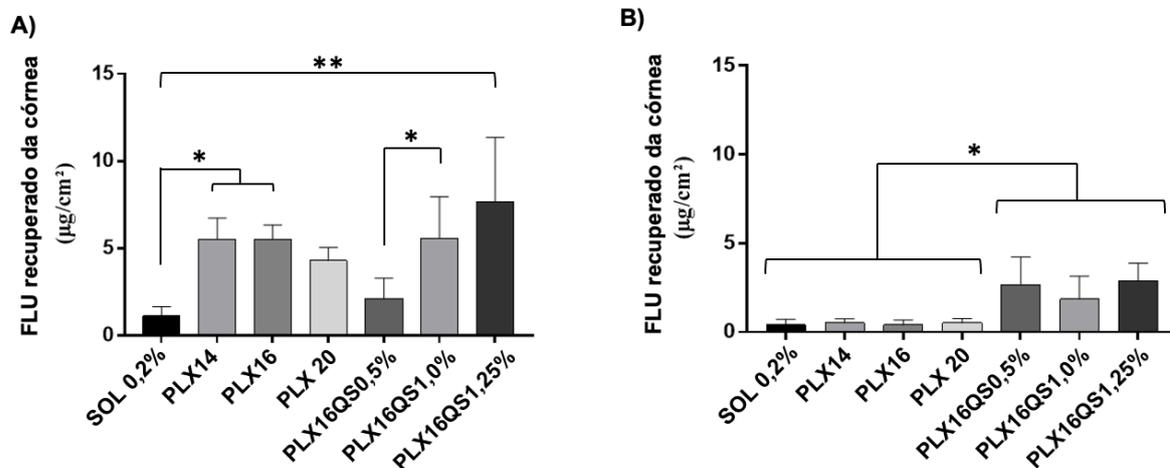


Figura 27. Resultados do ensaio de permeação do FLU em diferentes formulações de PLX e PLX contendo QS nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,25%. A) Resultados de penetração do FLU em córnea no modelo ESTÁTICO *ex vivo* por 15 min. B) Resultados de penetração do FLU em córnea sob ação de FLUXO LACRIMAL seguindo a 3ª condição do modelo (2 minutos sob depuração de 16 %/min + 13 minutos sob depuração de 11%/min). Imagem adaptada de Barbalho et al., (2023).

Nos ensaios utilizando géis com e sem QS foi possível verificar claramente que a presença da QS aumenta a efetividade da penetração de FLU em ambos os modelos. Esse fato está correlacionado com o aumento da mucoadesividade da formulação, a qual é favorecida principalmente pela presença dos grupos funcionais amino ($-NH_2$) na estrutura da QS (Ibrahim et al., 2023). Devido a esses grupos funcionais, os géis contendo QS tem a capacidade de aderir à mucina presente na superfície da córnea através da formação de interações químicas por atração eletrostática (Pai; Monpara; Vavia, 2019).

De acordo com os resultados, fica claro que os ensaios estáticos superestimam os valores de permeação de ativos nos géis contendo QS, cerca de duas vezes o valor, e nos géis de PLX cerca de cinco vezes o valor. Contudo, quando observamos os resultados de penetração apresentados pelos géis contendo QS no modelo estático foi observada diferença estatística significativa entre PLX16+QS0,5% e PLX+QS1,0%, quando a concentração do componente mucoadesivo dobrou. Foi observada também uma tendência nos resultados dessas formulações: quanto maior a porcentagem de QS, maior a mucoadesividade exercida pela formulação, e, por sua

vez, maior quantidade de FLU permeando na camada da córnea. Esse fato pode ser explicado pelo formato da córnea posicionado na célula de difusão do tipo Franz modificada não reproduzir o formato do globo ocular, permitindo que a formulação permaneça maior tempo de residência na superfície de contato, e, conseqüentemente, maiores interações químicas com as mucinas na superfície dos olhos.

Comparando o mesmo grupo de géis contendo QS, mas agora submetidos ao ensaio no modelo dinâmico, os resultados afirmam mais uma vez o sucesso desse modelo de penetração ocular. O modelo dinâmico demonstrou valores contundentes para as formulações com o componente mucoadesivo, exibindo comportamento esperado: mostrou que o aumento do percentual de QS não altera a penetração nesse modelo, sugerindo que as formulações sofrem uma força de drenagem, sendo então lavadas da superfície da área aplicada e reduzindo as interações químicas entre a QS e a mucina da camada da córnea. Assim, o modelo dinâmico proporcionou maior complexidade ao teste e se mostrou mais sensível e realista quanto ao perfil de penetração de medicamentos na córnea.

5.6. Formulações contendo curcumina

Formulações inovadoras contendo CUR foram testadas para desafiar o modelo *ex vivo* de penetração ocular com fluxo lacrimal simulado (modelo dinâmico) e o modelo estático. As características das formulações seguem descritas nas seções abaixo.

5.6.1 Lipossomas

Os lipossomas contendo CUR – LP-CUR (Figura 28) apresentaram um diâmetro hidrodinâmico de $143,20 \pm 1,16$ nm. O índice de polidispersão foi de $0,09 \pm 0,02$, indicando a preservação das características de monodispersão e uniformidade desejáveis. O potencial zeta da formulação registrou um valor de $-13,87$ mV.

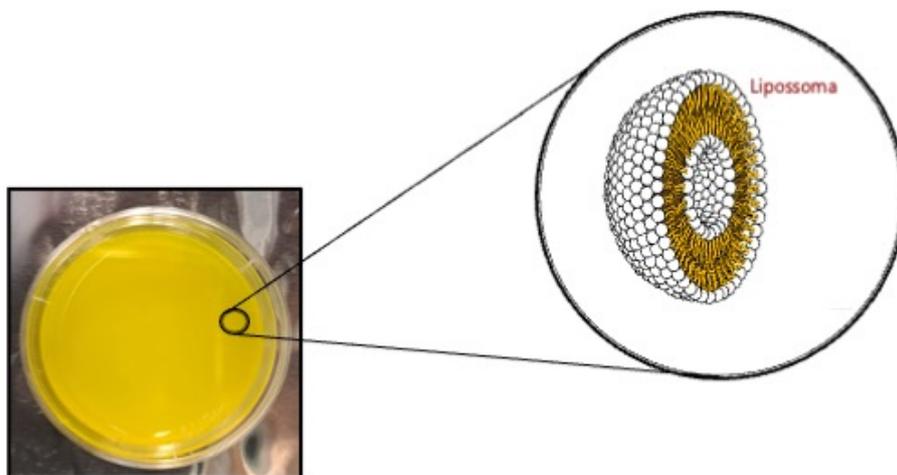


Figura 28. Formulação de lipossomas (LP-CUR) contendo curcumina.

5.6.2 Nanoemulsão não aquosa baseada em solventes Alcanos Semifluorados

A nanoemulsão contendo CUR – NANE-CUR (Figura 29) foi obtida por meio de uma mistura de solventes constituída por alcanos semifluorados, conforme descrito por Agarwal et al. (2018). Apresentou tamanho de partícula de $38,41 \pm 1,35$ nm e índice de polidispersão de $0,25 \pm 0,01$.

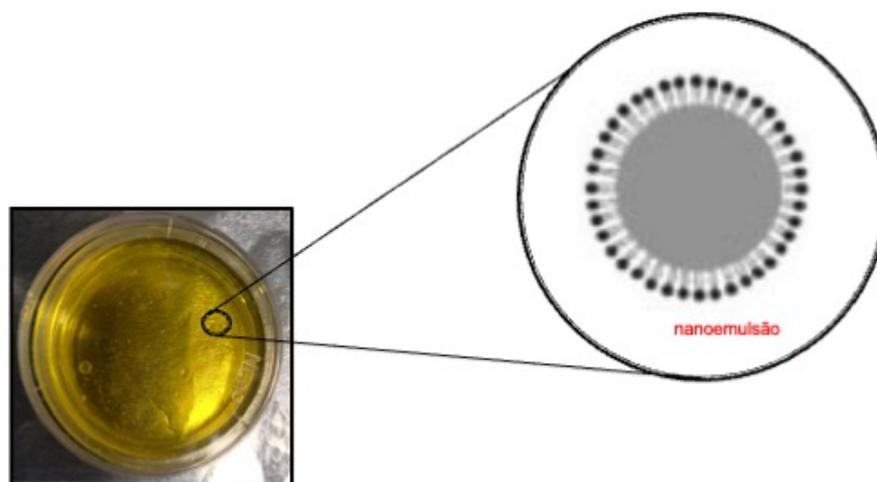


Figura 29. Formulação de nanoemulsão (NANE - CUR) contendo curcumina.

5.6.3 Solução oleosa

Uma solução oleosa foi utilizada como controle, representando uma formulação convencional. Após a produção da formulação, a solução de triglicerídeo caprílico de

cadeia molecular média contendo CUR – MCT-CUR (Figura 30) apresentou-se de forma homogênea, e translúcida quando completa a solubilização do fármaco.

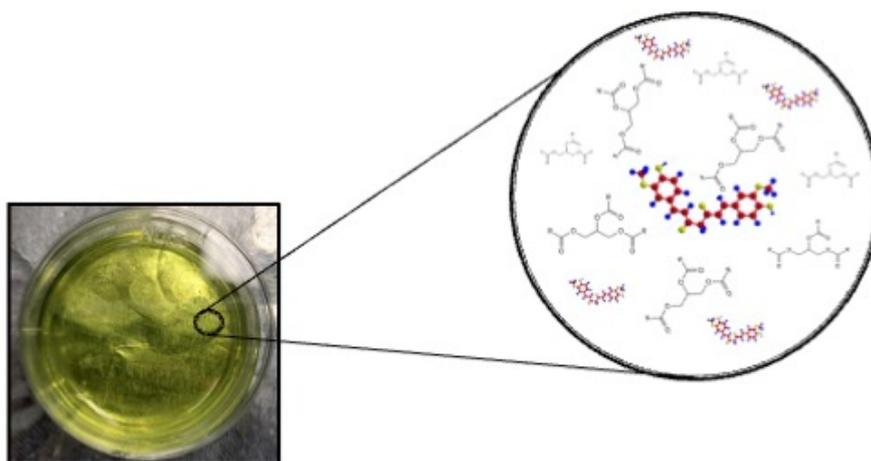


Figura 30. Solução oleosa (MCT - CUR) contendo curcumina.

5.7.1 Penetração ocular *ex vivo* de curcumina na região central e lateral da córnea nos modelos dinâmico e estático.

O ensaio de penetração ocular buscou desafiar os modelos dinâmico e estático com formulações inovadoras contendo CUR.

A análise da penetração das formulações MCT-CUR, LP-CUR e NANE-CUR na região central da córnea pode ser visualizada na Figura 31, apresentando ambos os modelos de penetração de olho inteiro (Dinâmico - com fluxo lacrimal simulado - e Estático - sem fluxo lacrimal simulado).

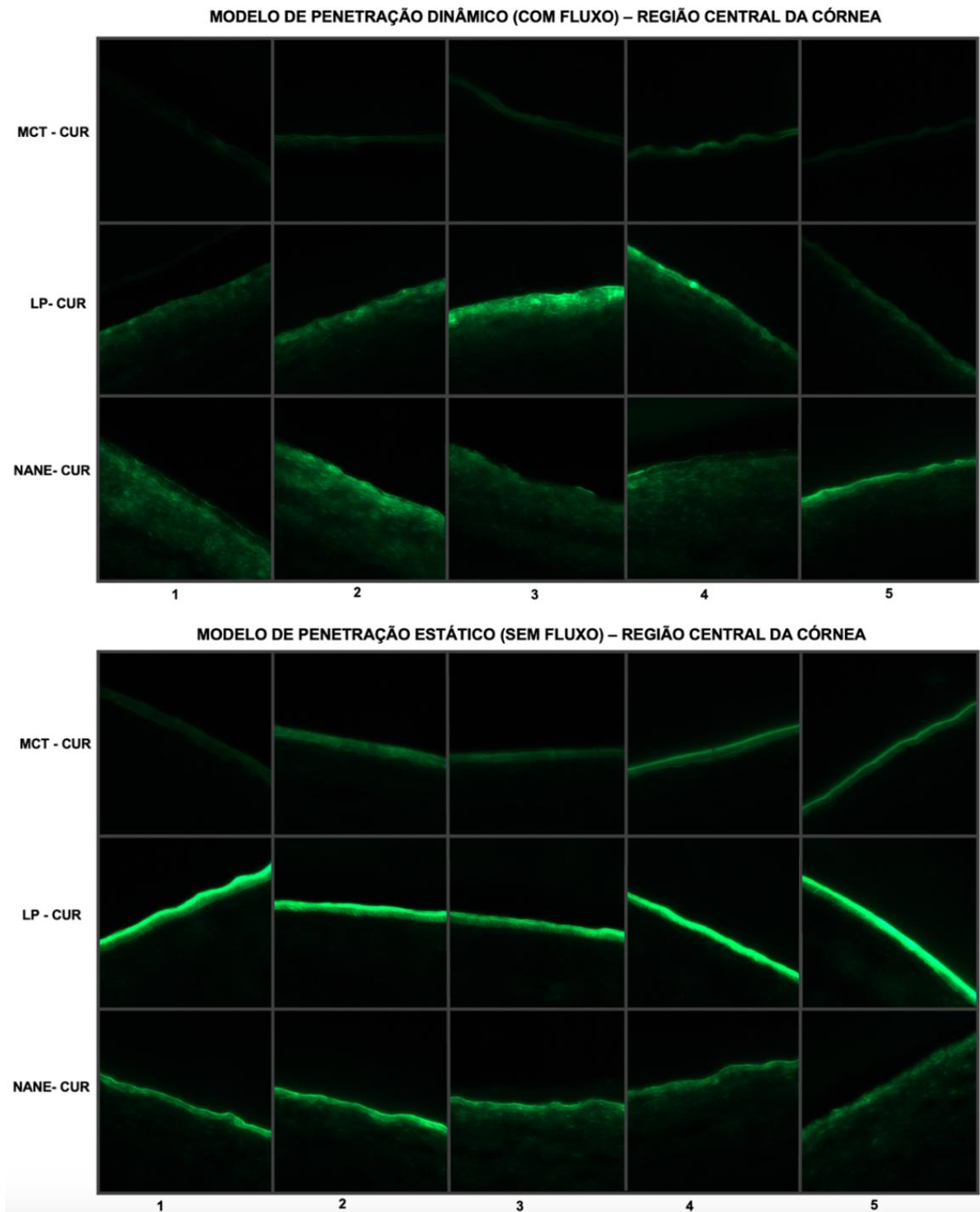


Figura 31. Resultado representativo das imagens capturadas por microscopia de fluorescência da penetração de CUR no epitélio corneano no modelo de penetração de olho inteiro dinâmico (com fluxo) e no modelo estático (sem fluxo), na região central da córnea através das formulações MCT-CUR, LP-CUR, NANE. A posição das imagens está representada dos números de 1-5.

A formulação MCT-CUR foi utilizada como controle, representando uma formulação convencional e apresentou menor intensidade de fluorescência,

confirmando uma dificuldade de entrega do ativo na penetração ocular em ambos os modelos de penetração. Quando exposta ao modelo dinâmico (com fluido lacrimal simulado) apresentou menor penetração, o que pode ser explicado pela baixa capacidade mucoadesiva da formulação, levando a uma alta drenagem pelo fluxo simulado. Dessa forma, foram demonstradas as mesmas dificuldades descritas para formulações convencionais, resultando em baixas concentrações nos tecidos oculares devido ao baixo tempo de residência, causando uma biodisponibilidade oftálmica bastante reduzida.

A penetração da CUR liberada pelo LP-CUR no modelo de penetração dinâmico apresenta uma intensidade de fluorescência mais baixa. No entanto, é possível observar uma penetração mais profunda nas camadas da córnea quando comparada ao modelo estático. Nesse modelo, a CUR liberada pelo LP-CUR apresentou uma alta intensidade de fluorescência, contudo sua concentração ficou delimitada no epitélio corneano, sugerindo a formação de um filme superficial por conta do ressecamento da córnea.

Diante desses resultados, os LP-CUR, devido a sua composição e estrutura semelhante às membranas celulares, poderiam aumentar a taxa de liberação e a penetração de medicamentos na superfície ocular, resultando em uma biodisponibilidade oftálmica melhorada (Chudasma et al., 2023). Além disso, de acordo com alguns estudos, o desenvolvimento de lipossomas podem, de fato, aumentar a penetração em todas as camadas epiteliais da córnea e são capazes de atingir o estroma (Agarwal et al., 2016; López-cano et al., 2021; Natarajan et al., 2012; Soriano-romaní et al., 2017). Entretanto, a LP-CUR não apresentou penetração nas camadas mais profundas da córnea pelo modelo estático, apenas no modelo com fluxo lacrimal simulado.

Isso pode ser explicado pela influência do fluxo lacrimal simulado, permitindo a movimentação das nanoestruturas sobre a superfície do olho, evitando secagem, e, conseqüentemente, a liberação e penetração do ativo. Além disso, outro mecanismo pode ser sugerido para explicar essa penetração, sendo por meio da fusão da membrana plasmática das células com a membrana lipossomal, o que leva à liberação simultânea do conteúdo veiculado pelo lipossoma no citoplasma (Sheikholeslami et al., 2022). Esses dados corroboram o entendimento dos potenciais mecanismos de penetração realizado pelo LP-CUR em ambos os modelos testados, visto que em

ambos os modelos (dinâmico e estático) o lipossoma aumentou a prevalência da CUR na superfície da córnea.

Já a NANE-CUR teve penetração mais profunda nas camadas da córnea em ambos os modelos de penetração (dinâmico e estático), podendo ser observada entrega da CUR até o estroma. Devido às propriedades apresentadas por esse sistema, a NANE-CUR possui características capazes de interagir com as camadas do filme lacrimal do olho (camada lipídica, camada aquosa e camada de mucina) para aumentar o tempo de residência, o espalhamento das gotículas na superfície ocular, e portanto, aumentar a biodisponibilidade do ativo (Singh et al., 2020).

Outra característica importante para o sucesso na penetração da CUR tendo a NANE-CUR como veículo está no tamanho de partícula apresentado. O tamanho das partículas ficou em 35 ± 16 nm e com índice de polidispersão de $0,09 \pm 0,02$. De acordo com a literatura, faixa de tamanhos nanométrico (100-200 nm) para nanoemulsões podem ser internalizadas por mecanismos de captação de endocitose mediados por receptores através das células presentes na córnea (Youssef et al., 2021). Além disso, sistemas nanoemulsionados contendo pequenas gotas apresentam uma possibilidade aumentada de cobrir uma grande área de superfície do olho, permitindo maior penetração do ativo (Shaker et al., 2019).

Contudo, para a região central, resultados semelhantes foram obtidos. A formulação controle teve menor penetração nos dois modelos. Enquanto a formulação de LP apresentou maior intensidade de fluorescência nos dois modelos, logo uma maior penetração de curcumina foi observado na superfície da córnea. A NANE-CUR teve uma profundidade de penetração maior quando comparada as outras formulações, esse ocorrido pode ser explicado pela capacidade da nanoemulsão em manter a superfície do olho hidratada.

A análise da penetração das formulações MCT-CUR, LP-CUR e NANE-CUR na região lateral da córnea pode ser visualizada na Figura 32, apresentando ambos os modelos de penetração de olho inteiro (Dinâmico - com fluxo lacrimal simulado; Estático - sem fluxo lacrimal simulado).

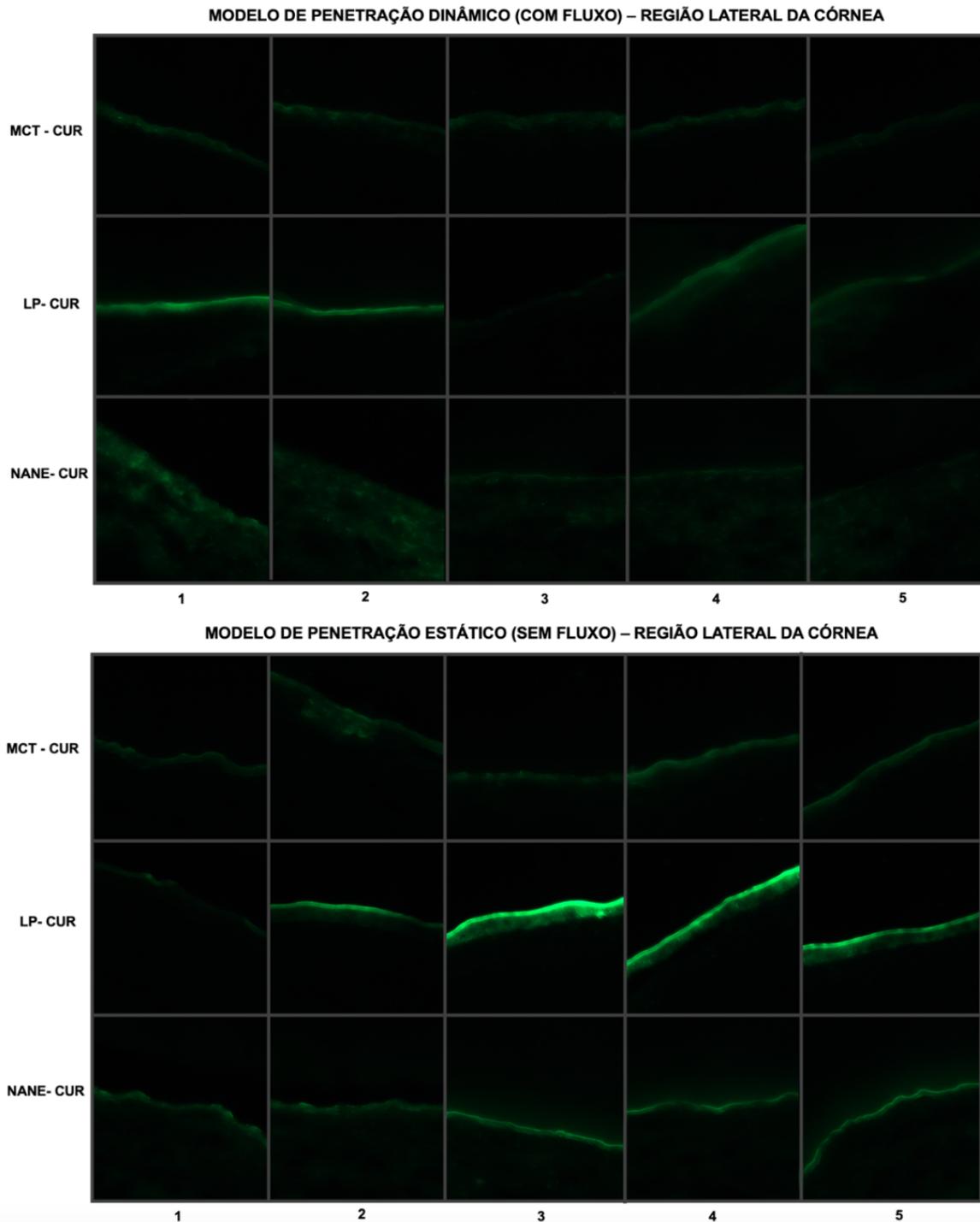


Figura 32. Resultado representativo das imagens capturadas por microscopia de fluorescência da penetração de CUR no epitélio corneano no modelo de penetração de olho inteiro dinâmico (com fluxo) e no modelo estático (sem fluxo), na região lateral da córnea através das formulações MCT-CUR, LP-CUR, NANE. A posição das imagens está representada dos números de 1-5.

As formulações MCT-CUR, LP-CUR e NANE-CUR apresentaram as mesmas tendências de mecanismos de entrega na parte lateral da córnea quando comparadas

à região central da córnea, porém, demonstraram menor homogeneidade na intensidade de penetração de CUR nas diferentes seções analisadas. Esse dado pode ser explicado pelo formato convexo da córnea; a curvatura apresentada é uma característica anatômica importante, que pode afetar a administração de fármacos ou ativos oftálmicos, facilitando o escoamento rápido das formulações.

Portanto, o modelo de penetração estático de olho inteiro, demonstrou nas duas regiões analisadas, um acúmulo de CUR no epitélio corneano, sugerindo que o modelo estático pode estar sofrendo um ressecamento da córnea e, logo, que a liberação das formulações pode estar sendo afetada por esse mecanismo, sugerindo assim um modelo de doença de olho seco. Já o modelo de penetração dinâmico demonstrou que a penetração de CUR em todas as formulações tivessem uma distribuição mais homogênea nas camadas da córnea causada pelo fluxo lacrimal simulado sugerindo, assim, uma condição mais realista de aplicação de medicamentos em um olho saudável.

5.7.2 Penetração *ex vivo* de curcumina na conjuntiva nos modelos dinâmico e estático

A análise da penetração das formulações MCT-CUR; LP-CUR e NANE-CUR na conjuntiva pode ser visualizada na Figura 33, apresentando ambos os modelos de penetração de olho inteiro. A conjuntiva consiste em uma membrana mucosa transparente que reveste a parte anterior do globo ocular e a parte interna das pálpebras, formando uma camada fina que se estende desde a borda da córnea até a parte posterior das pálpebras (Downie et al., 2021). O epitélio da conjuntiva também apresenta uma possibilidade para a penetração de medicamentos através de formulações tópicas oftálmicas.

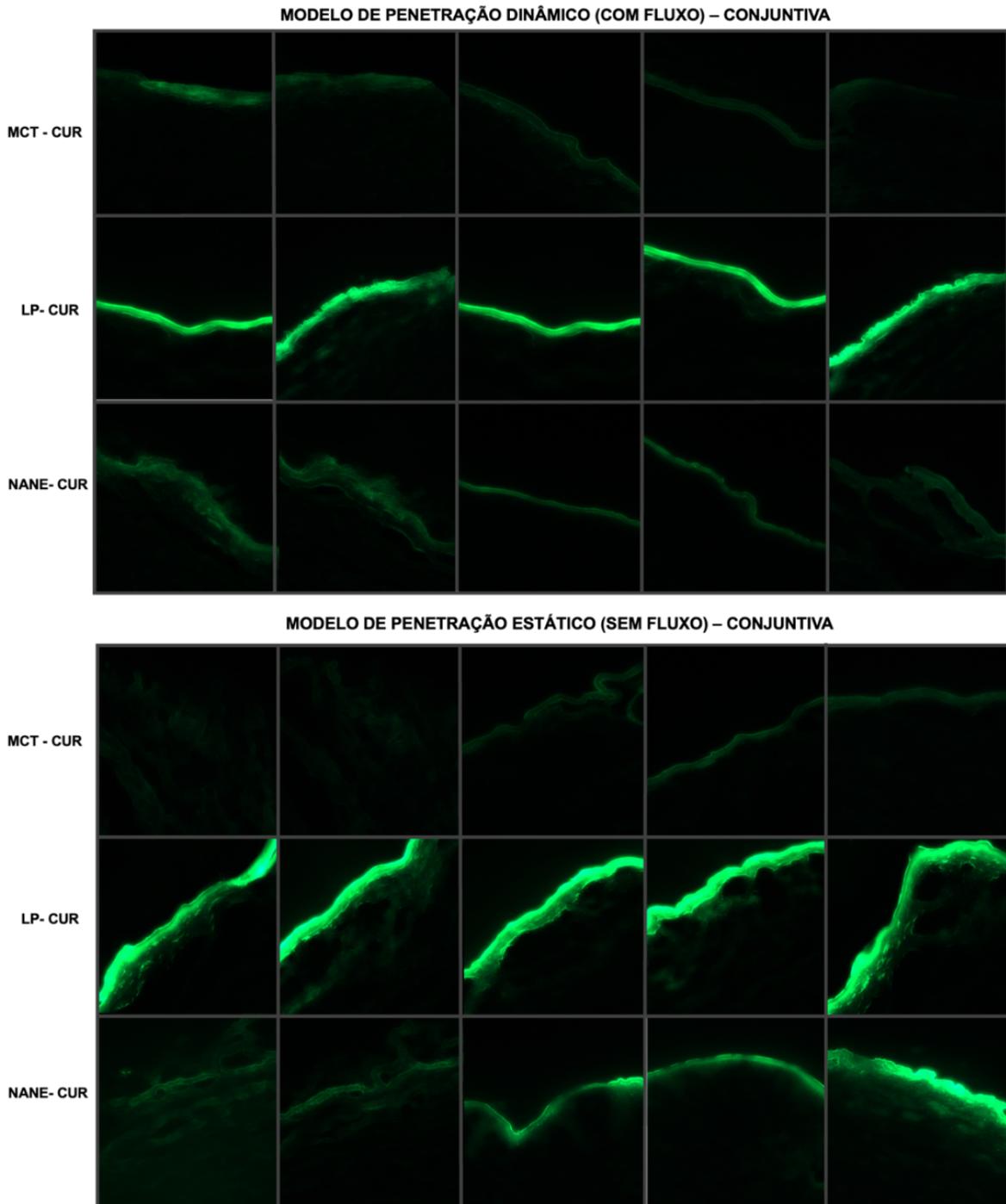


Figura 33. Resultado representativo das imagens capturadas por microscopia de fluorescência da penetração de CUR no modelo de penetração de olho inteiro dinâmico (com fluxo) e no modelo estático (sem fluxo), na conjuntiva através das formulações MCT-CUR, LP-CUR, NANE. A posição das imagens está representada dos números de 1-5.

A córnea apresenta uma área de superfície menor (área $\sim 1,1 \text{ cm}^2$) quando comparada com a área de superfície a conjuntiva, cerca de 17 vezes maior. Além disso a córnea conta com cinco camadas distintas e as *tight junctions*, que atuam

como mecanismo de defesa a entrada de substâncias exógenas, o que pode refletir em uma penetração menor quando comparada à conjuntiva, que apresenta maior espaços intercelulares e maior permeabilidade aos ativos (Onugwu et al., 2023; Ramos; Scott; Ahmad, 2015). Essa diferença é um fator importante ao considerar a administração de ativos oculares.

A formulação MCT-CUR representando uma formulação convencional, apresentou uma ligeira melhora na penetração da CUR, sendo observada uma maior intensidade de fluorescência no tecido da conjuntiva tanto no modelo dinâmico, quanto no modelo estático.

O LP-CUR apresentou maior intensidade de fluorescência na conjuntiva quando comparado à região central e lateral da córnea. Esse fato também foi observado quando comparado com as formulações MCT-CUR e NANE-CUR, sugerindo que a formulação de lipossomas apresenta potencial para liberação maior e para a penetração do ativo nos tecidos analisados. No modelo estático apresentou novamente uma alta intensidade de fluorescência (delimitada ao epitélio corneano), quando comparado com o modelo dinâmico, demonstrando mais uma vez a importância da aplicação do fluxo lacrimal simulado para a análise das formulações.

A NANE-CUR também apresentou maior intensidade de fluorescência na conjuntiva quando exposta ao modelo estático em comparação ao modelo dinâmico, o que corrobora com os mesmos mecanismos de ressecamento da superfície ocular e drenagem da formulação, respectivamente. Além disso, foram evidenciadas alterações quando comparado à região central e lateral da córnea no modelo dinâmico.

O aumento observado na intensidade de fluorescência em todas as formulações analisadas nesse estudo e, conseqüentemente, maior penetração da CUR, pode ser explicado pela estrutura do epitélio da conjuntiva, que se apresenta relativamente hidrofílico e altamente permeável, com baixa resistência trans epitelial. Esse epitélio apresenta espaços intercelulares cerca de 230 vezes maior do que a córnea, permitindo a penetração de fármacos e ativos através das vias transcelular e para celulares (Agarwal; Rupenthal, 2023). No entanto, a penetração de fármacos ou ativos oculares tópicos aplicados pela via conjuntival/escleral é considerada pouco efetiva e não produtiva. Isso se deve à presença de capilares sanguíneos e linfáticos que reduzem a biodisponibilidade ocular ao produzir um fluxo significativo do fármaco na circulação sanguínea (Onugwu et al., 2023).

5.7.3 Penetração *ex vivo* de curcumina na pálpebra nos modelos dinâmico e estático

As pálpebras são estrutura anatômicas que incluem tecido conjuntivo, músculos e glândulas, desempenhando um papel importante na proteção dos olhos e na manutenção da umidade da superfície ocular. Além disso, têm uma função vital na remoção de partículas estranhas que podem entrar em contato com a superfície do olho: esse mecanismo também inclui aplicação de ativos para o tratamento de distúrbios oculares. Além da sua função protetora, as pálpebras também desempenham papel importante na produção e distribuição das lágrimas, indispensáveis para manter a superfície do olho devidamente lubrificada e limpa, o que também auxilia na drenagem das formulações aplicadas.

Nos modelos estudados, a pálpebra suína *ex vivo* foi posicionada sobre a superfície ocular, cobrindo parcialmente a córnea, embora não tivesse mobilidade para auxiliar na drenagem das formulações sob aplicação de força. Portanto, esse tecido foi empregado exclusivamente para avaliar a capacidade de penetração da CUR na conjuntiva palpebral. Já no modelo dinâmico, a pálpebra foi posicionada de modo a permitir que o fluxo lacrimal simulado pudesse lavar a formulação.

A penetração da CUR na pálpebra nos modelos dinâmico e estático demonstrou um padrão semelhante aos resultados previamente divulgados para outros tecidos, validando o perfil de entrega das formulações. Também foi possível observar a presença sulcos de penetração de CUR, possivelmente entre o músculo orbicular da parte da pálpebra (Figura 34), sugerindo a possibilidade de que possa atuar como um potencial reservatório para as formulações.

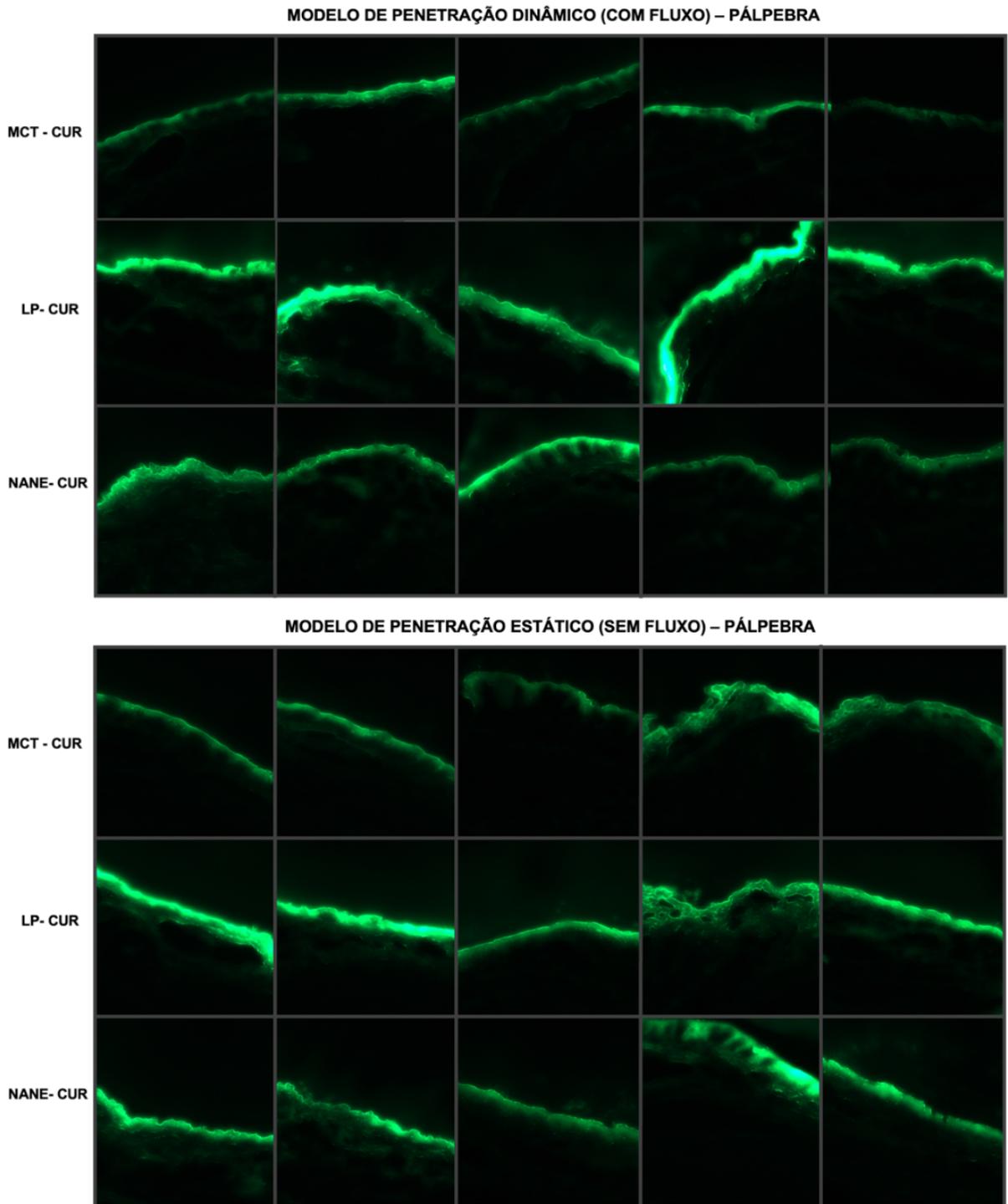


Figura 34. Resultado representativo das imagens capturadas por microscopia de fluorescência da penetração de CUR no modelo de penetração de olho inteiro dinâmico (com fluxo) e no modelo estático (sem fluxo), na pálpebra através das formulações MCT-CUR, LP-CUR, NANE. A posição das imagens está representada dos números de 1-5.

Na Figura 35, as análises de quantidade de CUR penetrada nos tecidos através da intensidade de fluorescência corroboram as imagens representativas da fluorescência das formulações em cada tecido. Todas as formulações testadas demonstraram uma afinidade maior pelo tecido palpebral em comparação com a córnea e a conjuntiva nos dois modelos. Esse fato é comprovado pelo aumento da intensidade de fluorescência observado na penetração de todas as formulações, com destaque para LP-CUR. Também, ao final de cada experimento, foi observado que a pálpebra continuava impregnada com a formulação LP-CUR mesmo após a lavagem exercida pelo fluxo lacrimal simulado. A formulação convencional MCT-CUR teve o menor desempenho de penetração em todos os tecidos e nos dois métodos. Esses resultados afirmam as dificuldades que as formulações convencionais têm em superar as barreiras anatômicas e fisiológicas do olho.

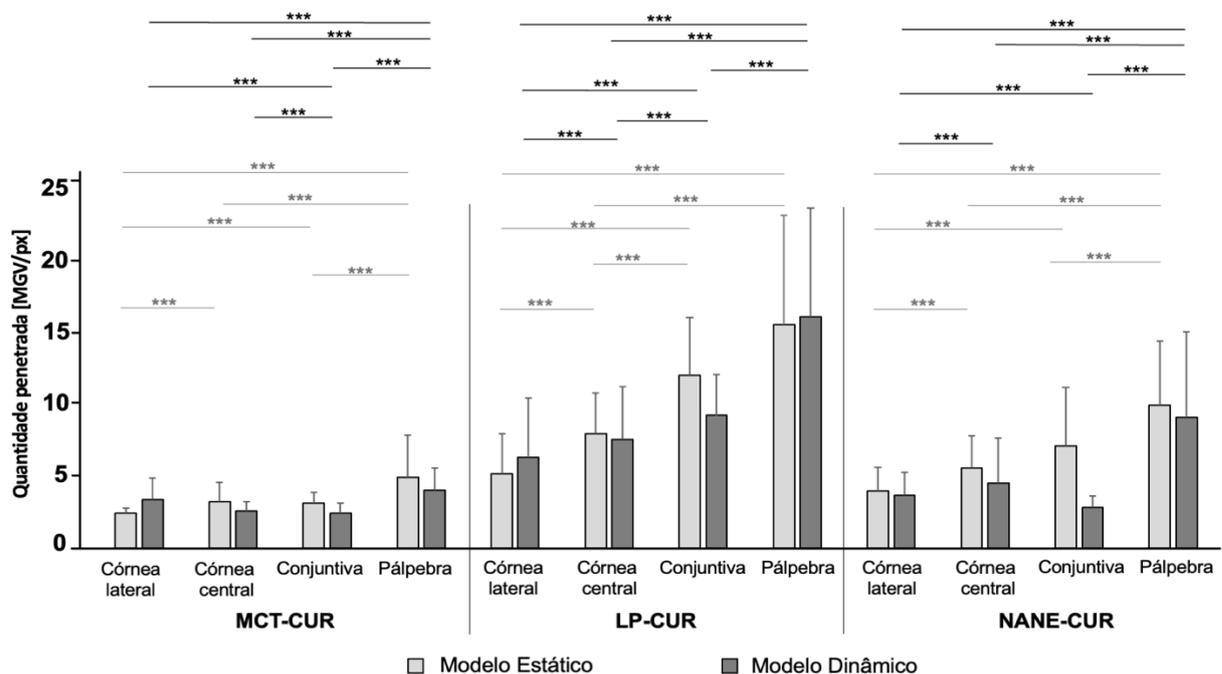


Figura 35. Resultados de intensidade de fluorescência de penetração da CUR. Comparações realizadas entre influência do modelo (dinâmico e estático), formulações (MCT-CUR, LP-CUR e NANE-CUR) e tecidos (córnea, conjuntiva e pálpebra). As comparações estatísticas foram realizadas entre os tecidos e por modelo, sendo em cinza claro estatística referentes ao modelo estático e cinza escuro estatística referente ao modelo dinâmico.

Foram observadas semelhanças estatísticas entre os modelos dinâmico e estático de olho inteiro através da quantificação por intensidade de fluorescência.

A diferença nos modelos se tornou aparente quando analisada a quantificação da penetração de curcumina por meio da profundidade das camadas do tecido. Na Figura 36, é visível que as formulações LP-CUR e NANE-CUR atingiram maior profundidade de penetração no modelo dinâmico na região central e lateral da córnea. Isso deixa evidente que o modelo dinâmico afeta a distribuição da formulação na superfície da córnea. A formulação MCT-CUR, por outro lado, demonstrou uma menor penetração de curcumina quando comparada às outras formulações. No entanto, ao analisar ambas as regiões da córnea, foi observado que o modelo dinâmico também influenciou a distribuição da formulação nesse caso.

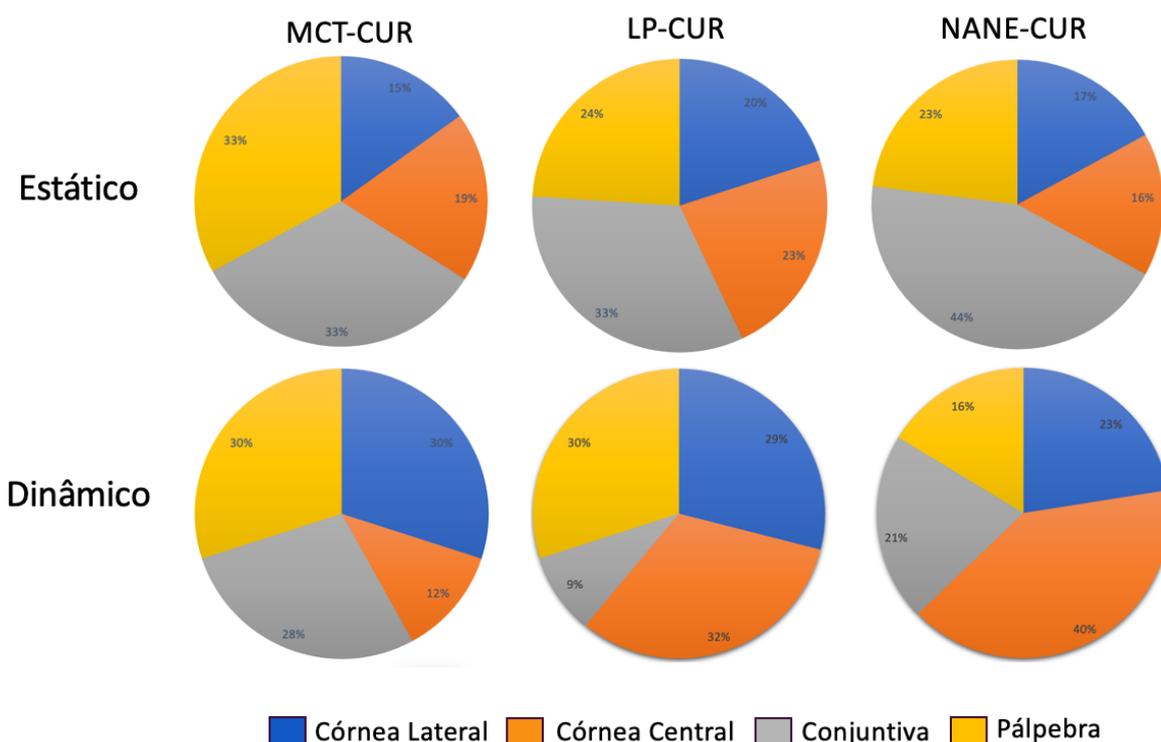


Figura 36. Resultados do ensaio de penetração de curcumina por profundidade das diferentes formulações LP-CUR, NANE-CUR e MCT-CUR em córnea suína no modelo estático de olho inteiro e no modelo dinâmico *ex vivo* por 15 min.

Ambos os modelos de penetração ocular *ex vivo* demonstraram-se fundamentais para investigação da penetração de fármacos nas diferentes condições e também para examinar os mecanismos de entrega de fármacos de diversas formulações. O modelo dinâmico indicou mais uma vez ser mais preciso e sensível para a entrega de medicamentos em olhos saudáveis, enquanto o modelo estático

representou uma possível reprodução do mecanismo de distribuição de substâncias em casos de distúrbios, como a doença do olho seco.

5.7 Parte 2: Modelo OphthalMimic

5.7.1 Desenvolvimento e montagem do modelo *in vitro* OphthalMimic

As peças do dispositivo foram projetadas usando o software Autodesk Fusion 360 (Autodesk Inc., Califórnia, EUA) e suas peças foram produzidas por impressão 3D no Ipê Lab (Goiânia, Goiás) usando uma impressora MakerBot Replicator 2 Desktop 3D (MakerBot Industries, New York, EUA). O sistema de engrenagem foi composto por um Micro Servo MG90S TowerPro (Tensão de operação: 4.8-6.0V, Torque: 1.8kg/cm (4.8V), 2.2kg/cm (6V), Velocidade de operação: 0.1sec/60graus (4.8v), 0.08sec/60graus(6v), Peso: 13.4g, Dimensões: 35,5 x 32,5 x 12mm), um microcontrolador ESP32 e uma fonte de energia de 5V. O modelo já conta com uma patente de inovação do dispositivo.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR102022009997, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 25/05/2022.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.; CUNHA-FILHO, M.; BARBALHO, G. 'Dispositivo para avaliação do desempenho de formulações oftálmicas *in vitro* em relação à sua capacidade de resistência às barreiras dinâmicas que levam à drenagem de fármacos e método de avaliação do desempenho de formulações oftálmicas utilizando tal dispositivo'.

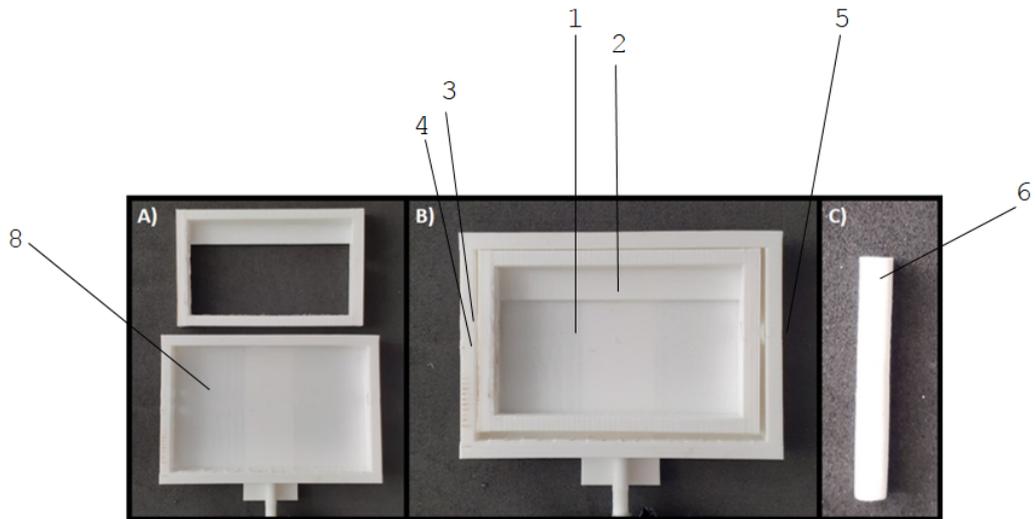


Figura 37. Imagem do dispositivo OphthalMimic da patente BR 10 2022009997 para avaliação do desempenho de formulações oftálmicas impresso em 3D indicando as seguintes partes correspondentes. Em (B), ao centro: área exposta (1); área simulada de *cul-de-sac* (2); entrada para fluxo lacrimal aquoso simulado (3); entrada para fluxo de lacrimal lipídico simulado (4) e porta de drenagem (5). Em (C), a direita: sonda usada para stress mecânico (6) e, em (A) a esquerda: plataforma de suporte (8).

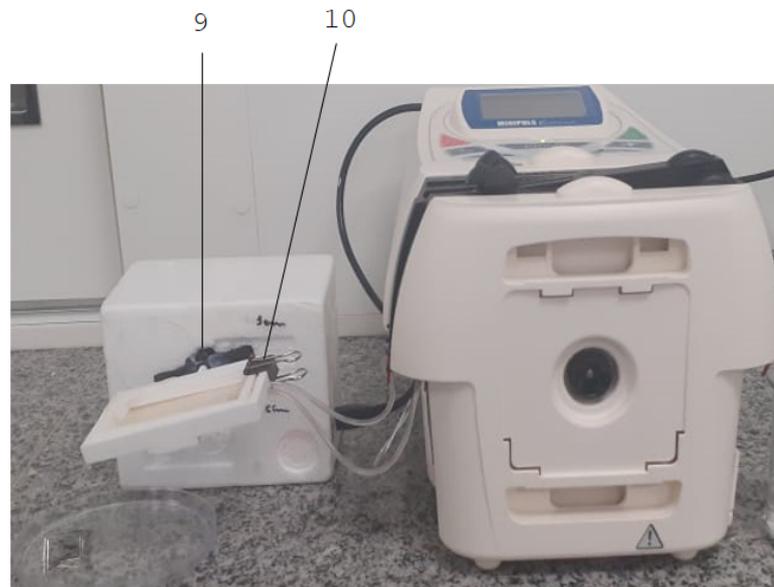


Figura 38. Foto do dispositivo OphthalMimic da patente BR 10 2022 00999 7 para avaliação do desempenho de formulações oftálmicas impresso em 3D acoplado a uma bomba de peristáltica e um sistema de engrenagem (9) para mover a plataforma. A tampa de fechamento é aderida à plataforma de suporte usando grampos apropriados (10).

5.8 Testes exploratórios do modelo OPTHALMIMIC

Após a realização dos testes exploratórios, foram identificados alguns pontos de melhoria no modelo OphthalMimic. Esses pontos incluíam a formação de caminhos preferenciais, o escoamento rápido da formulação, a baixa retenção no *cul-de-sac* e vazamentos em alguns pontos específicos do dispositivo.

A formação de caminhos preferenciais é indesejada, pois pode resultar em uma distribuição desigual da formulação e influenciar os resultados dos testes. O escoamento rápido da formulação pode levar a uma rápida remoção do modelo, o que pode afetar a precisão das medições. A baixa retenção no *cul-de-sac* pode resultar em uma menor permanência da formulação nos locais desejados, comprometendo a avaliação correta da permeação e dos efeitos do produto. Além disso, os vazamentos em pontos específicos podem causar perda de formulação e interferir na validade dos resultados.

Identificar esses pontos de melhoria é crucial para aperfeiçoar o modelo OphthalMimic e garantir a confiabilidade dos experimentos. Com base nesses resultados, foram realizadas modificações no design e no funcionamento do dispositivo, visando minimizar ou eliminar esses problemas identificados.

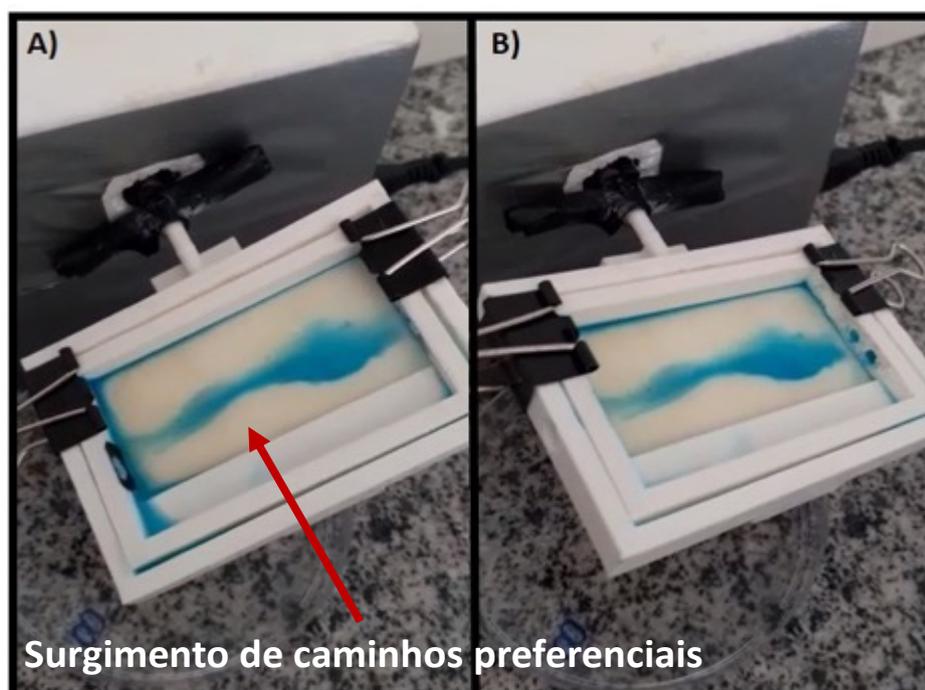


Figura 39. Imagens do modelo OphthalMimic em testes iniciais demonstrando o surgimento de caminhos preferenciais.

Foram conduzidos testes exploratórios no modelo OphthalMimic, com o objetivo de investigar os parâmetros de fluxo, tempo de teste, volume de aplicação da formulação e condições de operação utilizando como formulação teste uma solução de azul de metileno.

O modelo proposto é adicionar essas "forças" físicas em uma superfície contendo os mesmos resíduos químicos para interação, de modo que a capacidade das formulações em resistir e permanecer em contato com essa superfície possa ser avaliada. Mesmo que as extrapolações e as correlações com o tempo de residência *in vivo* talvez não sejam possíveis, o modelo seria útil para comparar as formulações, permitindo um rastreamento de alto rendimento durante a fase de desenvolvimento e pesquisa.

5.9 Otimização de design do modelo OphthalMimic

Após a realização desses testes, foram realizadas alterações na entrada do fluido lacrimal simulado, na saída e na posição do *cul-de-sac* no modelo OphthalMimic. Essas modificações foram implementadas com o objetivo de otimizar o fluxo e a distribuição da formulação, melhorando assim a representatividade do modelo em relação às condições oculares.

A alteração na entrada do fluido lacrimal simulado visa proporcionar um fluxo mais controlado e uniforme, evitando o surgimento de caminhos preferenciais e garantindo uma distribuição mais homogênea da formulação nos locais desejados. Com uma entrada otimizada, é possível simular de forma mais precisa o fluxo lacrimal natural e suas interações com a formulação.

A modificação na saída tem como objetivo garantir um escoamento adequado e evitar vazamentos indesejados. Uma saída aprimorada permite um controle mais eficiente do fluxo do fluido lacrimal simulado e evita perdas da formulação durante os testes, contribuindo para a precisão e a confiabilidade dos resultados.

A posição do *cul-de-sac* também foi ajustada para melhorar a retenção da formulação no local desejado, simulando mais fielmente as condições oculares como demonstrado na imagem 36, versão 2. Essa alteração visa minimizar a remoção precoce da formulação e permitir um tempo de exposição adequado, possibilitando uma avaliação mais precisa dos efeitos da formulação no *cul-de-sac*.

Essas alterações nas entradas, saídas e posição do *cul-de-sac* representam melhorias significativas no modelo OphthalMimic, proporcionando condições mais realistas e representativas para a avaliação das formulações oftálmicas.

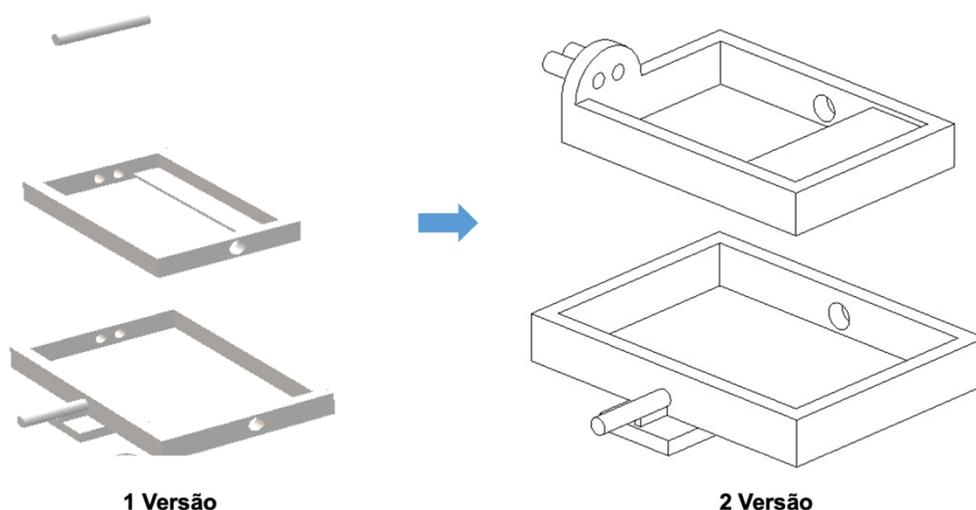


Figura 40. Imagens demonstrando a modificação do dispositivo OphthalMimic.



Figura 41. Imagens do dispositivo OphthalMimic impresso em 3D com material ABS, e devidas modificações para 2 versão. A) base do dispositivo que acopla a membrana polimérica. B) Parte superior com simulação da bolsa de *cul-de sac*, entrada de fluxo lacrimal (lateral superior direita) e saída de fluxo lacrimal simulado na região central do dispositivo. C) Dispositivo com montagem completa.

Esperava-se que essas modificações contribuíssem para uma distribuição mais uniforme da formulação, um escoamento controlado e uma retenção adequada, resultando em resultados mais confiáveis e relevantes para a pesquisa e o desenvolvimento de produtos oftálmicos. O novo modelo após a modificação (Figura 40 e 41) possui tamanho de 6.8x4.8mm.

5.10. Síntese de uma membrana polimérica contendo mucina dispersa

Inicialmente, a fabricação das membranas poliméricas utilizou apenas PVA e gelatina, conforme o protocolo descrito por Pal; Banthia; Majumdar, (2006). No entanto, durante a secagem em estufa, observou-se que a membrana resultante era frágil e rasgava facilmente. Para abordar esse problema, foram realizadas alterações nas proporções, passando de PVA a 5% para PVA a 10%, e notou-se que as membranas adquiriam maior resistência. Diante dessa observação, a porcentagem de PVA foi fixada em 10%.

Além disso, foi conduzido um teste utilizando PVP (Polivinilpirrolidona) como polímero, seguindo o mesmo processo de produção. No entanto, observou-se que a membrana resultante ficou totalmente rígido e quebradiço mesmo na presença da gelatina, o que levou à exclusão do PVP da lista de polímeros para a produção das membranas.

Para replicar a camada de mucina presente na córnea, a mucina foi introduzida na dispersão da membrana para avaliar sua compatibilidade com os demais elementos. A mucina foi facilmente incorporada à dispersão devido à sua natureza aquosa. No entanto, mesmo com essa adição, a membrana ainda mantinha sua característica de rigidez. A porcentagem de mucina também foi alterada para verificar o potencial de mucoadesividade das membranas e quantidade máxima suportada pela suspensão, como mostrado na tabela 4.

Um dos mecanismos de resistência mais frequentemente adicionados a formulações oftálmicas inovadoras é a capacidade de interação da formulação com mucinas presentes na superfície ocular. De fato, estudos demonstram que as interações entre polímero e mucosa são mediadas principalmente pelas mucinas (Mantelli; Argüeso, 2008). As mucinas compreendem uma grande classe de glicoproteínas expressas pelos tecidos epiteliais das mucosas, protegendo os tecidos através de suas propriedades antioxidantes, lubrificantes e antibacterianas (Duffy; Laurent; Thomas, 2015). Podem ser secretadas no fluido lacrimal mucinas solúveis ou formadoras de gel, ou associadas às membranas oculares (Mantelli; Argüeso, 2008).

Tabela 4. Composição das membranas poliméricas

Teste	PVA	PVP	Gelatina	Mucina	PLX	Resultado
1	10%	-	2,5%	-	-	Rasgando
2	5%	-	2,5%	-	-	Rasgando
3	10%	-	2,5%	2,5%	-	Rígido
4	-	10%	2,5%	2,5%	-	Quebradiço
5	10%	-	2,5%	5,0%	-	Pegajoso
6	10%	-	2,5%	10%	-	Rígido
7	10%	-	2,5%	0,5%	0,5%	Flexível
8	10%	-	2,5%	0,5%	1,0%	Flexível
9	10%	-	2,5%	1,0%	0,5%	Flexível

Devido a característica de rigidez da membrana, o PLX foi introduzido como um plastificante, sendo testado em várias concentrações diferentes (tabela 4). Notou-se que esse plastificante conferiu flexibilidade às membranas. Como resultado, desenvolveu-se um modelo no qual, após a secagem em estufa, a membrana apresentava fácil remoção da placa de Petri e características de flexibilidade adequadas para sua aplicação no protótipo.

Conseqüentemente, realizou-se uma variação das proporções de mucina suína tipo II e poloxamer para avaliar as distintas propriedades mecânicas e a capacidade de emular a mucoadesão em formulações oftálmicas utilizando o modelo que havia sido desenvolvido.

Tabela 5. Composição em porcentagem das membranas poliméricas selecionadas, variando as concentrações de mucina e poloxamer.

Materiais	Membrana 1	Membrana 2	Membrana 3
Gelatina	2,5%	2,5%	2,5%
PVA	10%	10%	10%
Poloxamer	0,5%	1,0%	0,5%
Mucina	0,5%	0,5%	1,0%
Tampão HEPES pH: 7.4	q.s.p 100%	q.s.p 100%	q.s.p 100%

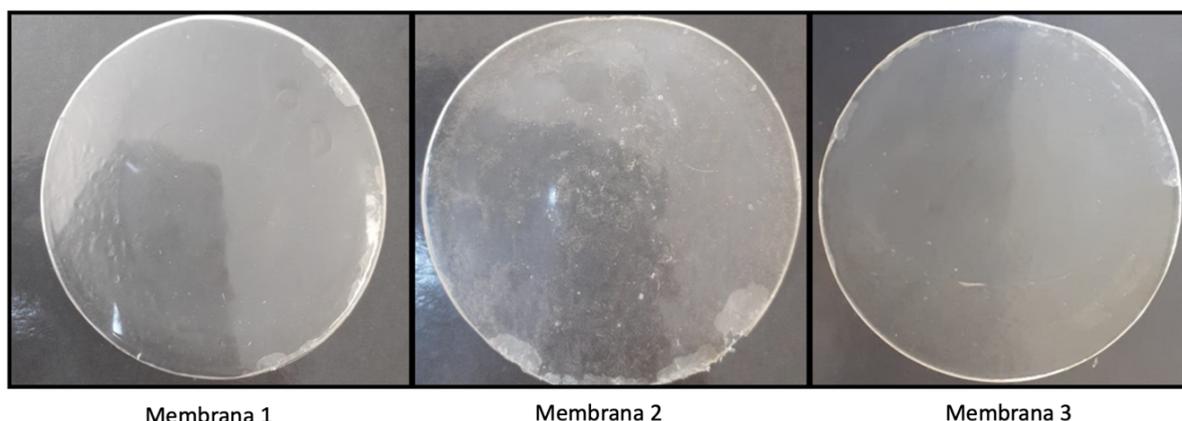


Figura 42. Imagem das membranas após a secagem com as composições apresentados na tabela 5.

As membranas que continham 0,5% e 1,0% de mucina e poloxamer demonstraram características mucoadesiva, boa flexibilidade, textura e maleabilidade adequadas para serem utilizadas no protótipo como uma representação de uma barreira biológica, assim, definiu-se três diferentes membranas com variações na concentração de plastificante e mucina para serem avaliadas quanto ao potencial mucoadesivo e as propriedades mecânicas (tabela 5). Proporções de mucina e poloxamer superiores a 1,0% resultaram em um excesso dos componentes.

Tabela 6. Condições de secagem das membranas em estufa com ventilação.

Temperatura	Ventilação	Peso (g)	Tempo	Resultado
60°C	100%	20	6h	Perde muita água
60°C	100%	10	5h	Perde muita água
60°C	100%	20	6h	Mantem a espessura
60°C	100%	10	5h	Perde muita água
40°C	40%	20	24h	Secagem regular
40°C	100%	20	24h	Muitas bolhas
40°C	100%	50	24h	Não secou

Diversos períodos de secagem foram testados para as membranas selecionadas, conforme indicado na Tabela 6, a fim de determinar parâmetros ideais para a produção em sextuplicatas das membranas na estufa de ventilação. A secagem lenta a 24h a 40°C, com 40% de ventilação, revelou-se como a condição mais favorável para a

secagem da membrana. Sob essas circunstâncias, a membrana apresentou características homogêneas, aparência translúcida e livre de bolhas.

5.11. Caracterização das membranas poliméricas

5.11.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

Para análise da compatibilidade dos componentes das membranas, esses foram analisados isoladamente e após a produção e secagem. Os dados obtidos das análises FTIR indicam que PVA, PLX, gelatina e mucina apresentam grupos funcionais característicos compatíveis com o descrito na literatura (Aslam et al., 2023; Dey; Agnelli; Sartone, 2023; Fauziyah, 2023; Gavriely; Richter; Zucker, 2022; Rajati et al., 2023; Rajora; Bal, 2023; Vasconcelos et al., 2021). Os espectros FTIR dos componentes e das membranas 1 (M1), membranas 2 (M2) e membranas 3 (M3) são apresentados na Figura 43.

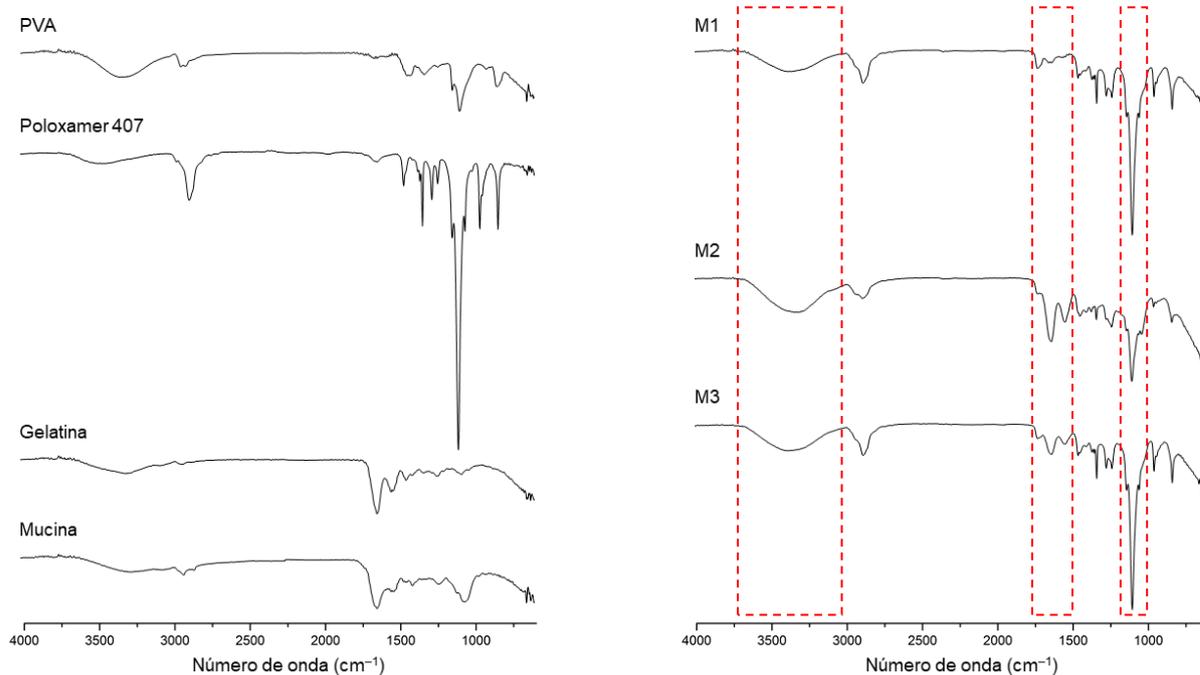


Figura 43. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier dos componentes isolados e das membranas após a secagem.

Nas membranas poliméricas produzidas (M1, M2 e M3) os espectros de FTIR mostram que a banda de absorção referente ao PVA foi proeminente na faixa de número de onda de 3015-3690 cm^{-1} , devido à concentração relativamente alta de PVA

(10%) nas formulações (Gyarmati et al., 2022). Portanto, vibrações do grupo –OH ou grupos amida (estiramento –NH) presentes na gelatina e na mucina não podem ser diferenciados do sinal de PVA. Além disso, ocorreu uma sobreposição na faixa de número de onda 2700-3000 cm^{-1} , correspondendo às bandas de estiramento –CH presentes em todos os componentes. Em contrapartida, a banda característica do PLX em 1105 cm^{-1} relacionada ao grupo éter (estiramento –CO) foi confirmada sem deslocamento aparente, no entanto, houve atenuação da intensidade da banda, especialmente para a membrana M2.

O espectro da membrana M1 também mostra bandas na mesma região do espectro da gelatina e da mucina, correspondendo às bandas da amida I, amida II e amida III, contudo, apresentando uma grande atenuação na nitidez e na intensidade dos grupos. Essas alterações nos espectros de FTIR são provavelmente consequência da formação de ligações de hidrogênio entre os componentes da formulação.

Na membrana M2 obtida com maior concentração de PLX (1%) foi registrado um espectro de FTIR semelhante ao apresentado pela M1. No espectro foi possível identificar as bandas atribuídas a amida I, amida II e amida III, apresentando uma grande atenuação na intensidade desses grupos. As alterações nessas bandas, como relatado anteriormente, são provavelmente consequência de interações químicas formadas por meio de ligações de hidrogênios entre os componentes. Mesmo com o aumento da concentração do PLX a banda em 1105 cm^{-1} relacionada ao grupo éter (estiramento –CO) foi preservada sem deslocamento aparente.

Na membrana M3 obtida com maior concentração de mucina (1%) foram observadas alterações evidentes no espectro de FTIR em comparação com a membrana M1. Essa concentração resultou no aumento da intensidade da banda na faixa de 3015-3690 cm^{-1} e também para bandas em 1647 cm^{-1} , 1554 cm^{-1} e 1236 cm^{-1} , correspondendo a amida I, amida II e amida III, respectivamente. Consequentemente, com o aumento da concentração de mucina não foi possível estabelecer tantas ligações de hidrogênio entre os grupos funcionais da mucina, deixando os grupos amida I, amida II e amida III mais disponível na formulação final.

Com base nesses resultados, é viável propor potenciais mecanismos de mucoadesão para as membranas, como a atração eletrostática. Isso pode ser atribuído à presença de grupos de ácido siálico (inferiores a 1,2%) ligados à mucina, os quais possuem carga negativa. Outros mecanismos também podem ocorrer pelas

ligações de hidrogênio com grupos funcionais presentes nas membranas, como os grupos hidroxilas ($-OH$), carboxila ($-COOH$), amina ($-NH_2$) e grupos funcionais carbono e oxigênio ($-C=O$ e $-CO$). Por fim, a estrutura da membrana também pode proporcionar mucoadesão pelo mecanismo de interpenetração e emaranhamento de cadeias poliméricas (Ruiz-Pulido; Medina, 2021).

5.11.2. Calorimetria diferencial exploratória – DSC

A análise térmica por DSC foi realizada para entender o comportamento de transição de fase dos componentes isolados e das membranas poliméricas produzidos, conforme apresentado na Figura 40. A temperatura de transição vítrea (T_g), ponto de fusão (T_m) e a temperatura de cristalização (T_c) são as principais características que podem ser determinadas utilizando a varredura por DSC.

Os dados obtidos por DSC para PVA, PLX, gelatina e mucina apresentaram comportamentos de transição de fases compatíveis com o descrito na literatura (Aslam et al., 2023; Jung; Lee, 2023; Mirek et al., 2023; Omerdić et al., 2022; Yadav; Lahariya, 2023).

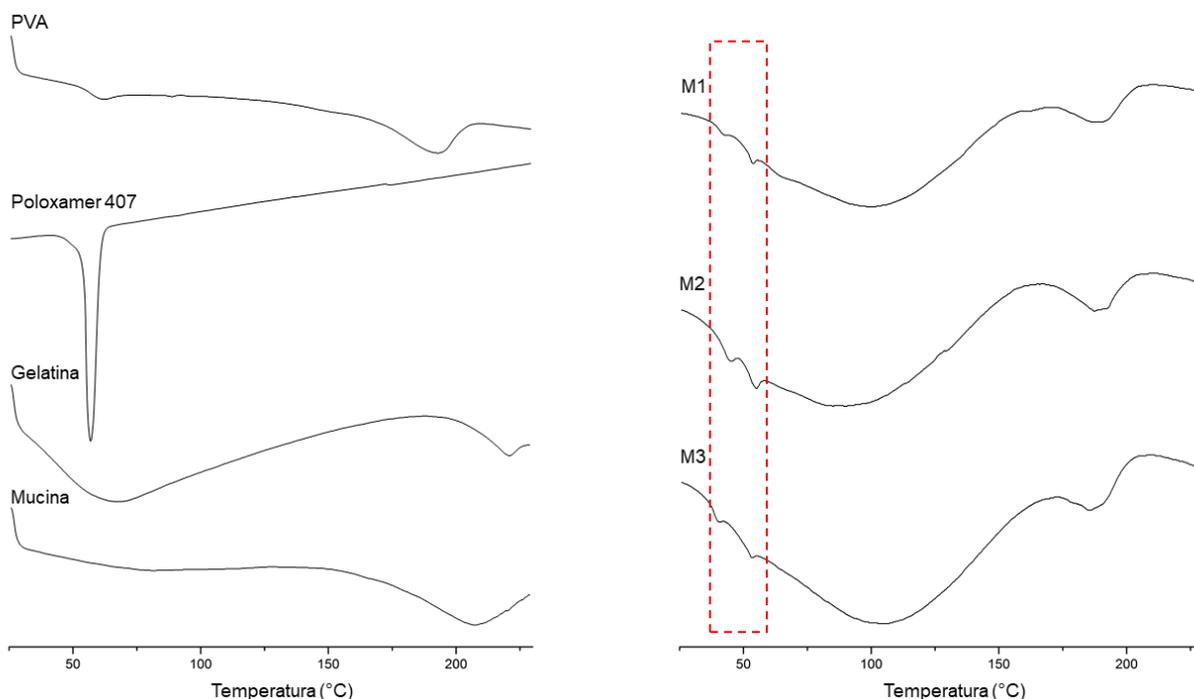


Figura 44. Calorimetria diferencial exploratória dos componentes da membrana isoladas e das membranas completas.

Na análise DSC realizada para as membranas M1, M2 e M3 foi possível observar similaridade entre os termogramas registrados, como apresentado na Figura

44. Um pico endotérmico na faixa de temperatura de 39 – 45°C foi atribuído à transição vítrea do PVA. Esse deslocamento da T_g para temperaturas menores sugere que o PVA está interagindo com os componentes da membrana, sendo atribuído a interações moleculares, como ligações de hidrogênio. Os resultados de FTIR (Figura 43) corroboram a compatibilidade entre os componentes, relacionando as interações por meio dos grupos funcionais –OH, –NH, –C=O e –CO. Além disso, as membranas apresentaram ponto de fusão semelhante em relação ao PVA isolado e os eventos foram registrados em torno de 170 – 205°C. Esse fato indica uma boa compatibilidade entre os componentes.

Em contrapartida, o evento térmico registrado em torno de 52–55°C foi atribuído ao ponto de fusão do PLX. O evento térmico apresentou uma grande atenuação da intensidade do ponto de fusão com deslocamento para menores temperaturas. Essa alteração observada sugere que o PLX está parcialmente miscível nas membranas. De fato, esse resultado foi confirmado por FTIR, onde as bandas de absorção correspondentes aos grupos funcionais foram confirmadas. No entanto, a presença do PLX nas formulações se justifica por sua atuação como agente plastificante (Patel et al., 2023). Sua presença no processo de fabricação das membranas causa mudanças na organização molecular entre os componentes, promovendo o aumento da flexibilidade da matriz polimérica, reforçando os achados experimentais de alongamento e deformação nos testes mecânicos (Tabela 7).

Por fim, o evento com pico endotérmico próximo de 100°C foi atribuído à perda de água residual das membranas e da água ligada, principalmente nas cadeias da mucina e gelatina. Na membrana M1 o pico foi registrado em 98,46°C. Para a membrana M2, obtida com maior concentração de PLX (1%) foi observado um deslocamento do pico para temperatura de 89,50°C. Essa redução de temperatura ocorreu devido a alteração da organização estrutural da membrana pelas moléculas do poloxamer 407, favorecendo a remoção da água residual. Para a membrana M3, obtida com maior concentração de mucina (1%) foi observado um deslocamento do pico para temperatura de 104,95 °C. Esse aumento da temperatura foi esperado, devido a maior concentração da mucina na formulação e retenção de moléculas de água.

5.11.4. Análise termogravimétrica – TGA

As análises térmicas por TG foram realizadas para entender o comportamento e a estabilidade térmica dos componentes isolados e das membranas produzidas, conforme apresentado na Figura 45. As análises termogravimétricas são representadas pela primeira derivada termogravimétrica (DTG) da curva em função da temperatura. Essa transformação matemática delimitou melhor os estágios de perda de peso e forneceu informações sobre o nível de interação polímero-polímero (Granados et al., 2022).

Os dados obtidos por TGA para PVA, PLX, gelatina e mucina apresentaram comportamentos térmicos compatíveis com o descrito na literatura (Aslam et al., 2023; Barbero et al., 2016; Channa et al., 2022; Malatani et al., 2023; Paula et al., 2023; Raja et al., 2022; Younis et al., 2023).

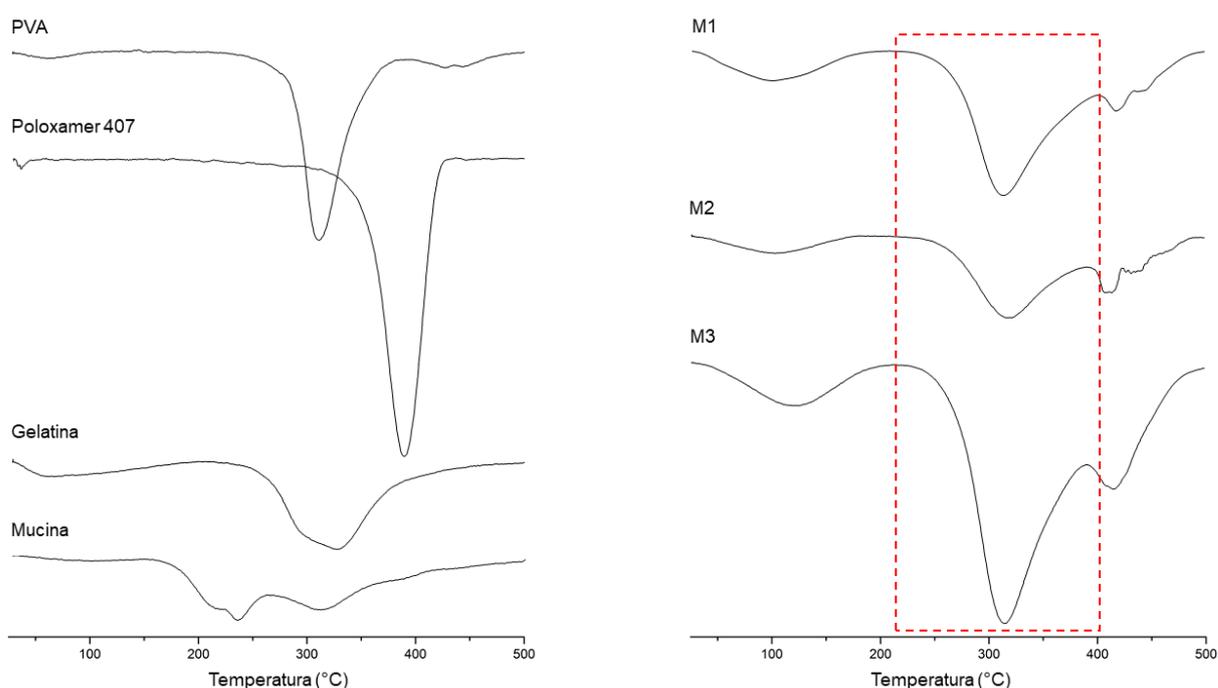


Figura 45. Análise termogravimétrica dos componentes da membrana isoladas e das membranas completas.

Na análise térmica por TGA realizada para as membranas M1, M2 e M3 foi possível observar similaridade entre os termogramas registrados, exibindo três estágios de decomposição térmica bem definidos, como apresentado na Figura 41.

Todos as membranas sofreram uma ligeira perda de peso de cerca de 10 – 14% para a faixa de temperatura de 30 – 216°C. Nessa faixa de temperatura as perdas

foram associadas a dois tipos de ligações de água: a primeira está relacionada a água fracamente ligada, que desidrata a membrana em aproximadamente 100°C, e a segunda relacionada a água fortemente ligada, que desidrata a membrana entre 100 – 216°C, e podem ser atribuídas à afinidade das proteínas gelatina e mucina.

O T_{max} apresentado pelas membranas M1, M2 e M3 foi registrado em cerca de 59,83%, 53,31% e 58,92%, respectivamente. Além disso, foram observados deslocamentos do pico de decomposição para temperaturas maiores entre M1 (314,25°C), M2 (321,86°C) e M3 (316,85°C). Esses resultados demonstram uma boa estabilidade térmica das membranas produzidas e boa compatibilidade entre os materiais utilizados. Também foi possível observar que o aumento na concentração de PLX (1%) em M2 gerou maior estabilidade térmica em relação às demais formulações.

Por fim, o terceiro estágio foi registrado em uma faixa de temperatura de 390 a 500°C, apresentando picos intercalados para M1 (419,29°C e 444,84°C) e M2 (414,19°C e 432,34°C), contudo, para M3 foi registrado único pico em 417,07°C. Essa diferença pode estar relacionada à maior concentração de mucina presente na membrana M3. Dessa forma, os eventos foram atribuídos à quebra da matriz polimérica do PVA e das ligações peptídicas e glicosídicas presentes na gelatina e mucina.

A estabilidade térmica das membranas depende amplamente das interações moleculares entre os materiais presentes na mistura. Quando a mistura de materiais apresenta eventos bem definidos, mesmo com componentes individuais com faixas bem distintas, isso sugere uma influência mútua entre os componentes, podendo haver interações físicas ou químicas, resultando em modificações da cinética de decomposição.

Essas interações moleculares foram estudadas por FTIR (Figura 43) e DSC (Figura 40). De fato, as principais bandas de FTIR dos componentes gelatina e mucina foram apresentadas com grande atenuação na intensidade dos grupos amida I, amida II e amida III, principalmente, nas membranas M1 e M3. Além disso, nos termogramas DSC foram evidenciados um deslocamento da T_g do PVA e alteração da intensidade do ponto de fusão do PLX após a produção das membranas. Esses resultados corroboram os dados apresentados nas curvas DTG, confirmando interações favoráveis entre os polímeros, obtendo membranas com boa compatibilidade e estabilidade térmica.

5.11.5. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas representam um importante conjunto de características para o sucesso na aplicação de membranas poliméricas como estrutura mimética à córnea, uma vez que a estrutura precisa suportar as condições físicas para manuseio no modelo oftálmico e sua matriz polimérica precisa suportar as condições fisiológicas simuladas durante os testes.

É importante ressaltar que ao realizar os ensaios mecânicos com as amostras secas o equipamento calibrado com uma célula de força de 5 kg, não teve força o suficiente para realizar o alongamento e posterior ruptura das membranas. Para adequação do estudo, foi necessário colocar as amostras em contato com água por 1 minuto, para que ocorresse o intumescimento das cadeias poliméricas. O intumescimento gradual das membranas em função do tempo de contato está relacionado com a difusão das moléculas de água através da matriz polimérica; conforme a membrana absorve água, a matriz vai hidratando e suas cadeias moleculares começam a se afastar, causando um relaxamento entre os segmentos poliméricos (Ribeiro, 2017).

Devido ao relaxamento das cadeias poliméricas presentes nas membranas após o intumescimento, foi possível a realização dos testes. O ensaio de resistência à tração foi realizado para mensurar a força de ruptura, alongamento, tensão, deformação e o módulo de Young das membranas, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Propriedades mecânicas das membranas poliméricas, M1, M2 e M3.

Amostras	Força de Ruptura (N)	Alongamento (mm)	Tensão (MPa)	Deformação (%)	Módulo de Young (MPa)
M1	22.9 ± 0.55 ^a	9.12 ± 1.80 ^a	0.38 ± 0.01 ^a	30.39 ± 5.99 ^a	0.29 ± 0.02 ^a
M2	45.61 ± 4.66 ^b	11.46 ± 1.03 ^b	0.76 ± 0.09 ^b	38.21 ± 3.45 ^b	0.55 ± 0.06 ^b
M3	39.19 ± 2.26 ^b	8.55 ± 1.38 ^a	0.65 ± 0.05 ^b	28.51 ± 4.61 ^a	0.51 ± 0.05 ^b

Letras iguais em cada coluna indicam que não há diferença significativa entre os valores médios ($p > 0.05$).

A análise dos resultados nos ensaios mecânicos para força de ruptura e tensão mostraram que a adição do percentual maior de poloxamer (M2) e mucina (M3) proporcionaram aumento nos valores da força necessária para romper as ligações

entre as cadeias polimérica e na distribuição da força aplicada sobre a área da matriz polimérica, respectivamente. Apesar dos valores nominais apresentados, a análise estatística confirmou que não há diferença estatística significativa entre M2 e M3 ($p > 0.05$).

A resistência ao alongamento está relacionada à mudança na dimensão das membranas até o ponto de ruptura das ligações entre as cadeias poliméricas na direção da força aplicada. O maior alongamento foi registrado para M2 ($p < 0.05$), isso se deve ao aumento no percentual de poloxamer, que foi aplicado à formulação para atuar como agente plastificante. Além disso, o aumento para 1% também refletiu na maior taxa de deformação registrada para as membranas, resultando em taxa de $38.21 \pm 3.45\%$ ($p < 0.05$).

Esses resultados sugerem que a presença das moléculas de poloxamer na matriz polimérica pode aumentar a maleabilidade das membranas, evitando falhas mecânicas como rachaduras e fraturas.

A análise dos dados do módulo de Young das membranas demonstrou que as alterações nos percentuais de poloxamer (M2) e mucina (M3) resultaram em maior rigidez para as membranas, no entanto, não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0.05$). A única diferença estatística foi observada para a amostra M1. O módulo de Young é um ensaio que mede a rigidez apresentada pelo material, quanto mais alto os valores do módulo, mais rígido é o material.

Embora não haja uma correlação direta e linear entre o módulo de Young e a força de ruptura, foi possível observar uma tendência para as membranas, onde o módulo de Young mais alto também apresentou maior força de ruptura. Esse fato pode acontecer porque uma membrana rígida e com módulo alto tende a suportar uma carga maior antes de atingir a região da deformação plástica e, conseqüentemente, a ruptura das ligações nas cadeias poliméricas.

5.11.5. Intumescimento

O intumescimento da membrana está relacionado à quantidade de absorção de água ou fluido a partir do meio circundante. Quando a membrana entra em contato com um meio aquoso pode intumescer devido a interações hidrofílicas e à capacidade exercida pelos componentes poliméricos de absorverem o líquido (Karoyo; Wilson, 2021; Modgill et al., 2016). A capacidade de absorção de líquido da membrana é uma característica funcional importante, pois afeta de forma direta outras propriedades do

material, como mucoadesividade e resistência mecânica (Boateng; Popescu, 2016; Du, X. et al., 2021). Desta forma, a capacidade de intumescimento das membranas foi avaliada por contato em superfície hidratada. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 42.

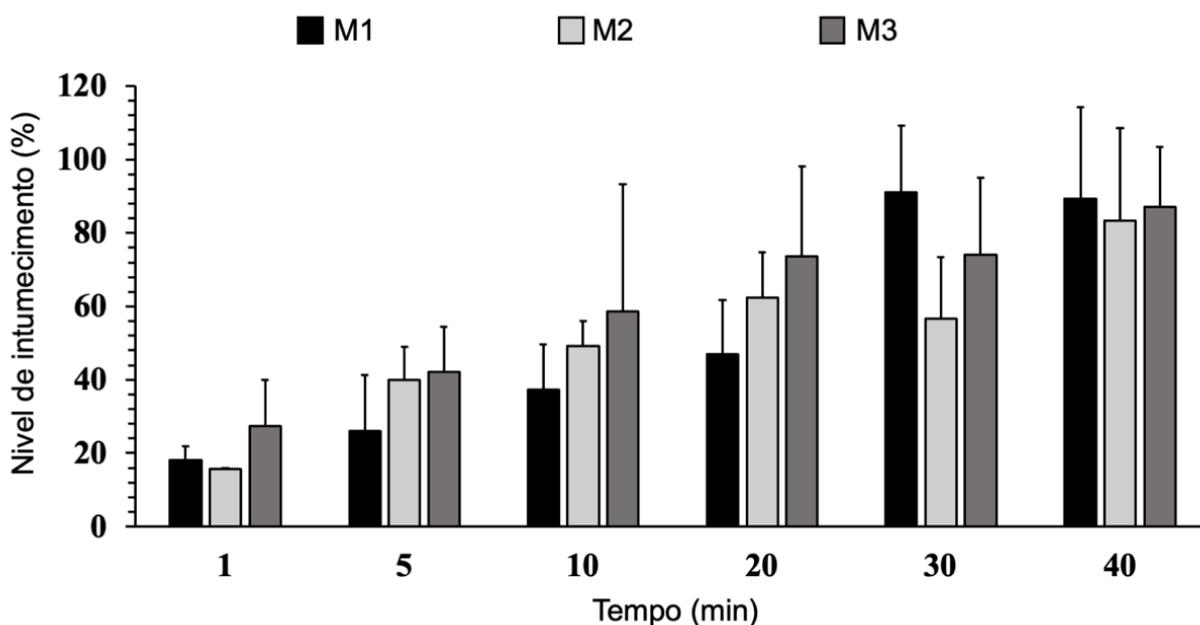


Figura 46. Percentual de intumescimento das membranas poliméricas M1, M2 e M3.

A análise dos resultados evidenciou um intumescimento inicial acima de 15% para todas as membranas no tempo de 1 minuto de contato ($p > 0.05$). Após 40 minutos de contato, foram registrados valores superiores a 80% de intumescimento para todas as membranas ($p > 0.05$). De modo geral, a capacidade de intumescimento seguiu um aumento gradual nos valores de absorção de líquido, contudo, apesar dos valores nominais distintos registrados em cada tempo do estudo (1 – 40 minutos), não apresentou-se diferenças estatísticas significativas entre M1, M2 e M3 ($p > 0.05$).

Os resultados de intumescimento obtidos por meio das membranas constituem um parâmetro crucial para a compreensão dos potenciais mecanismos de mucoadesão. Visto que o fluido lacrimal simulado utilizado no modelo ocular ao entrar em contato com a membrana polimérica causa a absorção do fluido e aumenta a área de superfície do material. Além disso, o processo de intumescimento promove o relaxamento das cadeias poliméricas da matriz, favorecendo a formação de espaços intersticiais (poros) na membrana. A formação desses espaços pode servir como locais para interpenetração e emaranhamento das moléculas do fármaco.

5.8.12.4 Análise de morfologia da membrana polimérica

A estrutura morfológica da superfície das membranas poliméricas e da córnea suína foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise MEV mostrou que a superfície da córnea suína apresenta rugosidade, que não se limitou a uma zona óptica, mas também foi observada na periferia da amostra. Além disso, exibiam morfologia uniforme e relevo suave. Nas micrografias (Figura 46 – C e 46 – D) da membrana polimérica foram observadas presença de poros e morfologia superficial irregular, quando comparadas às características apresentadas pela córnea suína (Figura 47 – A e 47 – B).

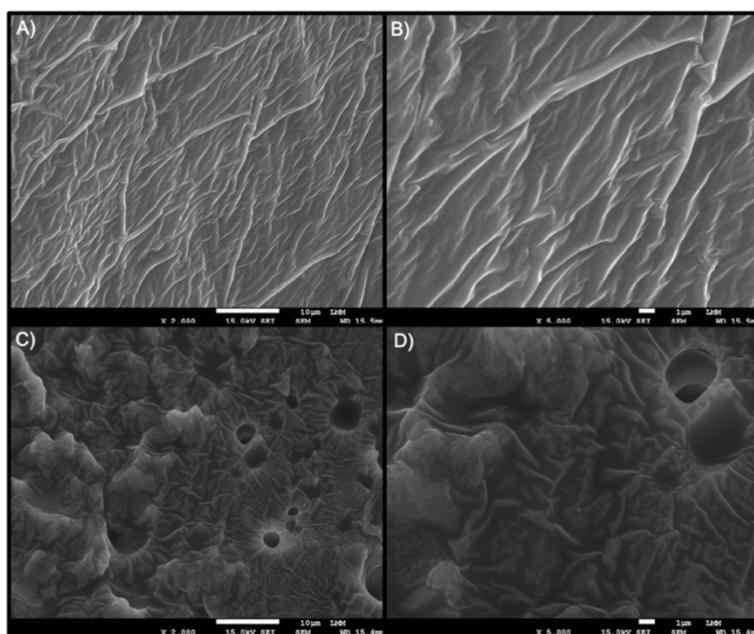


Figura 47. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da córnea região superior superficial e da membrana híbrida na região superior. A) Córnea superior no aumento de 10 μm B) Córnea superior no aumento de 1 μm C) Membrana polimérica região superior no aumento de 10 μm D) Membrana polimérica região superior no aumento de 1 μm .

Ao analisar a região transversal da membrana polimérica também foi observada a presença de poros (Figura 48- D), porém com menor irregularidade em relação à córnea suína. A rugosidade observada na região transversal da córnea após o corte também apresenta áreas com textura granular (Figura 48–B).

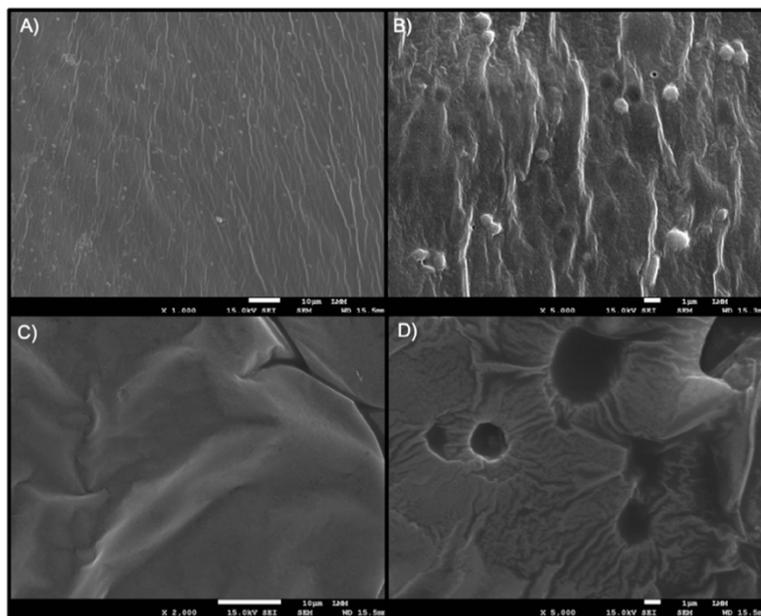


Figura 48. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da córnea transversal e da membrana híbrida transversal. A) Córnea transversal no aumento de 10 μm B) Córnea transversal no aumento de 1 μm C) Membrana polimérica transversal no aumento de 10 μm D) Membrana polimérica transversal no aumento de 1 μm .

As características superficiais apresentadas pela membrana polimérica podem ser otimizadas para melhor reproduzir a superfície da córnea. Contudo, é importante destacar que a finalidade da membrana é a compatibilidade com os mecanismos de mucoadesão realizados pela córnea, permitindo assim melhor desempenho do material em relação aos testes realizados com o modelo OphthalMimic.

5.11.6. Desafio das membranas poliméricas no modelo *in vitro* OphthalMimic

O modelo OphthalMimic foi desafiado com duas formulações de gel baseado nos polímeros poloxamer e QS usando o FLU a 0,2%, utilizando as três membranas desenvolvidas e caracterizadas para avaliar a capacidade do dispositivo em diferenciar formulações oftálmicas quanto a sua mucoadesividade perante a presença de fluxo lacrimal simulado. As formulações utilizadas para esse desafio foram PLX16 e PLX16QS1,0%, como já descritas no item 4.2.1.

Para isso, os testes foram realizados com tempo total de 5 minutos, para garantir a integridade das membranas após o intumescimento. Foi utilizado o fluxo de 1mL/min levando em consideração a área exposta do dispositivo a fim de simular a capacidade lacrimal adequada. Foi aplicado 300 μL de cada formulação para os testes

mantendo o mesmo padrão das formulações dos testes *ex vivos*. Todas as amostras foram realizadas em sextuplicatas.

Os resultados da membrana 1, conforme mostrado na Figura 49 (M1) evidenciam a capacidade do modelo de distinguir as formulações com base no seu potencial mucoadesivo. No caso da formulação contendo 1,0% de QS, foi observada uma menor drenagem ($27 \pm 9,78\%$), indicando que a substância foi mais retida na membrana em comparação com a formulação que não continha o componente mucoadesivo ($65 \pm 14\%$). Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Continuando os testes de desafio com a membrana 2, conforme mostrado na Figura 49 (M2), o padrão de drenagem permanece mesmo com o aumento do plastificante mantendo assim capacidade do modelo de distinguir as formulações com base no seu potencial mucoadesivo. Na membrana 2, o PLX16 manteve valores aproximados de drenagem ($58 \pm 6,0\%$) quando comparada à M1. No caso da formulação PLX16QS1,0%, foi observada uma drenagem levemente maior ($39 \pm 9,0\%$), indicando que a substância pode ter sido mais retida na membrana em comparação com a M1, sugerindo assim menor interação com a membrana devido a maior concentração de plastificante. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Nos testes à membrana 3, com o aumento da porcentagem de mucina para 1,0% é possível confirmar uma interação mais eficaz da mucina contida na membrana com a formulação, conforme mostrado na Figura 49 (M3). Isso resultou em uma porcentagem de drenagem mais elevada quando comparada à M2, para a formulação PLX16QS1,0%, mas semelhante a M1. No entanto, a formulação PLX16 ($55 \pm 6\%$) apresentou maior porcentagem de drenagem comparada à PLX16QS1,0% ($27 \pm 10\%$), com uma diferença estatisticamente diferente ($p < 0,05$), e manteve um padrão de drenagem quando comparada às outras membranas, o que mais uma vez comprova a capacidade do dispositivo em diferenciar as formulações.

Todas as formulações exibiram um comportamento semelhante nas diferentes membranas, com a formulação contendo componente mucoadesivo apresentando menor capacidade de drenagem, logo, maior mucoadesão ao sistema quando exposta ao fluxo lacrimal simulado em comparação com a formulação contendo apenas poloxamer. Esses dados estão alinhados com os resultados obtidos nos estudos de penetração usando o modelo dinâmico *ex vivo* com olhos suínos inteiros. Nesses estudos, a formulação PLX16QS1,0% demonstrou uma maior penetração ocular,

mesmo quando exposta ao fluxo lacrimal simulado. Isso sugere uma maior mucoadesividade à córnea e, por conseguinte, uma capacidade aprimorada de penetração do fármaco. Esses achados sugerem que a formulação tem a capacidade de permanecer por períodos prolongados na superfície ocular.

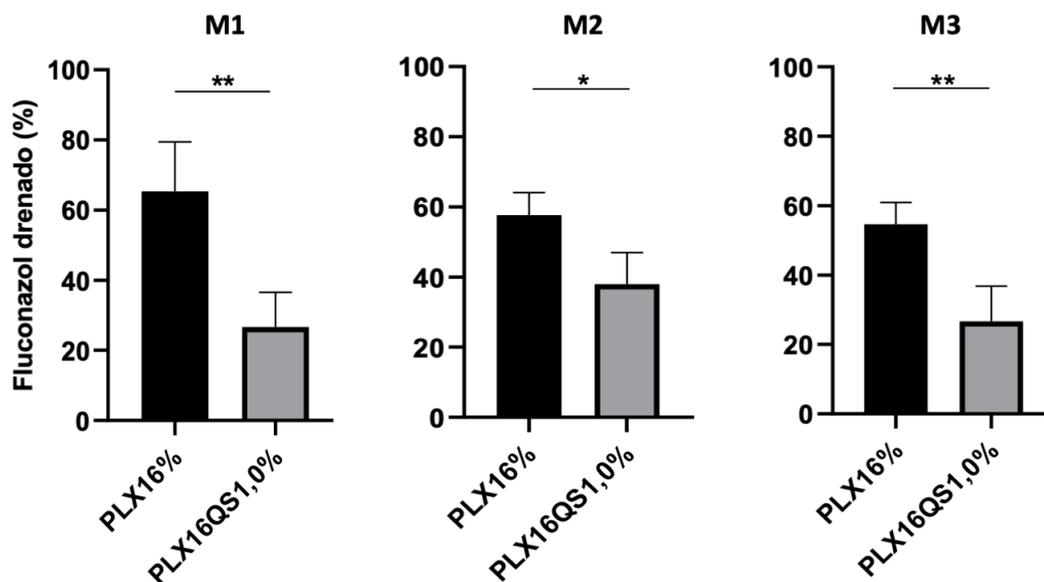


Figura 49. Porcentagem de FLU drenado no modelo OphthalMimic a partir das formulações de PLX16% e PLX16QS1,0%. A) Formulações testadas na membrana 1. B) Formulações testadas na membrana 2. C) Formulações testadas na membrana 3. As diferenças estatísticas foram verificadas pelo teste *t-test*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Dessa forma, o dispositivo demonstra efetivamente que a formulação contendo um excipiente mucoadesivo em sua composição mantém uma retenção prolongada em contato com a membrana polimérica desenvolvida. É amplamente reconhecido que a presença de QS pode estender o tempo de retenção na superfície ocular, e esses resultados preliminares validam a capacidade desta tecnologia em reproduzir essa característica totalmente *in vitro*, distinguindo formulações de maior tempo de permanência na superfície ocular das formulações convencionais. Com base nesses resultados, podemos concluir que as membranas também têm potencial para serem utilizadas em uma variedade de formulações, oferecendo versatilidade em sua aplicação.

5.11.7. Otimização do modelo “OphthalMimic”

Mesmo assim uma análise dos resultados revelou pontos de melhoria na invenção e destacou a necessidade de efetuar alterações no design do modelo, para que fosse acoplada uma pálpebra artificial e simular, assim, mais uma força de drenagem. Essas modificações foram planejadas e implementadas com o objetivo de aperfeiçoar pontos específicos e maximizar o desempenho do dispositivo. Nessa nova versão, o modelo foi dividido em três partes distintas: a base, o molde para a membrana e uma parte superior que simula o *cul-de-sac* e possui a entrada do fluido lacrimal.

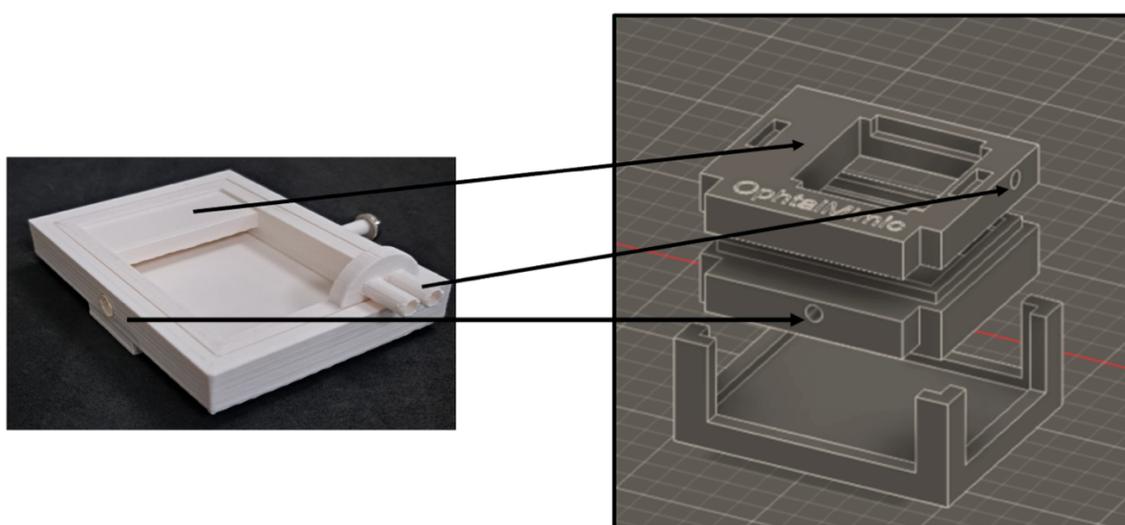


Figura 50. Imagens demonstrando as melhorias na segunda modificação do modelo OphthalMimic.

Durante o processo de aprimoramento foram consideradas variáveis, como a eficácia do fluxo, a estabilidade temporal dos resultados, a precisão das medições e a confiabilidade das condições de operação. Com base nas limitações identificadas nos testes exploratórios, foram desenvolvidas estratégias para superar esses desafios e alcançar um desempenho aprimorado.

As alterações de design incluíram modificações estruturais e funcionais no modelo OphthalMimic. Foram realizados ajustes no sistema de escoamento para garantir uma distribuição adequada da formulação e uma simulação mais precisa das condições oculares. A separação em três partes (Figura 51 - A, B e C) permitiu um controle mais preciso do fluxo da formulação e o encaixe de uma pálpebra móvel

(Figura 51-F). A base (Figura 51-A), fornece a estabilidade necessária para o dispositivo, enquanto o molde para as membranas (Figura 50-B), garante a formação mais uniforme das membranas. A parte superior (Figura 50-C), com a área de *cul-de-sac* simulada e a entrada do fluido lacrimal, permite uma melhor reprodução das condições oculares e o fluxo controlado da formulação. Essa divisão em partes distintas contribui para a prevenção de vazamentos e garante uma maior eficiência e confiabilidade do modelo OphthalMimic.

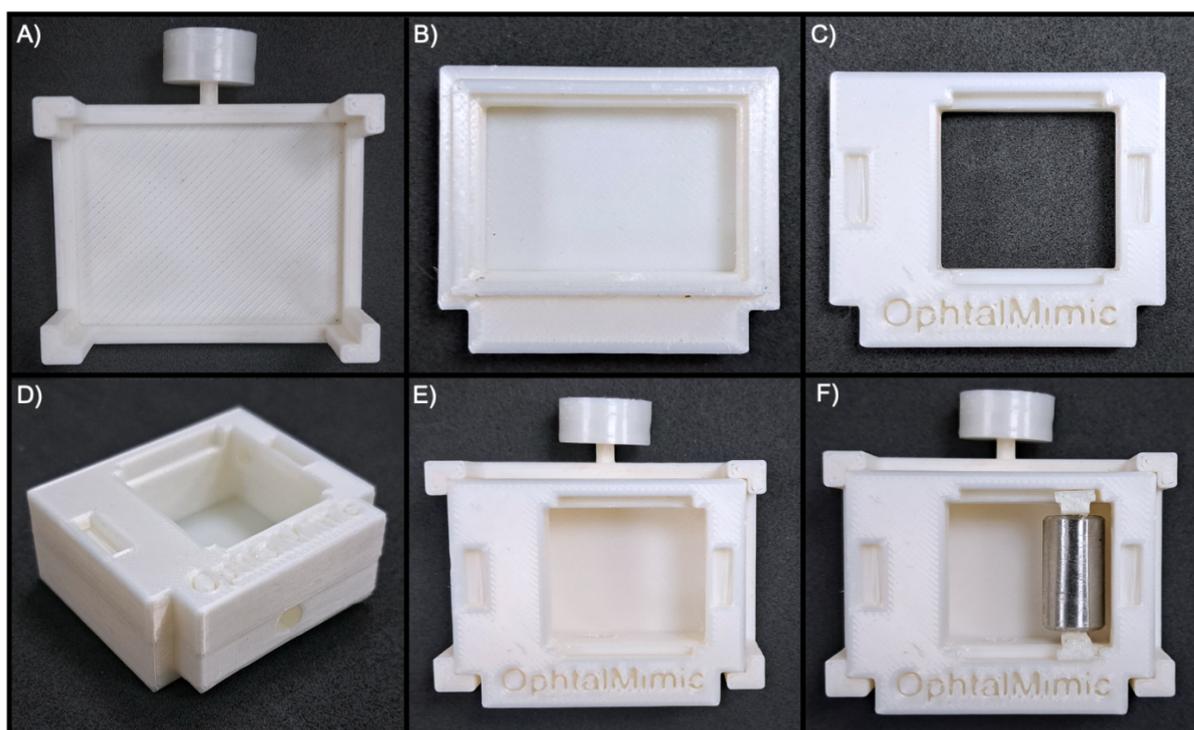


Figura 51. Imagens demonstrando as melhorias na segunda modificação do modelo OphthalMimic completo.

Com essas alterações, o novo modelo proporcionou resultados mais precisos e consistentes nos testes exploratórios, permitindo uma análise mais confiável e representativa do desempenho dos produtos. Esse modelo também teve a área exposta reduzida para que se pudesse chegar mais próximo a condições de reprodução de uma superfície ocular. O modelo na Figura 51, conta com as dimensões de 2.4 x 3.4 cm.

5.8.11. Desenvolvimento das membranas híbridas baseada em hidrogel.

Os testes realizados após as melhorias no modelo também contou com desenvolvimento de uma membrana híbrida baseada em hidrogel de três camadas,

mostrada na Figura 52, para a avaliação de formulações oftálmicas *in vitro*, para que fosse simulada a complexidade das camadas da córnea e também uma maior resistência ao modelo utilizando a pálpebra móvel. Essa membrana híbrida baseada em hidrogel foi desenvolvida como uma alternativa às membranas poliméricas.

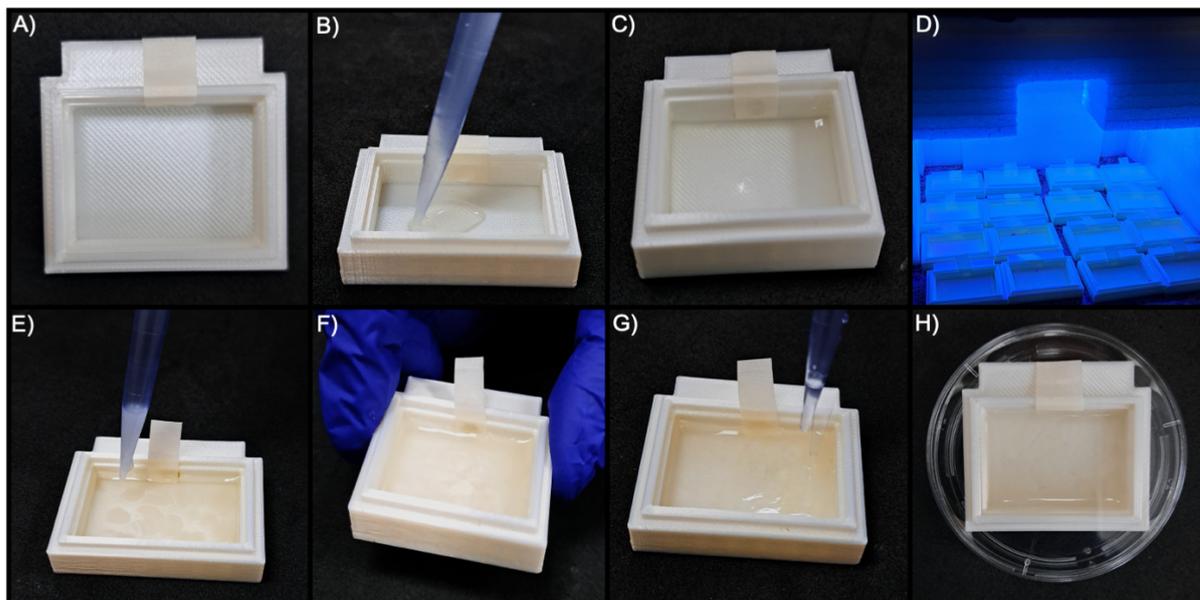


Figura 52. Imagem passo-a-passo da montagem das membranas híbridas baseadas em hidrogel na base do modelo OphthalMimic. A) A saída de fluxo lacrimal simulado é vedada com uma fita. B) Adição da gelatina metacrilato. C) Formação da primeira camada base da membrana. D) Fotopolimerização opôs a adição de cada camada. E) Adição da mucina metacrilato. F) Movimento da base para mistura das camadas. G) Adição da camada de fosfolípido. H) Armazenamento das membranas em placa de petri para ser submetida ao tempo de cura por 3 dias.

Desta forma foi proposta a síntese de membranas híbridas baseadas em hidrogéis para mimetizar as barreiras da córnea, desenvolvendo um hidrogel composto por três camadas distintas, (I) hidrofílica (Figura 51-B), (II) mucoadesiva (Figura 51-E) e (III) fosfolipídica (Figura 51-G), como demonstrado na Figura 48.

Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais compostos por polímeros hidrofílicos reticulados, sendo capazes de absorver e reter grandes quantidades de água em uma estrutura hidratada. Normalmente os hidrogéis possuem concentrações de 0.1 a 10% (m/m), possibilitando que sejam altamente porosos e possam permitir a difusão de nutrientes, gases, biomoléculas e metabólitos.

A rede hidrofílica homopolimérica ou copolimérica dos hidrogéis é reconhecida por sua capacidade de absorver água, a qual é atribuída a presença de grupos

hidrofílicos como -CONH, -SO₃H e -OH. Estes grupos funcionais permitem que os hidrogéis se hidratem até 90% em relação à massa original dos polímeros. Esta proporção de água e polímero afeta suas características físico-químicas, que podem ser muito semelhantes aos tecidos vivos, apresentando baixa tensão interfacial com fluidos biológicos e água. Estes materiais são amplamente utilizados para cultura de células, aplicações biomédicas e biotecnológicas por sua semelhança com a matriz extracelular encontrada em tecidos *in vivo*, muitas vezes similares aos tecidos moles nativos.

Os hidrogéis baseados em polímeros naturais são sintetizados a partir da conjugação de grupos metacrilamida aos grupos amino residuais do aminoácido lisina resultando em metacrilamidas (ex.: gelatina metacrilamida). E então é realizada a polimerização (Figura 51-D) e *crosslink* destes materiais, como estratégia mais difundida a fotopolimerização, realizada na presença de um fotoiniciador e exposição à luz ultravioleta. A fotopolimerização (reticulação) de polímeros naturais conjugados à metacrilamida permite a micro fabricação de hidrogéis únicos com diferentes padrões, morfologias, estruturas e graus de polimerização.



Figura 53. Imagem da membrana híbrida baseada em hidrogel de três camadas.

Esta membrana híbrida (Figura 49) apresenta características inovadoras, incluindo alta retenção de líquidos e resistência significativa ao fluxo. Sua capacidade de retenção de líquidos é crucial para simular as condições oculares e permitir uma avaliação precisa das formulações oftálmicas. Além disso, sua resistência ao fluxo garante uma distribuição uniforme e controlada da formulação durante os testes.

Sua capacidade de alta retenção de líquidos, resistência ao fluxo e semelhança estrutural com a córnea fornecem um ambiente mais realista e representativo para o teste de formulações oftálmicas, permitindo uma avaliação mais precisa e confiável do desempenho dos produtos. Essas características técnicas do hidrogel híbrido de três camadas representam um avanço significativo na avaliação de formulações oftálmicas *in vitro*.

5.8.12. Caracterização das membranas híbridas baseada em hidrogel

5.8.12.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

A análise por FTIR foi realizada para confirmar a síntese da gelatina metacrilato, mucina metacrilato e do hidrogel híbrido de três camadas. Os dados obtidos no FTIR (Figura 54) indicam que a gelatina, mucina e o 2-metacrilóioxiethyl fosforilcolina apresentam grupos funcionais característicos compatíveis com a literatura (Aslam et al., 2023; Dey; Agnelli; Sartone, 2023; Fauziyah, 2023; Feliciano et al., 2023; Gavriely; Richter; Zucker, 2022; Hou et al., 2020).

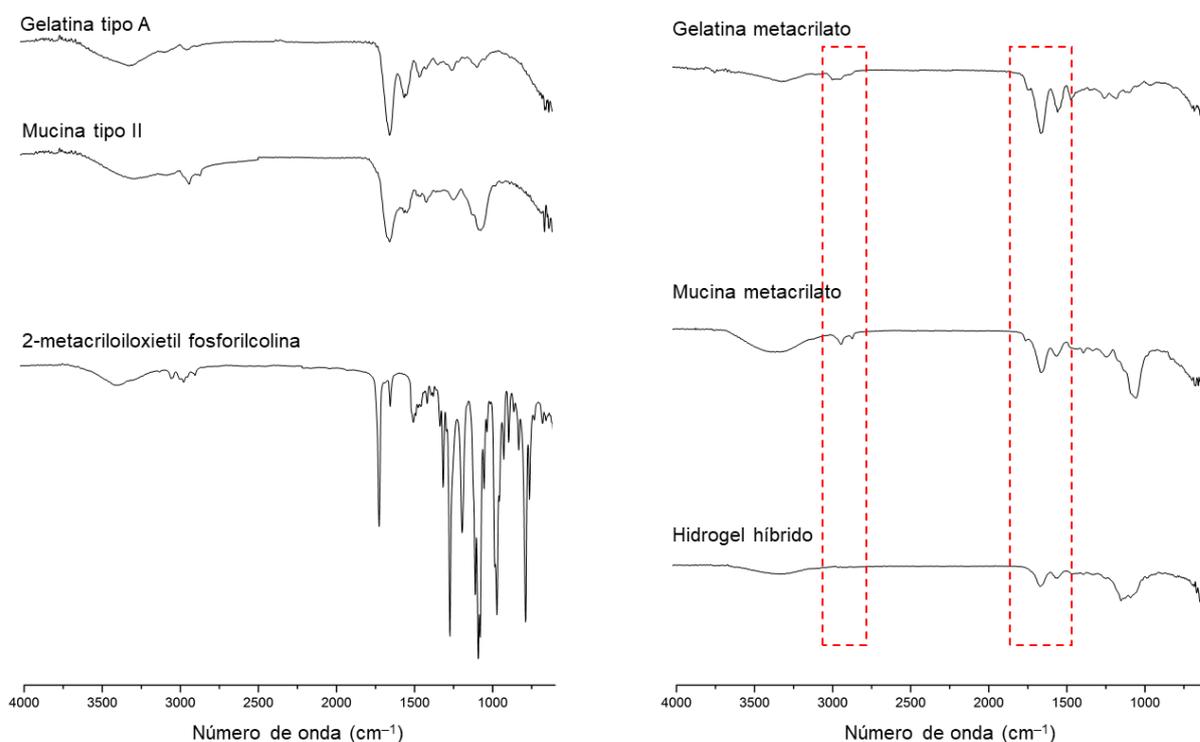


Figura 54. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier dos componentes isolados e da membrana híbrida baseada em hidrogel completa.

O espectro da Gelatina metacrilato derivou da modificação da gelatina com o anidrido metacrilato. Dessa forma, os espectros tiveram bandas de transmitância com número de onda semelhantes, uma banda larga entre 3600 - 3300 cm^{-1} (associados à sobreposição de grupos na vibração de estiramento das ligações NH e OH) e as bandas na região de 2937 cm^{-1} atribuído à vibração de alongamento do grupo CH. Além da diferença de intensidade observada entre os espectros, principalmente na banda em 1637 cm^{-1} que corresponde à vibração de alongamento da ligação C=O, essa banda apresenta a interação entre a gelatina e o anidrido metacrilato (RAHALI et al., 2017; RUIZ et al., 2020). Também foi observado o surgimento de duas novas bandas no espectro da gelatina metacrilato em 1732 cm^{-1} e 1163 cm^{-1} . Esses resultados fornecem evidências quanto ao sucesso na metacrilção da gelatina.

A mucina metacrilato apresenta um complexo espectro de FTIR devido à estrutura de proteína e oligossacarídeo presente na mucina. O espectro apresentou uma banda larga entre 2990 cm^{-1} e 3700 cm^{-1} atribuído à vibração de estiramento sobreposta das ligações NH e OH presentes em todas as unidades de aminoácidos. As mudanças observadas nessa região indicam a ação do anidrido metacrilato. Contudo, a presença de uma banda adicional em um número de onda de 1745 cm^{-1} , que surge na região da ligação C=O, corresponde aos resíduos dos grupos carbonila do anidrido metacrilato no processo de síntese (Barik; Kundu; Dash, 2021; Duffy; David; Crouzier, 2015 ; Rickert et al., 2023), confirmando o sucesso na metacrilção da mucina.

Por fim, no espectro de FTIR do hidrogel híbrido de três camadas foram observadas alterações evidentes, como a atenuação das bandas na região entre 3000 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} . Em relação à gelatina metacrilato (primeira camada) foi observada a atenuação de intensidade das bandas correspondentes às amidas I (1646 cm^{-1}), amida II (1540 cm^{-1}) e amida III (1238 cm^{-1}), o que indica pontos de interações químicas.

Na segunda camada composta pela mucina metacrilato, também foi observada atenuação nas bandas características dos aminoácidos e com leves deslocamentos na amida I (1642 cm^{-1}) e na amida II (1229 cm^{-1}).

Na terceira camada (fosfolipídica), embora as bandas características relacionadas ao 2-metacrilóiloxietil fosforilcolina não tenham mostrado intensidades proeminentes devido aos fracos sinais reflexivos, algumas bandas em números de onda específicos podem ter sofrido sobreposição, como em 1639 cm^{-1} (C=C), 1074

cm^{-1} (P–O–C) e 968 cm^{-1} (N⁺–C), sugerindo interações do 2-metacrilóxi-etil fosforilcolina na superfície do hidrogel.

5.8.12.2. Calorimetria exploratória diferencial – DSC

A análise térmica do hidrogel híbrido de três camadas e dos componentes utilizados como matéria-prima foram realizadas para entender o comportamento de transição de fases utilizando a calorimetria diferencial exploratória – DSC. Os termogramas da gelatina, mucina, 2-metacrilóxi-etil fosforilcolina, gelatina metacrilato, mucina metacrilato e hidrogel são apresentados na Figura 55.

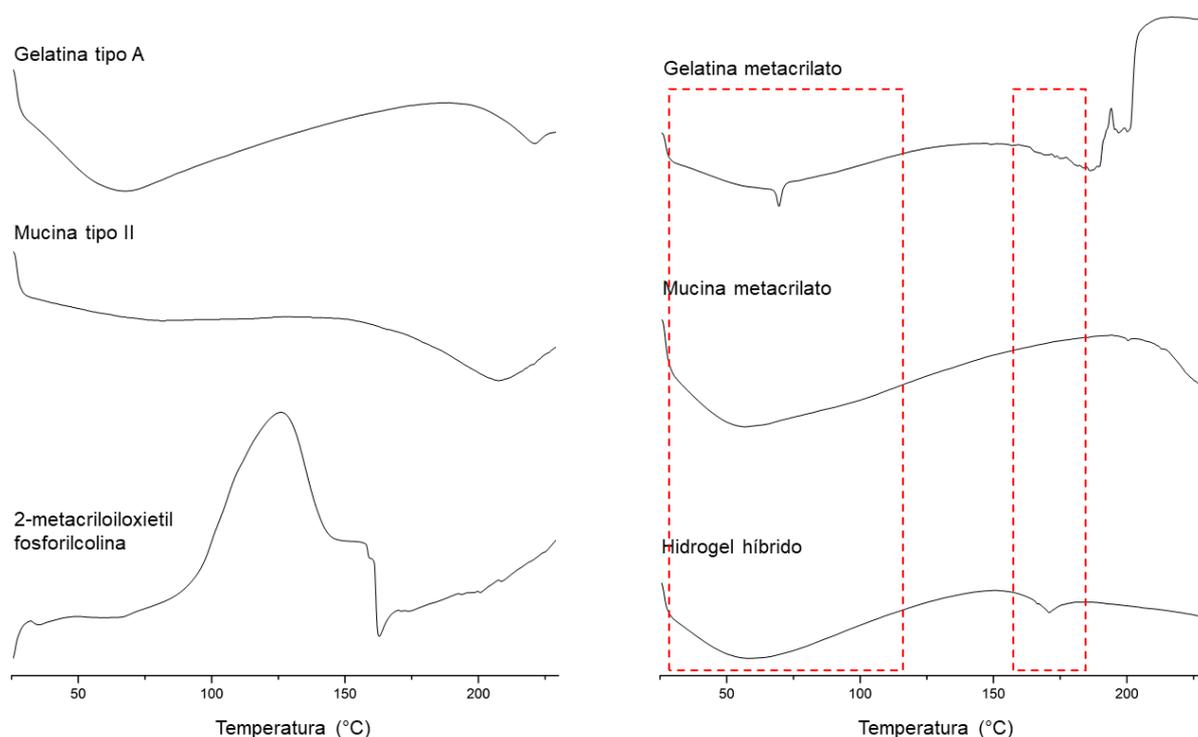


Figura 55. Calorimetria diferencial exploratória dos componentes isolados e das membranas híbridas baseada em hidrogel completa.

No termograma do hidrogel híbrido sintetizado foi observada a presença de dois picos endotérmico distintos. O primeiro evento térmico foi registrado em $58,07^\circ\text{C}$, com *onset*: $28,08^\circ\text{C}$ – *endset*: $118,48^\circ\text{C}$, está relacionado à perda de moléculas de água ainda presentes na amostra, mesmo após processo de liofilização.

O processo de liofilização consiste na secagem por meio da remoção de água de um material congelado por sublimação, sem a fusão intermediária da água. O teor de umidade final do liofilizado é um resultado importante para estabilidade, sendo

dependente dos parâmetros de secagem por dessorção utilizados. Para produtos farmacêuticos, é comum atingirem teores de matéria seca entre 98 a 99% (Nowak; Jakubczyk, 2020; Tang; Pikal, 2004). Portanto, o hidrogel liofilizado pode reter uma pequena quantidade de água residual, uma vez que a liofilização não remove toda a água da amostra. Contudo, podemos observar uma grande diferença no conteúdo de água presente na estrutura do hidrogel antes de sua secagem, onde o valor apresentado foi 10 vezes maior ao seu peso seco após liofilização.

Com o avanço da temperatura, essa primeira transição também pode envolver mudanças nas interações intermoleculares e na organização espacial da base proteica que compõem o hidrogel. Além disso, foi registrado um ΔH de 162,99 J/g, sugerindo que essa transição térmica requer uma quantidade significativa de calor para elevar a temperatura do hidrogel.

O segundo evento térmico apresentado foi registrado em 170,96°C, indicando uma segunda transição térmica subsequente. Essa transição pode ser correlacionada com o início do estágio de decomposição térmica do hidrogel, fato também observado pela análise de TGA.

5.8.12.3. Análise termogravimétrica – TGA

Na análise TGA realizada para a membrana híbrida baseada em hidrogel de três camadas foram registrados dois estágios distintos de decomposição térmica, como apresentado na Figura 56. O primeiro estágio observado foi registrado na faixa de temperatura de 30 – 170°C, com um pico de perda de peso observado em 75,1°C. Durante essa faixa de temperatura, o hidrogel apresentou uma perda de 8,57% de seu peso total.

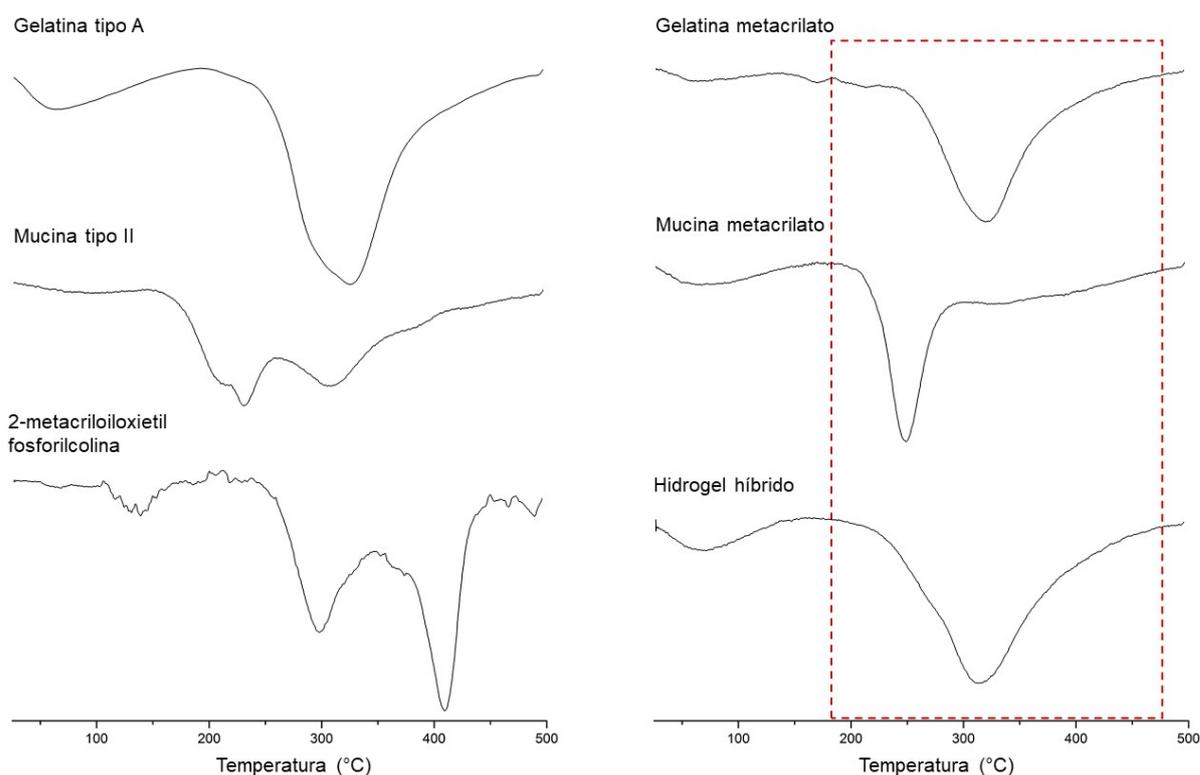


Figura 56. Análise termogravimétrica dos componentes isolados e das membranas híbridas baseadas em hidrogel completa.

Essa perda de peso inicial sugere que a membrana ainda continha uma quantidade de água residual, que estava sendo evaporada gradualmente, mesmo após o processo de secagem prévia por liofilização para realização da análise térmica.

No segundo estágio registrado na faixa de temperatura de 170 – 500°C, correspondente à temperatura de decomposição máxima (Tmax) da membrana, apresentou um pico de decomposição significativo a 317,25°C. Durante esse estágio, a perda de peso foi mais expressiva, totalizando 60,45%. Portanto, esse estágio indica uma degradação térmica significativa da membrana, onde as ligações químicas presentes na matriz polimérica e que foram estabelecidas durante o processo de fotopolimerização começaram a se quebrar.

De acordo com esse resultado, o pico a 317,25°C representa a temperatura na qual ocorreu a decomposição máxima da amostra, indicando sua estabilidade térmica até esse ponto. Além disso, ao final da análise térmica foi registrada uma massa residual de 30,98%. Essa massa sugere que a membrana ainda continha resíduos de sua matriz polimérica que não se decompõe durante a faixa de temperatura utilizada nesse experimento.

5.8.12.3 Análise do conteúdo de água da membrana híbrida baseada em hidrogel

A membrana híbrida baseada em hidrogel de três camadas foi avaliada quanto ao seu conteúdo de água. O resultado obtido demonstrou uma capacidade significativa de retenção, alcançando um valor de $86,25 \pm 0,35\%$. Essa característica é fundamental para a aplicação da membrana, buscando mimetizar a córnea humana.

Estudos indicam que a córnea humana apresenta um valor de conteúdo de água que pode variar entre 72–85% (Barroso et al., 2022; Liang et al., 2011; Phan et al., 2019; Pircher et al., 2003; Yan et al., 2022).

De acordo com o resultado, a membrana híbrida baseada em hidrogel de três camadas sintetizado neste estudo tem um valor de conteúdo de água próximo ao da córnea humana, uma característica que pode garantir a estabilidade durante o tempo de teste no Modelo OphthalMimic e prevenir que haja uma falsa “retenção” da formulação pela higroscopia do gel.

5.8.12.4 Análise de morfologia da membrana híbrida baseada em hidrogel

As análises morfológicas revelaram que a membrana híbrida baseada em hidrogel (Figura 57-C e 57-D) apresenta características mais próximas à córnea suína (Figura 58-A e 58-B) do que as membranas poliméricas em termos de morfologia.

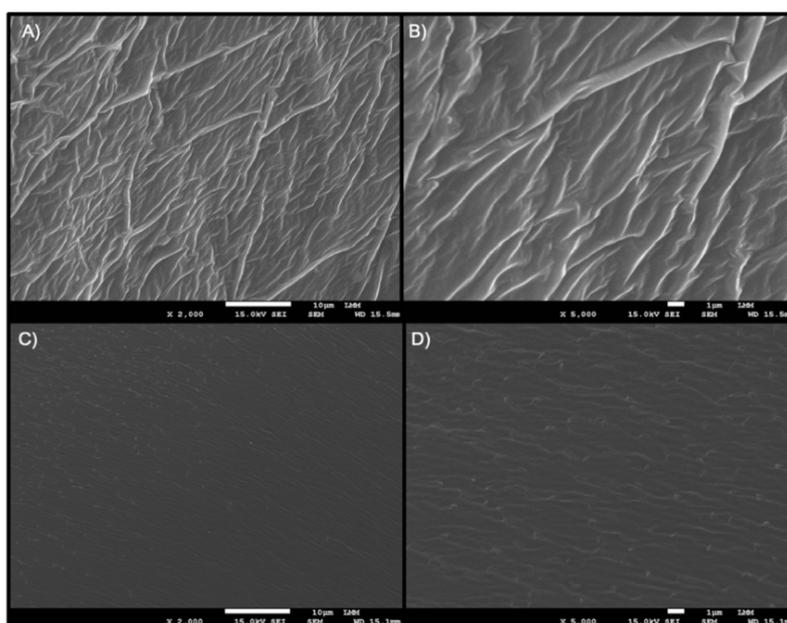


Figura 57. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da córnea região superior superficial e da membrana híbrida na região superior. A) Córnea região superior no aumento de 10 μm B) Córnea região superior no aumento de 1 μm C) Membrana

híbrida região superior no aumento de 1 μm C) Membrana híbrida região superior no aumento de 10 μm D) Membrana híbrida região superior transversal no aumento de 1 μm .

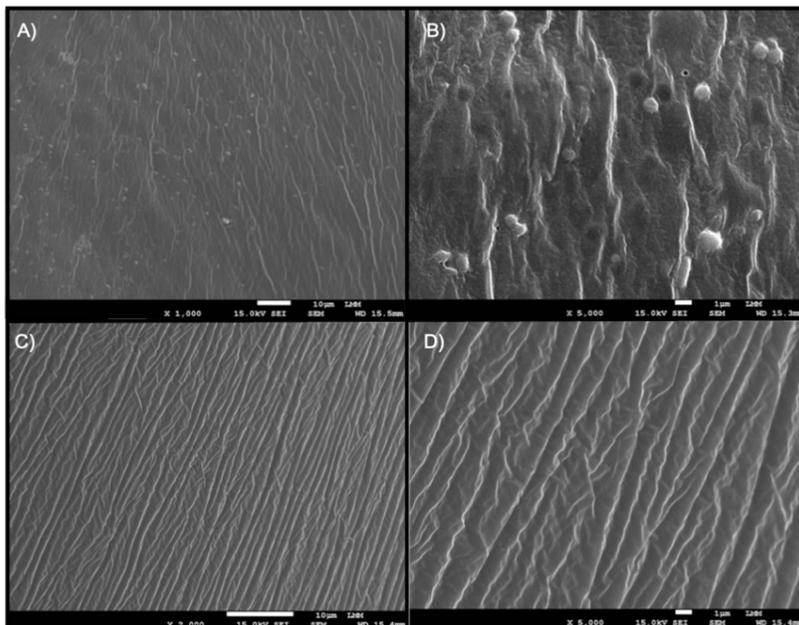


Figura 58. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da córnea transversal e da membrana híbrida transversal. A) córnea transversal no aumento de 10 μm B) córnea transversal no aumento de 1 μm C) Membrana híbrida transversal no aumento de 10 μm D) Membrana híbrida transversal no aumento de 1 μm .

Quando observamos as imagens de corte transversal, nota-se que a membrana híbrida baseada em hidrogel exibe algumas estrias semelhantes à córnea suína. Essa estrutura laminar é vantajosa para a funcionalidade do dispositivo.

A superfície da membrana híbrida é uniforme, o que desempenha um papel fundamental na garantia de uma interação adequada com formulações oftálmicas. A superfície lisa e a estrutura laminar são aspectos benéficos para garantir a eficácia e a interação adequada com produtos oftálmicos, tornando-a uma alternativa promissora para aplicação no dispositivo.

5.8.13. Montagem do protótipo com as membranas híbridas em hidrogel e realização dos testes desafios formulações

O modelo OphthalMimic foi desafiado utilizando uma pálpebra simulada (3,53g) com as seguintes especificações: protótipo de tamanho 2,4 x 3,4 cm, tempo de teste

de 10 minutos, fluxo de 0,5 mL/min e quantidade de formulação aplicada de 300 μ L, (Figura 58).

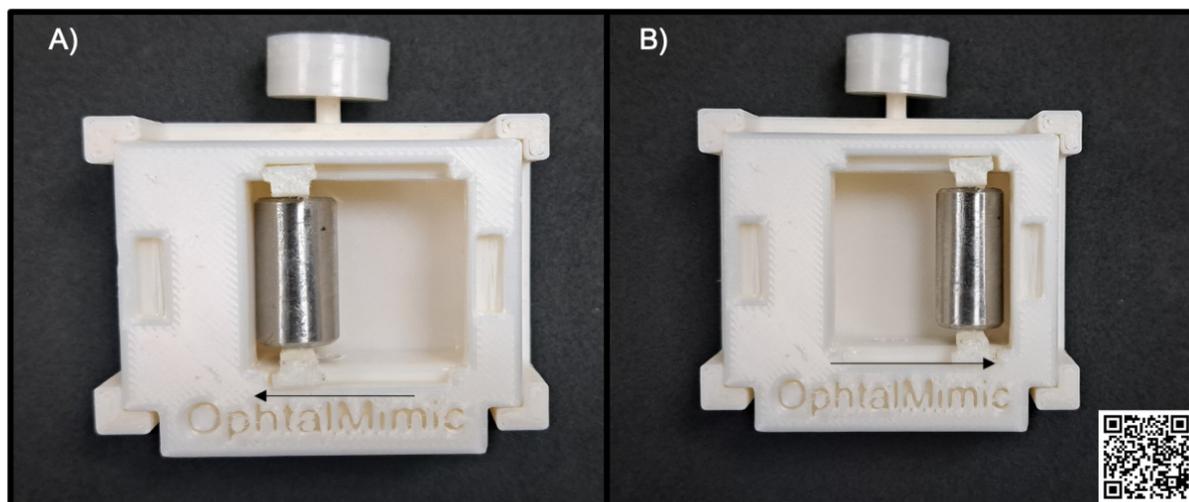


Figura 59. Modelo OphthalMimic modificado com a pálpebra simulada em movimentação, vídeo do dispositivo em funcionamento disponível no QRcode.

O modelo OphthalMimic foi desafiado por meio dos testes de sete formulações de FLU 0,2%: três formulações de poloxamer PLX16, PLX14 e PLX20 e três formulações contendo componente mucoadesivo PLX16Q0,5%, PLX16Q1,0% e PLX16Q1,25%, que possui maior viscosidade e propriedades mucoadesivas, e uma solução aquosa; como também já foi demonstrado nos primeiros testes do modelo *OphthalMimic* na 2 versão. Para cada formulação, foram realizadas seis replicatas para garantir a robustez dos resultados obtidos.

Após os testes no modelo OphthalMimic (Figura 59) os resultados demonstraram que a solução aquosa teve a maior porcentagem de drenagem chegando a $97 \pm 8\%$, praticamente toda a formulação foi drenada com o fluxo lacrimal simulado e a força da pálpebra. As formulações de PLX14, PLX 16 e PLX 20, tiveram drenagem de $79 \pm 5\%$, $72 \pm 4\%$ e $57 \pm 25\%$, respectivamente. Já para as formulações com o componente mucoadesivo a capacidade de drenagem foi ligeiramente menor, PLX16QS0,5% ($69 \pm 1\%$), PLX16QS1,0% ($65 \pm 3\%$) e PLX16QS1,25% ($67 \pm 3\%$), mas semelhantes entre si, devido a essa diferença de concentração ser muito baixa (Figura 60).

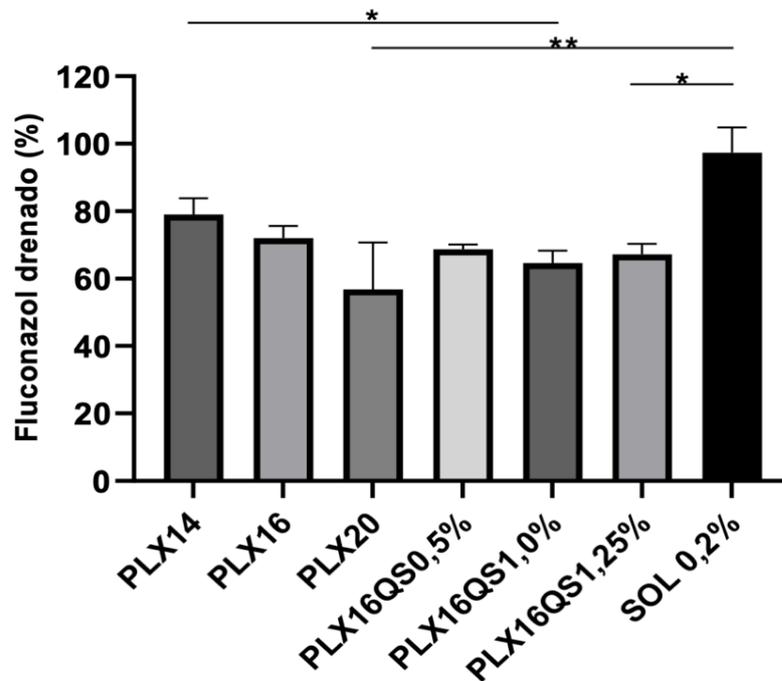


Figura 60. Resultados de porcentagem de FLU drenado no modelo OphthalMimic comparando sete formulações distintas contendo solução aquosa de FLU 0,2%: PLX14; PLX16; PLX20; PLX16QS0,5%; PLX16QS1,0%; PLX16QS1,25%.

O dispositivo OphthalMimic foi capaz de diferenciar as formulações PLX14 e PLX16 da formulação PLX16Q1,0% com base em suas taxas de drenagem do FLU.

Esse último modelo sugere uma representação de drenagem mais fiel à drenagem ocular *in vivo*, visto que a córnea tem alta complexidade e muitas camadas. Juntamente com o fluxo lacrimal simulado e a força da pálpebra essas formulações tem altas taxas de drenagem, conseqüentemente, baixas concentrações de penetração dos fármacos.

6. Resumo dos Resultados

Parte 1: Modelo dinâmico

Um novo modelo alternativo, promissor e sensível a análises de penetração ocular *ex vivo* com fluxo lacrimal simulado foi desenvolvido com sucesso.

O modelo de compartimento doador confeccionado em vidro (versão 5) mostrou-se adequado para a realização dos estudos de penetração ocular *ex vivo* de fármacos em globo ocular inteiro com fluxo lacrimal simulado.

Uma equação matemática foi formulada para descrever os efeitos da depuração teórica do sistema na reprodução do fluxo lacrimal simulado. Uma taxa de 16% de depuração/min por 2 minutos + 11% de depuração/min por 13 minutos mostrou-se adequada para comparar formulações. A evolução do percentual de volume disponível teórico em função do tempo neste caso seguiu um perfil bi-exponencial.

Tais condições de operação foram estabelecidas utilizando uma bomba peristáltica operando sob rotações de 11 rpm e 9 rpm, resultando em fluxos de 48 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 33 $\mu\text{L}/\text{min}$, respectivamente.

Para teste no modelo dinâmico, foram obtidas seis formulações contendo FLU 0,2% a partir de géis de PLX (14% / 16% / 20 %) e géis de PLX com QS (0,5% / 1,0% / 1,25%) e três formulações contendo CUR (1mg/mL).

A avaliação de penetração e retenção de FLU 0,2% na córnea *ex vivo* a partir de géis de PLX, géis de PLX+QS e solução aquosa, demonstraram que ensaios estáticos (utilizando células de difusão do tipo Franz) superestimam os valores de penetração de ativos, enquanto o modelo dinâmico (com fluxo lacrimal simulado) se mostrou mais sensível e realista quanto ao perfil de penetração dos ativos na córnea.

A avaliação da penetração e retenção de CUR no modelo dinâmico indicou, mais uma vez, que este é preciso e sensível para avaliação da entrega de medicamentos em olhos saudáveis, enquanto o modelo estático de olho inteiro apresentou resultados

que sugerem uma possível reprodução na entrega de medicamentos em casos de distúrbios, como a doença do olho seco.

Parte 2: Modelo “OphthalMimic”

Um modelo sensível e totalmente *in vitro* foi desenvolvido para avaliação do desempenho de formulações oftálmicas em relação à sua capacidade de resistir às barreiras dinâmicas que levam à drenagem nasolacrimal de formulações oftálmicas aplicadas topicamente.

Para simular a camada de mucina presente na córnea, foram obtidas e caracterizadas membranas à base de PVA/gelatina, contendo mucina suína tipo II e PLX combinados nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 (m/m), obtendo as membranas M1, M2 e M3, respectivamente. As membranas apresentaram características homogêneas, flexíveis, aparência translúcida, livre de bolhas, com potenciais mecanismos de mucoadesão da matriz polimérica, confirmando interações favoráveis entre os polímeros, com boa compatibilidade e estabilidade térmica.

Foi obtida e caracterizada uma membrana híbrida à base de hidrogel que simula a superfície ocular com três camadas distintas: (I) hidrofílica, (II) mucoadesiva e (III) fosfolipídica, apresentando potenciais mecanismos de mucoadesão, boa compatibilidade e estabilidade térmica entre os materiais. A membrana híbrida demonstrou uma capacidade significativa de retenção de água ($86,25 \pm 0,35\%$) e morfologia semelhantes à córnea humana.

Testes de desempenho no modelo desenvolvido totalmente *in vitro* foram realizados para drenagem de FLU a partir de géis de PLX, géis de PLX+QS e solução aquosa contendo 0,2% de fármaco para estabelecimento de parâmetros operacionais do modelo.

O dispositivo “OphthalMimic” totalmente *in vitro* foi desenvolvido e otimizado, com fluxo lacrimal simulado e uma pálpebra móvel.

A versão 2 do dispositivo “OphthalMimic” totalmente *in vitro* foi capaz de diferenciar as formulações em gel de PLX16 e PLX16QS1,0% quanto à sua capacidade de mucoadesão através das taxas de drenagem do FLU na presença das membranas poliméricas desenvolvidas (M1, M2 e M3).

A versão 3 otimizada do dispositivo “OphthalMimic” foi capaz de diferenciar as formulações contendo FLU 0,2% em géis de PLX e géis de PLX+QS (0,5% / 1,0% / 1,25%) e solução aquosa com base em suas taxas de drenagem do FLU, na presença da membrana híbrida baseada em hidrogel sugerindo a drenagem de formulações mais fiel à drenagem ocular *in vivo*.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram obtidos com sucesso dois modelos complementares alternativos ao uso de animais de experimentação para avaliação do desempenho e eficácia de produtos farmacêuticos de administração oftálmica. O primeiro modelo, utilizando globo ocular inteiro com fluxo lacrimal simulado, mostrou-se adequado para avaliar o desempenho das formulações quanto à penetração do fármaco na córnea. Esse modelo representa uma inovação promissora no campo da avaliação de desempenho de medicamentos oftálmicos, marcando um avanço significativo na redução e substituição de animais vivos em experimentação. Com sucesso, foram estabelecidos parâmetros de montagem, otimização e operação, tornando-o totalmente aplicável na pesquisa e desenvolvimento de formulações oftálmicas, uma vez que os resultados obtidos indicam que este modelo é capaz de distinguir entre formulações inovadoras, proporcionando, assim, uma alternativa mais realista em relação aos tradicionais experimentos estáticos. O “OphthalMimic”, segundo modelo desenvolvido, totalmente *in vitro* com uma superfície mucoadesiva para mimetizar a córnea, fluxo lacrimal simulado e uma pálpebra móvel, mostrou-se também útil para comparar formulações oftálmicas, permitindo uma triagem de alto rendimento durante as fases de pesquisa e desenvolvimento. A capacidade desse dispositivo de imitar a dinâmica e as barreiras físico-químicas do olho sob condições reais de aplicação de formulações oftálmicas pode permitir o desenvolvimento de sistemas de administração de medicamentos mais eficazes e seguros. O dispositivo OphthalMimic pode, portanto, servir como uma ferramenta de triagem de alto rendimento para formulações oftálmicas como suspensões, emulsões, géis e soluções.

8. Outras considerações.

Durante este trabalho foi realizado estágio doutoral sanduíche no laboratório Buchanan Ocular Therapeutics Unit – BOTU, Auckland – Nova Zelândia, onde foram realizadas etapas experimentais com as formulações contendo curcumina utilizadas nos o modelo dinâmico *ex vivo* com fluxo lacrimal simulado e o modelo estático *ex vivo* de olho inteiro.

São produtos diretos do desenvolvimento da tese até o momento:

Barbalho, G.N.; Falcão, M.A.; Lopes, J.M.S.; Lopes, J.M.; Contarato, J.L.A.; Gelfuso, G.M.; Cunha-Filho, M.; Gratieri, T. Dynamic Ex Vivo Porcine Eye Model to Measure Ophthalmic Drug Penetration under Simulated Lacrimal Flow. **Pharmaceutics**. 2023, 15, 2325. DOI:10.3390/pharmaceutics15092325.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR102022009997, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 25/05/2022.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.; CUNHA-FILHO, M.; BARBALHO, G. 'Dispositivo para avaliação do desempenho de formulações oftálmicas *in vitro* em relação à sua capacidade de resistência às barreiras dinâmicas que levam à drenagem de fármacos e método de avaliação do desempenho de formulações oftálmicas utilizando tal dispositivo'.

Junto a esta proteção está em andamento, a obtenção do certificado de adição do pedido de patente de Invenção referente às melhorias feitas no dispositivo OphthalMimic e a proteção de Modelo de utilidade referente aos géis miméticos da superfície corneana desenvolvidos para o produto e seu uso, além do pedido de patente de Desenho Industrial referente às melhorias feitas no dispositivo OphthalMimic.

Outros três artigos estão sendo preparados, referentes à utilização do modelo com as formulações contendo curcumina; à descrição do modelo OphthalMimic com as membranas poliméricos e às possibilidades para fins comparativos e regulatórios com o uso do hidrogel como base.

8.1. Produtos indiretos do trabalho.

Durante o período do doutorado a aluna colaborou em outros trabalhos do grupo, gerando as seguintes publicações:

Costa, R. H. F., Krawczyk-Santos, A. P., Martins Andrade, J. F., Barbalho, G. N., Almeida, R. M., Nóbrega, Y. K. M., Cunha-Filho, M., Gelfuso, G. M., Taveira, S. F., & Gratieri, T. (2023). α -Cyclodextrin-based poly(pseudo)rotaxane for antifungal drug delivery to the vaginal mucosa. **Carbohydrate polymers**, 302, 120420. DOI:10.1016/j.carbpol.2022.120420

Xavier, L.C.G.; Matos, B.N.; Barbalho, G.N.; Falcão, M.A.; Cunha-Filho, M.; Gelfuso, G.M.; Gratieri, T. In Vitro Performance Analysis of a Minoxidil Thermosensitive Gel with Reduced Runoff for Eyebrow Hair Growth. **Gels**. 2023, 9, 269. DOI:10.3390/gels9040269

8. REFERÊNCIAS

- ABDELBARY, G. A.; AMIN, M. M.; ZAKARIA, M. Y. Ocular ketoconazole-loaded proniosomal gels: Formulation, ex vivo corneal permeation and in vivo studies. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 309–319, 2017.
- AGARWAL, P. et al. Semifluorinated alkane based systems for enhanced corneal penetration of poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 538, n. 1–2, p. 119–129, 2018.
- AGARWAL, P.; RUPENTHAL, I. D. Non-aqueous formulations in topical ocular drug delivery – A paradigm shift? **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 198, p. 1–13, 2023.
- AGARWAL, R. et al. Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update. **Drug Delivery**, v. 23, n. 4, p. 1075–1091, 2016.
- AGRAHARI, V. et al. A comprehensive insight on ocular pharmacokinetics. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 6, n. 6, p. 735–754, 2016.
- AHAD, A. et al. Formulation and characterization of Phospholipon 90 G and tween 80 based transfersomes for transdermal delivery of eprosartan mesylate. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 23, n. 8, p. 787–793, 2018.
- AHEARNE, M. et al. Designing Scaffolds for Corneal Regeneration. **Advanced Functional Materials**, v. 30, n. 44, p. 1–24, 2020.
- ALI, M. et al. Zero-order therapeutic release from imprinted hydrogel contact lenses within in vitro physiological ocular tear flow. **Journal of Controlled Release**, v. 124, n. 3, p. 154–162, 2007.
- ALMEIDA, H., et al. Nanoparticles in Ocular Drug Delivery Systems for Topical Administration: Promises and Challenges. **Current pharmaceutical design**, v. 21, n. 36, p. 5212–5224, 2015.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S., orgs. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006.
- ASLAM, A. et al. Fabrication of Stimuli-Responsive Quince/Mucin Co-Poly (Methacrylate) Hydrogel Matrices for the Controlled Delivery of Acyclovir Sodium: Design, Characterization and Toxicity Evaluation. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 1–23, 2023.
- AWWAD, S. et al. Principles of pharmacology in the eye. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 23, p. 4205–4223, 2017.
- BACHU, R. D. et al. Ocular drug delivery barriers—role of nanocarriers in the treatment of anterior segment ocular diseases. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, p. 1–31, 2018.
- BALASOPOULOU, A. et al. Anatomy of cornea and ocular surface. **BMC Ophthalmology**, v. 17, n. 1, p. 1, 2017.

BARBERO, N. et al. Nanomaterial–protein interactions: the case of pristine and functionalized carbon nanotubes and porcine gastric mucin. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 18, n. 84, p. 1–8, 2016.

BARIK, D.; KUNDU, K.; DASH, M. Montmorillonite stabilized chitosan-co-mucin hydrogel for tissue engineering applications. **RSC Advances**, v. 11, n. 48, p. 30329–30342, 2021.

BARROSO, I. A. et al. Photocurable GelMA Adhesives for Corneal Perforations. **Bioengineering**, v. 9, n. 2, p. 1–22, 2022.

BEER F. et al. Mapping of Corneal Layer Thicknesses With Polarization-Sensitive Optical Coherence Tomography Using a Conical Scan Pattern. **Investigative Ophthalmology**, v. 59, n. 13, p. 5579-5588, 2018.

BENNET, D. et al. A microengineered human corneal epithelium-on-a-chip for eye drops mass transport evaluation. **Lab on a Chip**, v. 18, n. 11, p. 1539–1551, 2018.

BOATENG, J. S.; POPESCU, A. M. Composite bi-layered erodible films for potential ocular drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 353–361, 2016.

CHANNA, I. A. et al. UV Blocking and Oxygen Barrier Coatings Based on Polyvinyl Alcohol and Zinc Oxide Nanoparticles for Packaging Applications. **Coatings**, v. 12, n. 7, p. 1–15, 2022.

CHUDASMA, M. P. et al. Brief Insight on Nanovesicular Liposomes as Drug-delivery Carriers for Medical Applications. **Journal of Exploratory Research in Pharmacology**, v. 8,n. 3, p. 223–237, 2023.

REINSTEIN D. Z. et al. Stromal Thickness in the Normal Cornea: Three-dimensional Display With Artemis Very High-frequency Digital Ultrasound Dan. **J Refract Surg**, v. 25, n. 9, p. 776–786, 2009.

DELMONTE, D. W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 37, n. 3, p. 588–598, 2011.

DEY, K.; AGNELLI, S.; SARTONE, L. Designing Viscoelastic Gelatin-PEG Macroporous Hybrid Hydrogel with Anisotropic Morphology and Mechanical Properties for Tissue Engineering Application. **Micro**, v. 3, n. 2, p. 434–457, 2023.

DÍAZ, L. et al. Ethical Considerations in Animal Research: The Principle of 3R's. *Rev Invest Clin*, v. 73, n. 4, p. 199–209, 2020.

DOWNIE, L. E. et al. BCLA CLEAR - Anatomy and physiology of the anterior eye. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 44, n. 2, p. 132–156, 2021.

DU, C. et al. Vertical and horizontal corneal epithelial thickness profiles determined by ultrahigh resolution optical coherence tomography. **Cornea**, v. 31, n. 9, p. 1036–1043, 2012.

DU, X. et al. Semi-interpenetrating network anion exchange membranes based on

quaternized polyvinyl alcohol/poly(diallyldimethylammonium chloride). **Green Energy and Environment**, v. 6, n. 5, p. 743–750, 2021.

DUFFY, C. V.; LAURENT, D.; THOMAS, C. Covalently-crosslinked mucin biopolymer hydrogels for sustained drug delivery. **Acta Biomaterialia**, v. 20, p. 51–59, 2015.

EGHRARI, A. O.; RIAZUDDIN, S. A.; GOTTSCH, J. D. *Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development*. **Prog Mol Biol Transl Sci**. v. 134, p. 7-23, 2015.

ESTLACK, Z. et al. Microengineered biomimetic ocular models for ophthalmological drug development. **Lab on a Chip**, v. 17, n. 9, p. 1539–1551, 2017.

FANGARY, S. et al. Nanoparticle Fraught Liposomes: A Platform for Increased Antibiotic Selectivity in Multidrug Resistant Bacteria. **Molecular Pharmaceutics**, v. 19, n. 9, p. 3163–3177, 2022.

FANGUEIRO, J. et al. Ocular Drug Delivery - New Strategies for Targeting Anterior and Posterior Segments of the Eye. **Curr Pharm Des.**, v. 22, n. 9, p. 1135–46, 2016.

FAUZIYAH, B. et al. The effect of additional sucrose on the value of tensile strength and elongation of chicken legs gelatin film. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, v. 14, n. 1, p. 56–61, 2023.

FELICIANO, A. J. et al. Complementary Supramolecular Functionalization Enhances Antifouling Surfaces: A Ureidopyrimidinone-Functionalized Phosphorylcholine Polymer. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 9, p. 4619–4631, 2023.

GAUDANA, R. et al. Ocular drug delivery. **The AAPS journal**, v. 12, n. 3, p. 348–360, 2010.

GAVRIELY, S.; RICHTER, S.; ZUCKER, I. Mucin-Based Composites for Efficient Mercuric Biosorption. **Advanced Sustainable Systems**, v. 6, n. 7, p. 1–10, 2022.

GOTE, V. et al. Ocular drug delivery: Present innovations and future challenges. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 370, n. 3, p. 602–624, 2019.

GOVERNMENT, U. Annual Statistics of Scientific Procedures on Living Animals, Great Britain 2013. p. 1–59, 2014. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/327854/spanimals13.pdf>.

GOVERNMENT, U. Annual statistics of scientific procedures on living animals: Great Britain 2018, p.1-23, 2019. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/327854/spanimals13.pdf>.

GOVERNMENT, U. Annual Statistics of Scientific Procedures on Living Animals: Great Britain 2021, p. 1–33, 2020. Disponível em: <<https://assets.publishing.service.gov.uk/media/5f1033833a6f40037f85ce67/annual->

statistics-scientific-procedures-living-animals-2019.pdf>

GOVERNMENT, U. Annual Statistics of Scientific Procedures on Living Animals. p. 1–32, 2021. Disponível em:

<https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/1118195/annual-statistics-scientific-procedures-living-animals-2021_161122_v5.pdf>

GRANADOS, P. A. et al. Application of hot-melt extrusion in the complexation of naringenin with cyclodextrin using hydrophilic polymers. **Advanced Powder Technology**, v. 33, n. 1, p. 1–15, 2022.

GRATIERI, T. et al. Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan in situ forming gel. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 79, n. 2, p. 320–7, 2011.

GRATIERI, T. et al. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 186–193, 2010.

GYARMATI, B. et al. A robust mucin-containing poly (vinyl alcohol) hydrogel model for the in vitro characterization of mucoadhesion of solid dosage forms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 213, p. 1–10, 2022.

HODGES, R. R.; DARTT, D. A. Tear film mucins: Front line defenders of the ocular surface; comparison with airway and gastrointestinal tract mucins. **Experimental Eye Research**, v. 117, p. 62–78, 2013.

HOU, Z. et al. Facile preparation of medical segmented poly(ester-urethane) containing uniformly sized hard segments and phosphorylcholine groups for improved hemocompatibility. **Materials Science and Engineering C**, v. 109, p. 110571–110582, 2020.

HUANG, H. S., SCHOENWALD, R. D., LACH, J. L. Corneal penetration behavior of beta-blocking agents II: Assessment of barrier contributions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 1, p. 1272–1279, 1983.

IBRAHIM, M. A. et al. A Review of Chitosan and Chitosan Nanofiber: Preparation, Characterization, and Its Potential Applications. **Polymers**, v. 15, n. 13, p. 1–35, 2023.

JUNG, I.; LEE, S. Preparation and Evaluation of Graphene/Polyvinyl Alcohol-coated Thermoplastic Elastomer Filament. **Fibers and Polymers**, v. 24, n. 1, p. 285–297, 2023.

KAROYO, A. H.; WILSON, L. D. A Review on the Design and Hydration Properties of Natural Polymer-Based Hydrogels. **Materials**, v. 14, p. 1–35, 2021.

KAUR, I. P. et al. Vesicular systems in ocular drug delivery: An overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 1, p. 1–14, 2004.

KELS, B. D.; GRZYBOWSKI, A.; GRANT-KELS, J. M. Human ocular anatomy.

Clinics in Dermatology, v. 33, n. 2, p. 140–146, 2015.

KIANI, A. K. et al. Ethical considerations regarding animal experimentation. **Journal of preventive medicine and hygiene**, v. 63, n. 2, p. E255–E266, 2022.

KOMPELLA, U. B. et al. Luteinizing hormone-releasing hormone agonist and transferrin functionalizations enhance nanoparticle delivery in a novel bovine ex vivo eye model. **Molecular Vision**, v. 12, p. 1185-98, 2006.

KUMAR R, SINHA, V.R. Solid lipid nanoparticle: an efficient carrier for improved ocular permeation of voriconazole. **Drug Dev Ind Pharm.**, v. 42, n.12, p. 1956–67, 2016.

LEI, M. et al. Electrical Signal Initiates Kinetic Assembly of Collagen to Construct Optically Transparent and Geometry Customized Artificial Cornea Substitutes. **ACS Nano**, v. 16, n. 7, p. 10632–10646, 2022.

LI, M. et al. New nanomicelle curcumin formulation for ocular delivery: improved stability, solubility, and ocular anti-inflammatory treatment. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 11, p. 1846–1857, 2017.

LIANG, Y. et al. Fabrication and characters of a corneal endothelial cells scaffold based on chitosan. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 1, p. 175–183, 2011.

LÓPEZ-CANO, J. J. et al. Liposomes as vehicles for topical ophthalmic drug delivery and ocular surface protection. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 18, n. 7, p. 819–847, 2021.

LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1595–1639, 2005.

MALATANI, R. T. et al. Development of Tofacitinib Loaded pH-Responsive Chitosan/Mucin Based Hydrogel Microparticles: In-Vitro Characterization and Toxicological Screening. **Gels**, v. 9, n. 187, p. 1–28, 2023.

MANTELLI, F.; ARGÜESO, P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 8, n. 5, p. 477–483, 2008.

MAZET, R. et al. Recent advances in the design of topical ophthalmic delivery systems in the treatment of ocular surface inflammation and their biopharmaceutical evaluation. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 6, p. 1–56, 2020.

MIESFELD, J. B.; BROWN, N. L. Eye organogenesis: A hierarchical view of ocular development. **Curr Top Dev Biol**, v. 132, p. 351-393, 2019.

MIYAZAKI, S. et al. In situ gelling xyloglucan formulations for sustained release ocular delivery of pilocarpine hydrochloride. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 229, n. 1–2, p. 29–36, 2001.

MIREK, A. et al. Biomaterials Advances Gelatin methacrylate hydrogel with drug-loaded polymer microspheres as a new bioink for 3D bioprinting. **Biomaterials Advances**, v. 150, p. 1–15, 2023.

MISHIMA, S.; GASSET, A.; KLYCE, S. D. Determination of tear volume and tear flow. **Investiga**, v. 5, n. 3, p. 264–276, 1966.

MODGILL, V. et al. Permeability study of ciprofloxacin from ultra-thin nanofibrous film through various mucosal membranes. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 122–127, 2016.

MOHAMMADI, S. In Vitro Cornea Models in Contact Lens Based Ocular Drug Delivery. Tese (doutorado). Waterloo, Ontario, Canada. 2016.

MORRISON, P. W.; CONNON, C. J.; KHUTORYANSKIY, V. V. Cyclodextrin-mediated enhancement of riboflavin solubility and corneal permeability. **Molecular pharmaceuticals**, v. 10, n. 2, p. 756–762, 2013.

MORRISON, P. W. J.; KHUTORYANSKIY, V. V. Enhancement in corneal permeability of riboflavin using calcium sequestering compounds. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 472, n. 1–2, p. 56–64, 2014.

NATARAJAN, J. V. et al. Nanomedicine for glaucoma: Liposomes provide sustained release of latanoprost in the eye. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 123–131, 2012.

NEJAD, T. M.; FOSTER, C.; GONGAL, D. Finite element modelling of cornea mechanics: A review. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 77, n. 1, p. 60–65, 2014.

NICHOL, J. W. et al. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. **Biomaterials**, v. 31, n. 21, p. 5536–5544, 2010.

NOWAK, D.; JAKUBCZYK, E. The freeze-drying of foods-the characteristic of the process course and the effect of its parameters on the physical properties of food materials. **Foods**, v. 9, n. 10, p. 1–27, 2020.

OMERDIĆ, E. O. et al. Long-term stability of clopidogrel solid dispersions — Importance of in vitro dissolution test. **PLOS ONE**, v. 17, n. 4, p. 1–14, 2022.

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.

PAI, R. V.; MONPARA, J. D.; VAVIA, P. R. Exploring molecular dynamics simulation to predict binding with ocular mucin: An in silico approach for screening mucoadhesive materials for ocular retentive delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 309, p. 190–202, 2019.

PAL, K.; BANTHIA, A. K.; MAJUMDAR, D. K. Polyvinyl alcohol-gelatin patches of salicylic acid: Preparation, characterization and drug release studies. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 21, n. 1, p. 75–91, 2006.

PALERMO, E. Anatomy of the periorbital region. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 5, p. 245–256, 2013.

PATEL, H. et al. Ibrutinib amorphous solid dispersions with enhanced dissolution at colonic pH for the localized treatment of colorectal cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 641, p. 1–12, 2023.

PAULA, V. M. et al. Gamma radiation effect on the chemical, mechanical and thermal properties of PCL/MCM-48-PVA nanocomposite films. *Heliyon*, v. 9, p. 1–12, 2023.

PAULSAMY, M. et al. Nepafenac loaded silica nanoparticles dispersed in-situ gel systems: Development and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 336–345, 2018.

PEPIC, I. et al. Toward the practical implementation of eye-related bioavailability prediction models. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 1, p. 31–44, 2014.

PHAN, C. M. et al. Development of an eye model with a physiological blink mechanism. **Translational Vision Science and Technology**, v. 8, n. 5, p. 1–12, 2019.

PIRCHER, M. et al. Measurement and imaging of water concentration in human cornea with differential absorption optical coherence tomography. **Optics Express**, v. 11, n. 18, p. 2190–2197, 2003.

PISTOLLATO, F. et al. Current EU regulatory requirements for the assessment of chemicals and cosmetic products: challenges and opportunities for introducing new approach methodologies. **Archives of Toxicology**, v. 95, n. 6, p. 1867–1897, 1 jun. 2021.

RAHALI, K. et al. Synthesis and characterization of nanofunctionalized gelatin methacrylate hydrogels. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 1–15, 2017.

RAJA, J. G. et al. Enhanced dielectric properties of PVA/PEDOT:PSS/MnO₂ based composites for electronic applications. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 33, n. 29, p. 22883–22898, 2022.

RAJATI, H. et al. International Journal of Biological Macromolecules A nanofiber-hydrogel composite from green synthesized AgNPs embedded to PEBAX/PVA hydrogel and PA/Pistacia atlantica gum nanofiber for wound dressing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 226, p. 1426–1443, 2023.

RAJORA, A. D.; BAL, T. International Journal of Biological Macromolecules Evaluation of cashew gum-polyvinyl alcohol (CG-PVA) electrospun nanofiber mat for scarless wound healing in a murine model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 240, p. 124417, 2023.

RAMOS, T.; SCOTT, D.; AHMAD, S. An Update on Ocular Surface Epithelial Stem Cells: Cornea and Conjunctiva. **Stem Cells International**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

EUROPEAN C. Report from the commission to the council and the european

parliament: Seventh Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union. European Union, p. 1-14, 2013. Disponivel em:< <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52013DC0859>>

RICKERT, C. A. et al. A Mucin-Based Bio-Ink for 3D Printing of Objects with Anti-Biofouling Properties. **Macromolecular Bioscience**, v. 2300198, p. 1–13, 2023.

RUIZ-PULIDO, G.; MEDINA, D. I. An overview of gastrointestinal mucus rheology under different pH conditions and introduction to pH-dependent rheological interactions with PLGA and chitosan nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 159, p. 123–136, 2021.

RUIZ, C. et al. Magnetic methacrylated gelatin-: G -polyelectrolyte for methylene blue sorption. **RSC Advances**, v. 10, n. 71, p. 43799–43810, 2020.

RUPONEN, M., & URTTI, A. Undefined role of mucus as a barrier in ocular drug delivery. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 96, p. 442–446, 2015.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. et al. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye – Part I – Barriers and determining factors in ocular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 110, p. 70–75, 2017.

SCHMOLL, T. et al. Precise thickness measurements of Bowman's layer, epithelium, and tear film. science : official publication of the American. **Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry**, v. 89, n. 5, p. E795–E802, 2012.

SHAKER, D. S. et al. Nanoemulsion: A review on mechanisms for the transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs. **Scientia Pharmaceutica**, v. 87, n. 3, p. 1–34, 2019.

SHEIKHOLESLAMI, B. et al. Exploring the impact of physicochemical properties of liposomal formulations on their in vivo fate. **Life Sciences**, v. 300, p. 1–19, 2022.

SILVA, I. A. et al. Compatibility and stability studies involving polymers used in fused deposition modeling 3D printing of medicines. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 12, n. 3, p. 424–435, 2022.

SINGH, M. et al. Therapeutic nanoemulsions in ophthalmic drug administration: Concept in formulations and characterization techniques for ocular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 328, p. 895–916, 2020.

SORIANO-ROMANÍ, L. et al. Novel anti-inflammatory liposomal formulation for the pre-ocular tear film: In vitro and ex vivo functionality studies in corneal epithelial cells. **Experimental Eye Research**, v. 154, p. 79–87, 2017.

SUKHBIR S. et al. Lacrimal and Instilled Fluid Dynamics in Rabbit Eyes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 7, p. 1112–1121, 1973.

SUN, X. et al. Acanthamoeba keratitis: Clinical characteristics and management. **Ophthalmology**, v. 113, n. 3, p. 412–416, 2006.

TANG, X.; PIKAL, M. J. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 191–200, 2004.

THIEL, M. A. et al. Penetration of engineered antibody fragments into the eye. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 128, n. 1, p. 67–74, 2002.

THOMAS F. PATTON, J. R. R. Quantitative precorneal disposition of topically applied pilocarpine nitrate in rabbit eyes. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 65, n. 9, p. 1295–1301, 1976.

VASCONCELOS, T. et al. Third-generation solid dispersion combining Soluplus and poloxamer 407 enhances the oral bioavailability of resveratrol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 595, p. 1–14, 2021.

YADAV, P.; LAHARIYA, V. Investigation of thermal and dielectric behaviour of PVA – ZnO nanocomposite films. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 34, n. 9, p. 787, 2023.

YAMAGUCHI, M. et al. Mucoadhesive properties of chitosan-coated ophthalmic lipid emulsion containing indomethacin in tear fluid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 7, p. 1266–1271, 2009.

YAN, Y. et al. Preparation and In Vitro Characterization of Gelatin Methacrylate for Corneal Tissue Engineering. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 59–72, 2022.

YOUNIS, H. et al. Fabrication, Characterization and Biomedical Evaluation of a Statistically Optimized Gelatin Scaffold Enriched with Co-Drugs Loaded into Controlled-Release Silica Nanoparticles. **Molecules**, v. 28, n. 13, p. 1–21, 2023.

YOUSSEF, A. A. et al. Design of topical ocular ciprofloxacin nanoemulsion for the management of bacterial keratitis. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 3, p. 1–19, 2021.