



**Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Departamento de Farmácia**

**JONAD LOGAN ADRIANO CONTARATO**

**AVALIAÇÃO DE PERFORMANCE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS  
UTILIZANDO MEMBRANAS ARTIFICIAIS COMO ALTERNATIVA AO USO DE  
ANIMAIS**

Brasília – DF

2024



**Universidade de Brasília**  
**Faculdade de Ciências da Saúde**  
**Departamento de Farmácia**

**AVALIAÇÃO DE PERFORMANCE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS  
UTILIZANDO MEMBRANAS ARTIFICIAIS COMO ALTERNATIVA AO USO DE  
ANIMAIS**

**JONAD LOGAN ADRIANO CONTARATO**

Orientadora: Profa. Dra. Taís Gratieri

Coorientadora: Dra. Geisa Barbalho

Monografia apresentada ao curso de graduação em Farmácia da  
Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título  
de Bacharel em Farmácia.

Brasília – DF

2024

**JONAD LOGAN ADRIANO CONTARATO**

**AVALIAÇÃO DE PERFORMANCE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS  
UTILIZANDO MEMBRANAS ARTIFICIAIS COMO ALTERNATIVA AO USO DE  
ANIMAIS**

Orientadora: Profa. Dra. Taís Gratieri

Coorientadora: Dra. Geisa Barbalho

Monografia apresentada ao curso de graduação em Farmácia da  
Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título  
de Bacharel em Farmácia.

Brasília, 03 de julho de 2024

Comissão Avaliadora:

---

Profa. Dra. Tais Gratieri

Universidade de Brasília

---

Dr. Breno Noronha Matos

Universidade de Brasília

Brasília – DF

2024

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, Profa. Ma. Ione Gomes Adriano, agradeço por ter tido a coragem de me educar sozinha, por ter sido a minha primeira professora, por me incentivar constantemente a aprender e por todo o apoio e compreensão que sempre me ofereceu.

Em especial, agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Tais Gratieri, por acreditar na minha capacidade de fazer parte deste projeto, por idealizar este trabalho, pelos conselhos e por tudo.

A todos os membros do Laboratório de Tecnologia, Medicamentos, Alimentos e Cosméticos - LTMAC, que me apoiaram ao longo desta pesquisa, expressei a minha gratidão. Em particular, gostaria de agradecer à minha amiga e coorientadora Geisa Barbalho pela sua paciência, companheirismo e constante apoio.

Gostaria de expressar a minha gratidão às minhas amigas Eminny Amorim e Roberta Ketllen por estarem presentes ao meu lado desde o início da graduação e nunca me deixarem desistir.

À Universidade de Brasília (UnB), agradeço pela oportunidade de dar continuidade aos meus estudos e de me desenvolver como pesquisador.

Agradeço à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo suporte financeiro concedido a este projeto, bem como pela bolsa de iniciação científica.

## RESUMO

O OphthalMimic é um dispositivo impresso em 3D que simula condições oculares humanas com fluxo lacrimal artificial, uma área de cul-de-sac, uma pálpebra móvel e uma superfície para interagir com formulações oftálmicas. Todos os testes realizados até então utilizaram membranas poliméricas empregando uma taxa contínua de fluxo de lágrima artificial de 1 mL/min por 5 minutos. Neste estudo, foram implementadas variações de protocolo em relação ao tempo de aplicação e fluxo de lágrimas simulado para aumentar a discriminação do teste e, conseqüentemente, obter resultados de desempenho confiáveis. Os novos protocolos incorporaram as formulações de fluconazol a 0,2% previamente avaliadas (PLX16 e PLX16CS10) e novas formulações de moxifloxacino a 5%, uma formulação convencional e uma microemulsão (CONTROLE e NEMOX), respectivamente. A primeira tentativa foi estender a duração do teste diminuindo a taxa de fluxo em 50%. Além disso, um período de aplicação prévia ao fluxo para permitir a interação da formulação com a membrana também foi incluído. Esta abordagem avaliou a resistência da formulação por até 9 minutos de fluxo contínuo, após uma pré-aplicação estática de 1 minuto em uma base de membrana polimérica selecionada. Esta avaliação foi repetida utilizando o modelo OphthalMimic com uma membrana híbrida à base de hidrogel para comparação, a qual incluiu condições de fluxo adicionais. Os resultados indicaram que a utilização do protocolo 1+9 com a membrana polimérica tornou viável prolongar a duração do teste, aumentando assim o potencial de discriminação do dispositivo e permitindo uma melhor compreensão do desempenho da formulação. Além disso, com a membrana de hidrogel, a incorporação de uma pré-aplicação estática de 1 minuto pareceu ser mais adequada para testar nanossistemas, fornecendo tempo adicional para a formulação interagir com a membrana antes de iniciar o fluxo. Em conclusão, as condições do protocolo e a base da membrana devem ser pré-avaliadas considerando as principais características das formulações, como mucoadesividade, viscosidade e presença de estruturas coloidais. O dispositivo OphthalMimic demonstrou mais uma vez ser um método versátil para avaliar o desempenho de formulações de medicamentos oftálmicos, com potencial para reduzir o uso de animais em experimentação.

**Palavras-chave:** Dispositivo impresso em 3D; drug delivery; OphthalMimic; Membrana polimérica; Hidrogel; Tempo de retenção.

## ABSTRACT

The OphthalMimic is a 3D-printed device that simulates human ocular conditions with artificial lacrimal flow, a cul-de-sac area, a moving eyelid, and a surface to interact with ophthalmic formulations. All tests using the polymeric membranes used a continuous artificial tear flow rate of 1 mL/min for 5 minutes. In here, we implemented protocol variations regarding the application time and simulated tear flow to increase the test's discrimination and hence, reliable performance results. The new protocols incorporated the previously evaluated 0.2% fluconazole formulations (PLX16 and PLX16CS10) and novel moxifloxacin 5% formulations, respectively, a conventional formulation and a microemulsion (CONTROL and NEMOX). The first attempt was to extend the test duration by decreasing the flow rate by 50%. In addition, a pre-flow application period to allow formulation interaction with the membrane was also included. This approach evaluated formulation resistance for up to 9 minutes of continuous flow, following a 1-minute static pre-application on a selected polymeric membrane base. This evaluation was repeated using the OphthalMimic model with a hydrogel-based hybrid membrane for comparison, which included additional flow conditions. The results indicated that employing protocol 1+9 with the polymeric membrane made it feasible to prolong the testing duration, thereby enhancing device discrimination potential and allowing a better understanding of formulation performance. Moreover, with the hydrogel membrane, the incorporation of a 1-minute static pre-application appeared to be more adequate for testing nanosystems, providing additional time for the formulation to interact with the membrane before initiating the flow. In conclusion, protocol conditions and base membrane must be pre-evaluated considering formulations main characteristics, e.g. mucoadhesiveness, viscosity and colloidal structures presence. The OphthalMimic device demonstrated once again to be a versatile method for evaluating ophthalmic drug formulations performance with the potential of reducing animals of experimentation.

**Keywords:** 3D-printed device; Drug Delivery; Ocular delivery; Polymeric membrane; Retention time

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Esquema representativo da órbita ocular e sistema nasolacrimal. ....  | 12 |
| <b>Figura 2.</b> Componentes presentes na superfície da córnea humana. Imagem retirada e adaptada de Mantelli F et al, 2013. ....  | 15 |
| <b>Figura 3.</b> Camadas da córnea humana. Imagem retirada e adaptada de Guérin LP et al, 2021 e Morrison, P. W., & Khutoryanskiy, V. V., 2014. ....   | 15 |
| <b>Figura 4.</b> Representação esquemática das camadas que compõem o filme lacrimal. ....  | 17 |
| <b>Figura 5.</b> Relatório anual do uso de animais por espécie, 2008 até 2017. Pesquisa realizada em Robinson NB et al, 2019. ....   | 20 |
| <b>Figura 6.</b> Estrutura química do monômero do álcool polivinil (PVA). Imagem retirada de sigmaaldrich.com. ....  | 22 |
| <b>Figura 7.</b> Esquema sobre as diversas composições e aplicações do PVA para obtenção de biomateriais de aplicação terapêutica. Imagem retirada e adaptada de Kumar A et al, 2016. ....   | 22 |
| <b>Figura 8.</b> Fórmula estrutural da gelatina. Imagem retirada de Mikhailov OV et al., 2023. ....  | 23 |
| <b>Figura 9.</b> Três cadeias polipeptídicas $\alpha$ formam uma tríplice hélice de gelatina. A gelatina é estabilizada pela formação de ligações cruzadas covalentes, tanto dentro da tríplice hélice de gelatina quanto entre as hélices de gelatina. Imagem retirada e adaptada de Mikhailov OV. et al., 2023. ....   | 23 |
| <b>Figura 10.</b> Fórmula estrutural do Poloxamer 407. Imagem retirada de sigmaaldrich.com. ....   | 23 |
| <b>Figura 11.</b> Representação esquemática ilustrando o processo de lavagem realizado pelo Dispositivo OphthalMimic. O processo envolve a aplicação de uma formulação acima da membrana, um período de descanso de um minuto e o início do processo de lavagem utilizando fluxo de lágrima artificial por 4 ou 9 minutos, com ou sem a utilização de pálpebra artificial. ....  | 26 |
| <b>Figura 12.</b> Porcentagem de FLU drenada no dispositivo OphthalMimic para as formulações PLX16% e PLX16C1.0% utilizando a membrana polimérica. A) 1 minuto de contato com a membrana sem fluxo, seguido por 4 minutos de fluxo lacrimal contínuo a uma taxa de 1 mL/min. B) 1 minuto de contato com a membrana sem fluxo, seguido por 4 minutos de fluxo lacrimal a uma taxa de 0,5 mL/min. C) 1 minuto de contato com a membrana sem fluxo, seguido por 9 minutos de fluxo lacrimal a uma taxa de 0,5 mL/min. A análise estatística utilizando t-test confirmou diferenças significativas entre as formulações. * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ . .... | 28 |
| <b>Figura 13.</b> Porcentagem de FLU drenada no dispositivo OphthalMimic utilizando membrana de hidrogel com pálpebra artificial. A análise estatística utilizando t-test confirmou diferenças significativas entre as formulações. * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ . ....  | 28 |
| <b>Figura 14.</b> Porcentagem de drenagem de MOX no dispositivo OphthalMimic. A) Drenagem de MOX utilizando a membrana polimérica M3 sem pálpebra artificial. B) Drenagem de MOX utilizando membrana de hidrogel com pálpebra artificial. A análise estatística utilizando t-test confirmou diferenças significativas entre as formulações. * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ . ....  | 29 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Composições, estruturas e funções das camadas da córnea humana .....                                  | 13 |
| <b>Tabela 2.</b> Protocolo com variações de fluxo, membrana e formulações testadas no dispositivo<br>OphthalMimic..... | 26 |



# Sumário

|  |    |
|--|----|
| AGRADECIMENTOS .....   | 4  |
| RESUMO .....   | 5  |
| ABSTRACT .....   | 6  |
| LISTA DE FIGURAS .....   | 7  |
| LISTA DE TABELAS .....   | 8  |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....  | 10 |
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 11 |
| 2 REVISÃO LITERÁRIA .....  | 12 |
| 2.1 Olho .....   | 12 |
| 2.1.1 Córnea.....  | 13 |
| 2.1.2 Filme lacrimal .....   | 16 |
| 2.1.3 Desafios no desenvolvimento de formulações oftálmicas .....          | 17 |
| 2.2 Modelos animais em pesquisas oculares .....                            | 18 |
| 2.2.1 Modelos <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i> em pesquisas oculares ..... | 20 |
| 2.3 Membranas poliméricas .....  | 21 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 24 |
| 3.1 Material .....   | 24 |
| 3.2 Produção das membranas poliméricas e híbrida baseada em hidrogel.....  | 24 |
| 3.3 Quantificação e preparação das formulações .....                       | 24 |
| 3.4 Variando as condições de testagem no dispositivo OphthalMimic .....    | 25 |
| 3.5 Análise estatística.....   | 27 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 27 |
| 5 CONCLUSÃO.....   | 30 |
| 6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....   | 30 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**FLU** – Fluconazol

**PLX** – Poloxamer 407®

**MOX** – Moxifloxacino

**QS** – Quitosana

**MUC** – Mucina

**PVA** – Álcool polivinílico

**(m/m)** – Massa/ Massa

**(v/v)** – Volume/Volume

**(p/v)** – Peso/ Volume

**PLX16C10** – Poloxamer 16% + Quitosana 1,0% contendo fluconazol 0,2%

**PLX 16** – Poloxamer 16 % contendo fluconazol 0,2%

**LTMAC** – Laboratório de Tecnologia, Medicamentos, Alimentos e Cosméticos

**OphthalmMimic** – Modelo in vitro para avaliação do desempenho de formulações oftálmicas

**NEMOX** – Microemulsão de moxifloxacino 5%

**Controle** – Formulação aquosa com 50% de propilenoglicol e 5 % de moxifloxacino

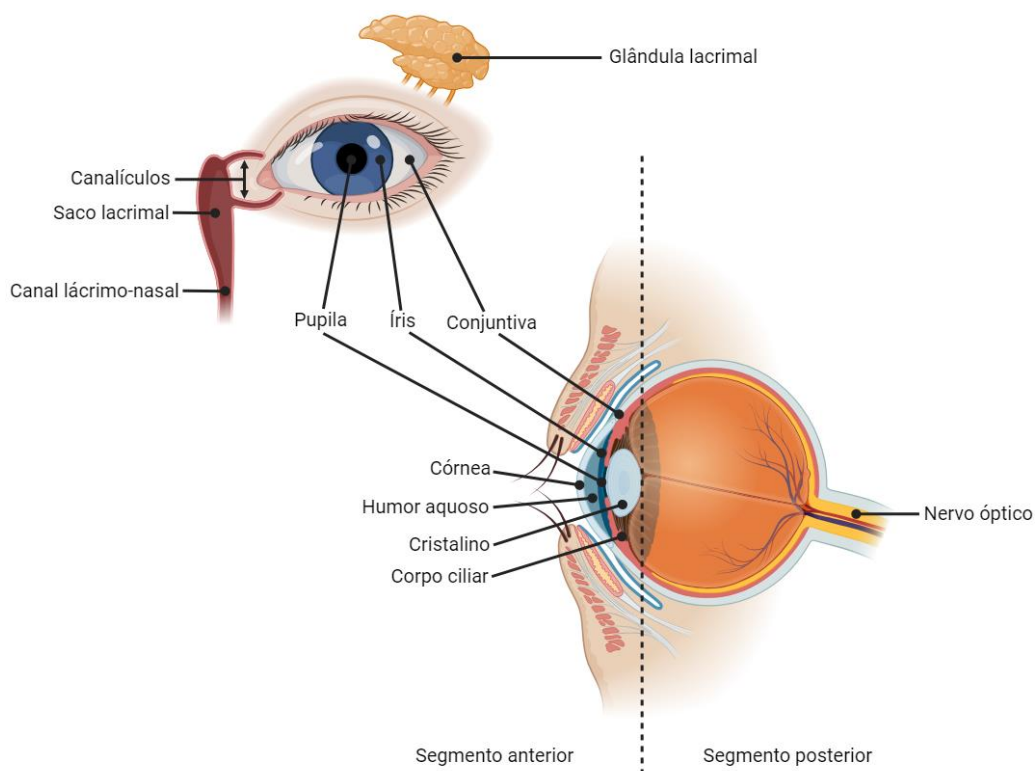
## 1 INTRODUÇÃO

Prolongar o tempo de residência de formulações oftálmicas tópicas é crucial para aumentar a biodisponibilidade do fármaco e a eficácia terapêutica. Algumas formulações de colírios já incluem excipientes específicos para melhorar o tempo de residência, tais como agentes de liberação sustentada, aumentadores de viscosidade e substâncias mucoadesivas (Morrison PWJ e Vitaliy VK, 2014). No entanto, frequentemente são ineficazes, uma vez que aproximadamente 95% da dose administrada é rapidamente drenada através dos ductos lacrimais devido ao piscar dos olhos. Como resultado, apenas uma pequena fração da dose entra em contato com a superfície ocular, resultando em baixa biodisponibilidade (Kevin Y. Wu et al, 2023). Os métodos atuais utilizados para avaliar a eficácia dessas novas formulações, principalmente por meio de testes *in vivo* e *ex vivo*, enfrentam desafios devido à sua natureza dispendiosa e preocupações éticas relacionadas à experimentação animal (Meigs L., 2018). Metodologias *in vitro*, como o dispositivo OphthalMimic, que emprega modelos corneais simulados, devem demonstrar robustez para sustentar períodos prolongados de testes e ter a capacidade de avaliar diferentes formulações (Barbalho GN et al., 2024a). O objetivo final de tais técnicas seria produzir resultados comparáveis aos obtidos pelos atuais métodos *in vivo*, imitando de perto cenários de administração oftálmica tópica. O Álcool Polivinílico (PVA) é comumente empregado na obtenção de membranas poliméricas por sua capacidade de fornecer resistência mecânica (Patil M. et al, 2022). No entanto, a natureza hidrofílica dos compostos na membrana pode comprometer a resistência necessária para períodos de teste mais longos expostos ao fluxo lacrimal simulado. Para replicar da forma mais fiel possível a aplicação fisiológica de formulações oftálmicas tópicas *in vitro*, o nosso grupo recentemente avaliou dois tipos de membranas completamente artificiais para simular a superfície da córnea no dispositivo OphthalMimic: membrana polimérica (Barbalho et al., 2024a) e membrana híbrida à base de hidrogel (Barbalho et al., 2024b). No entanto, até o momento, durante os testes com as membranas, apenas uma condição com uma taxa de fluxo contínuo foi testada. Portanto, parece plausível ajustar os protocolos do dispositivo às capacidades da membrana para melhorar a eficiência dos testes e o potencial discriminatório. Desta forma, neste trabalho, descrevemos a avaliação de diferentes abordagens de protocolo alternativas para ambas as membranas poliméricas e à base de hidrogel: a aplicação de uma condição pré-estática como alternativa ao fluxo contínuo e a influência de uma taxa de fluxo reduzida, que foram analisadas com base no desempenho de diferentes tipos de formulações, convencionais, mucoadesivas e nanoestruturadas.

## 2 REVISÃO LITERÁRIA

### 2.1 Olho

O olho humano é um órgão sensorial vital para a visão, equipado com mecanismos de proteção que buscam garantir sua integridade. Os mecanismos dinâmicos incluem o movimento palpebral involuntário, fluxo e drenagem lacrimal. Ademais, a córnea e a conjuntiva compõem os principais mecanismos estáticos para aplicação oftálmica tópica. Esse conjunto de mecanismos estáticos e dinâmicos afeta diretamente a biodisponibilidade de fármacos administrados topicamente no segmento anterior do olho, uma vez que dificultam a permeabilidade e aceleram a eliminação de compostos e microorganismos. Anatomicamente o globo ocular é dividido em segmento anterior e posterior. O segmento anterior é formado pelo corpo ciliar, a íris, a pupila, o humor aquoso, a conjuntiva, a córnea e o cristalino. O segmento posterior é formado por esclera, coróide, retina, nervo óptico, mácula lútea e humor vítreo.



**Figura 1.** Esquema representativo da órbita ocular e sistema nasolacrimal.

A homeostase do fluido pré-corneano é essencial para a saúde ocular, sendo mantida por um mecanismo de drenagem nasolacrimal dentro de uma faixa fisiológica de 7 a 10 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) (Agrahari et al., 2016; Bachu et al., 2018). O olho humano apresenta uma capacidade volumétrica finita estimada em aproximadamente 30 microlitros ( $\mu\text{L}$ ), para acomodar o fluido intraocular, prevenindo, assim, o extravasamento (Estlack et al., 2017;

Mishima et al., 1966). A manutenção da homeostase ocular e a otimização da função visual dependem da renovação contínua desse fluido, garantindo um microambiente adequado para os tecidos oculares. Assim, a capacidade volumétrica reduzida do olho, juntamente com a constante renovação do filme lacrimal e o reflexo de piscar, são elementos que influenciam significativamente o tempo de residência de formulações oftálmicas, levando frequentemente a uma reduzida biodisponibilidade.

### 2.1.1 Córnea

A córnea humana é uma estrutura transparente presente na porção anterior do olho que desempenha um papel crucial na visão. Apesar de ser a principal via de absorção de fármacos oftálmicos de aplicação tópica, as estruturas celulares altamente coesas desempenham um papel significativo limitando a absorção de fármacos por essa via.

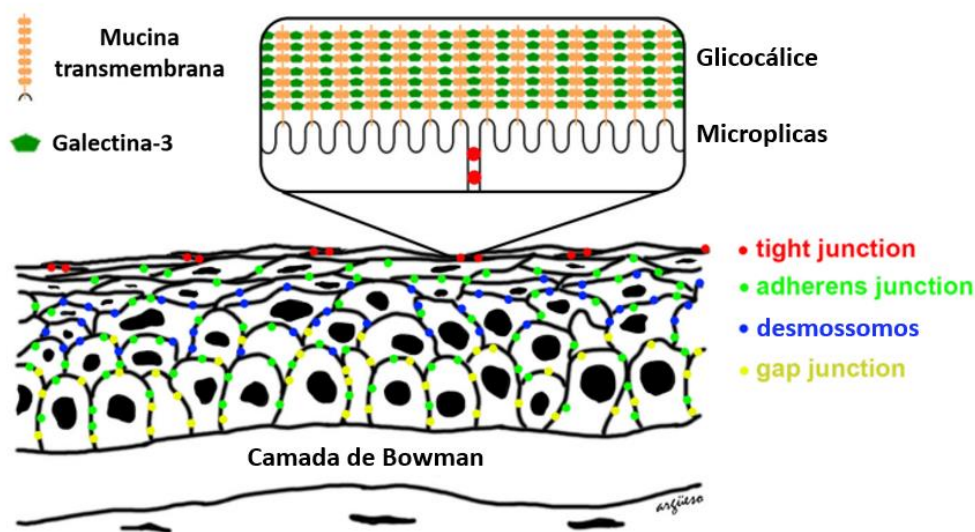
Composta por cinco camadas de células distintas: (I) epitélio, (II) camada de Bowman, (III) estroma, (IV) camada de Descemet e (V) endotélio, cada uma com suas características e funções específicas.

**Tabela 1.** Composições, estruturas e funções das camadas da córnea humana

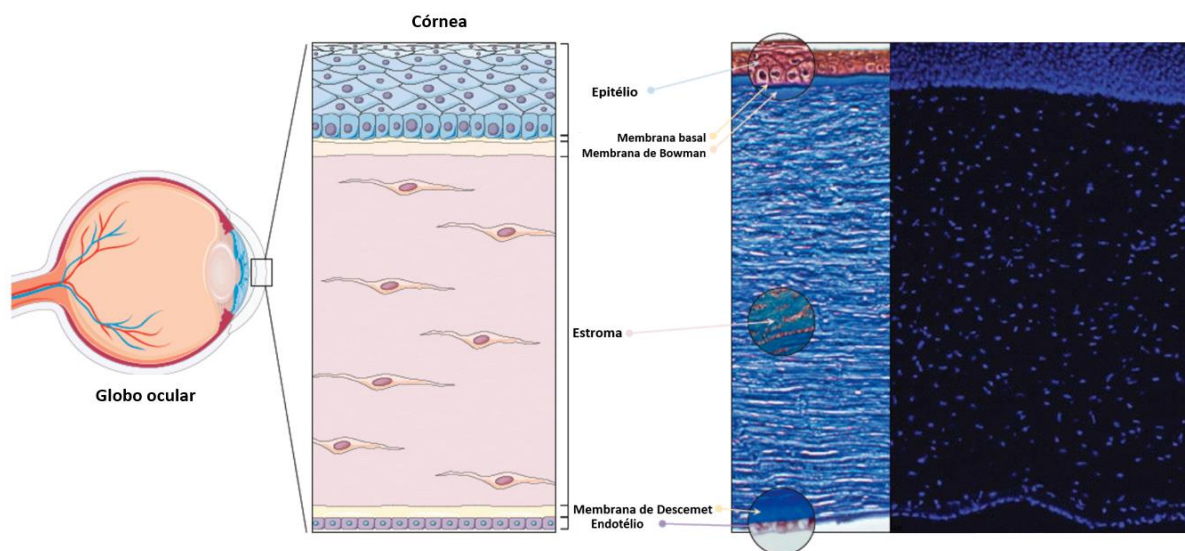
|                          | <b>Composição</b>  | <b>Características</b>  | <b>Função</b>   | <b>Importância Clínica</b>  |
|--------------------------|--|---|---|---|
| <b>Epitélio Corneano</b> | Múltiplas camadas de células (pavimentoso estratificado não queratinizado)         | Altamente regenerativo, com microvilosidades que auxiliam na adesão do filme lacrimal | Proteção da córnea, manutenção da integridade da superfície ocular e facilitação da passagem da luz | Lesões epiteliais tendem a cicatrizar rapidamente devido à alta capacidade regenerativa |
| <b>Camada de Bowman</b>  | Acelular, com fibras de colágeno tipo I, III, V, VI e VII dispostas aleatoriamente | Resistente e fornece suporte estrutural, mas incapaz de se regenerar                  | Proteção do estroma e manutenção da integridade da córnea   | Danos à camada de Bowman causam cicatrizes permanentes que podem afetar a visão         |

|                             |   |   |  |  |
|-----------------------------|---|---|--|--|
| <b>Estroma</b>              | Tecido conjuntivo denso, com fibras de colágeno tipo I organizadas em lamelas paralelas de mesma espessura e diâmetro | Transparente devido à organização das fibras de colágeno e à ausência de vasos sanguíneos | Manutenção da forma e transparência da córnea  | Edemas e opacidades do estroma podem ocorrer devido a falhas na bomba endotelial ou alterações na estrutura das fibras de colágeno |
| <b>Membrana de Descemet</b> | Membrana basal do endotélio, rica em colágeno tipo IV   | Resistente e elástica, atuando como uma barreira contra infecções e perfurações           | Proteção do estroma e manutenção da integridade da córnea  | Lesões profundas podem causar descemetoceloses, que são herniações da membrana de Descemet   |
| <b>Endotélio</b>            | Monocamada de células hexagonais  | Rica em mitocôndrias, com baixa capacidade de regeneração                                 | Mantém a deturgescência da córnea através do transporte ativo de íons, bombeando o excesso de fluido do estroma para a câmara anterior | Perda ou disfunção das células endoteliais pode causar edema corneano e perda da transparência                                     |

O epitélio, a camada mais externa, apresenta células que variam em tamanho de acordo com a profundidade. A porção superficial possui células achatadas com microvilosidades, que auxiliam na adesão do filme lacrimal, enquanto as porções intermediária e basal exibem células poliédricas e cilíndricas, respectivamente. A abundância de complexos juncionais como *tight junctions*, *adhering junctions*, *gap junctions* e desmossomos em diferentes níveis do epitélio estratificado fortalece a coesão intercelular, dificultando a transposição de compostos e microorganismos (Figura 2).



**Figura 2.** Componentes presentes na superfície da córnea humana. Imagem retirada e adaptada de Mantelli F et al, 2013.



**Figura 3.** Camadas da córnea humana. Imagem retirada e adaptada de Guérin LP et al, 2021 e Morrison, P. W., & Khutoryanskiy, V. V., 2014.

A camada de Bowman, localizada logo abaixo do epitélio, é um condensado acelular constituído de colágeno tipo I e V, além de proteoglicanos. Sua estrutura resistente contribui para manter o formato convexo do olho e oferece proteção adicional. O estroma, a porção mais espessa da córnea, mantém a integridade óptica do olho. A alta organização das fibras de colágeno e de sua matriz extracelular garantem a transparência e a capacidade refrativa necessárias para a funcionalidade do órgão. A camada de Descemet, uma fina membrana basal composta por colágeno tipo IV e laminina, oferece suporte estrutural à córnea e auxilia na regulação do transporte de água.

Por fim, o endotélio, a camada mais profunda, é formado por uma única camada de células hexagonais densamente compactadas. Essas células, ricas em mitocôndrias e metabolicamente ativas, desempenham um papel vital na manutenção da deturgescência da

córnea, garantindo seu estado de hidratação ideal. Assim, além dos mecanismos oculares de proteção dinâmica, a própria complexidade estrutural da córnea se apresenta como um mecanismo de proteção estático que dificulta a permeação de fármacos oftálmicos tópicos.

### **2.1.2 Filme lacrimal**

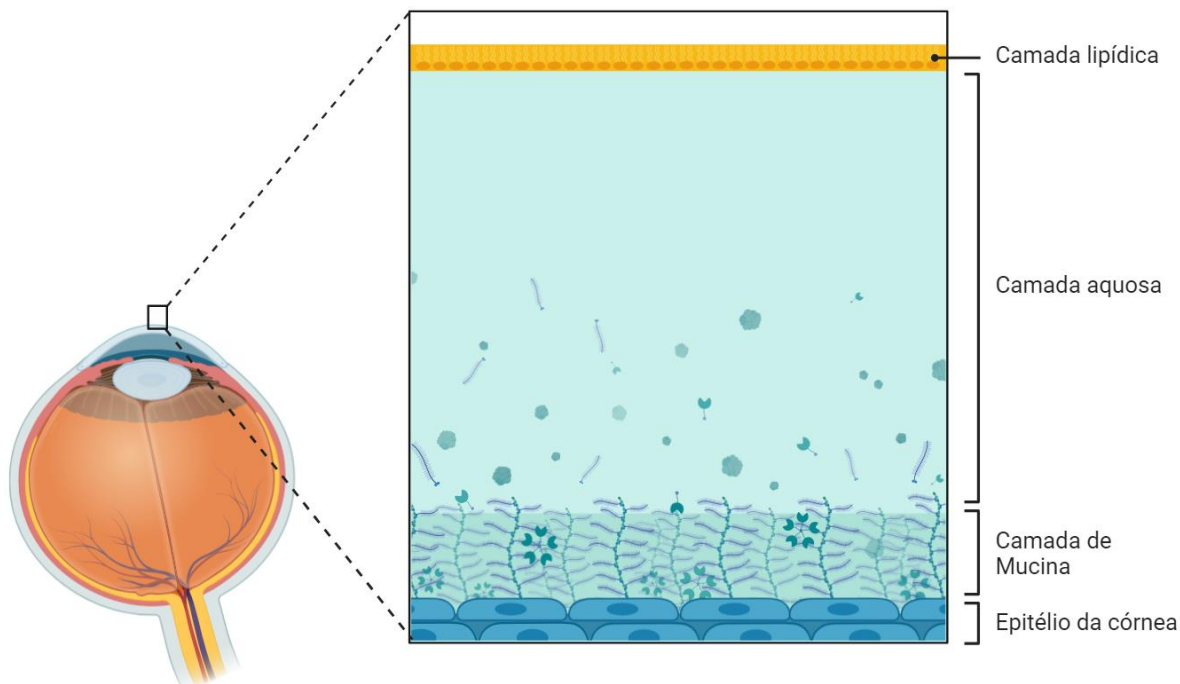
O olho humano é um órgão sensorial equipado com mecanismos de proteção dinâmico que buscam garantir sua integridade. Entre esses mecanismos destacam-se: o fluxo e drenagem lacrimal, o epitélio com baixa permeabilidade e a movimentação palpebral involuntária.

Na administração oftálmica de fármacos, o filme lacrimal representa a barreira fisiológica inicial que deve ser transposta para a efetiva biodisponibilidade do agente terapêutico. O filme lacrimal é uma estrutura trilaminar fluida extremamente fina de 2-6  $\mu\text{m}$  de espessura, pH com média de 7,45 e um volume de 3-10  $\mu\text{L}$  que recobre toda superfície ocular. A camada lipídica superficial apresenta uma espessura de aproximadamente 50-100 nm e é principalmente composta por ésteres de colesterol, ésteres de cera e triglicerídeos. Esta camada exibe uma organização estrutural duplex, onde lipídios apolares, como os mencionados anteriormente, estão localizados na interface ar-lágrima, enquanto lipídios polares anfifílicos, como fosfolipídios e ácidos graxos ômega-hidroxi, encontram-se adjacentes à camada aquosa mucinosa. Essa porção secretada pelas glândulas de Meibômio, exerce uma função fundamental para a resistência da evaporação da película lacrimal (DelMonte DW et al, 2011; Sheppard JD. et al., 2023).

A camada aquosa intermediária contém imunoglobulinas, uréia, sais, glicose e proteínas que são produzidas pelas glândulas lacrimais, sendo responsável pelo aporte de oxigênio e nutrientes à córnea. As células caliciformes conjuntivais secretam uma camada de mucina que facilita a adesão e a distribuição homogênea do filme lacrimal sobre a superfície corneal. Dessa forma, uma das estratégias discutidas no desenvolvimento de formulações oftálmicas é a inclusão de compostos mucoadesivos com o objetivo de prolongar o tempo de permanência da



formulação por meio da interação desses compostos com as mucinas oculares.



**Figura 4.** Representação esquemática das camadas que compõem o filme lacrimal.

### 2.1.3 Desafios no desenvolvimento de formulações oftálmicas

O tratamento oftálmico tópico enfrenta desafios devido à presença de barreiras fisiológicas estáticas e dinâmicas no olho humano, que protegem o órgão de corpos estranhos e substâncias exógenas. As barreiras estáticas (e.g., epitélio, estroma, endotélio corneano, barreira sangue-aquosa) e dinâmicas (e.g., diluição lacrimal, barreira conjuntival, barreira sangue-retiniana) retardam a absorção passiva e reduzem o tempo de contato por aumentar a drenagem de medicamentos oftálmicos, conseqüentemente diminuindo sua biodisponibilidade. (Chrai et al., 1973, 1974; Gote V et al., 2019)

Logo após a administração da formulação oftálmica, observa-se uma resposta fisiológica caracterizada pelo aumento do fluxo lacrimal, resultando em uma significativa drenagem que praticamente elimina a formulação em um curto intervalo de tempo, aproximadamente 30 minutos (Barbalho G et al., 2023). Além disso, as diferentes polaridades das camadas do filme lacrimal, acabam retendo fármacos e veículos que não possuam características intermediárias podendo impossibilitar até mesmo que atinjam a camada mais superficial da córnea.

Essas especificidades anatômicas e fisiológicas do olho humano, acabam reduzindo o tempo de contato, a biodisponibilidade, aumentando a drenagem da formulação e impondo características específicas para o qual fármacos oftálmicos tópicos devem apresentar para garantir a eficácia. Além disso, como o olho comporta uma quantidade limitada de líquido (cerca de 30µL sem extravasamento) geralmente é necessário aplicações frequentes e com altas concentrações de princípio ativo (Sridhar MS et al, 2018; Awwad et al, 2017; Paulsamy et al, 2018).

Portanto, a complexidade das camadas da córnea devem ser cuidadosamente consideradas durante o desenvolvimento de formulações oftálmicas tópicas, pois afeta diretamente a eficácia do tratamento. Para superar esses desafios, diversas estratégias, tecnologias e formulações inovadoras têm sido desenvolvidas (por exemplo, nanomicelas, nanopartículas, suspensões, emulsões, dendrímeros, soluções viscosas, soluções mucoadesivas e dispositivos oculares) (Morrison, P. W., & Khutoryanskiy, V. V. 2014; Silva B et al., 2021). Para avaliar o desempenho e a segurança dessas formulações inovadoras, é imprescindível a elaboração de novos métodos.

## **2.2 Modelos animais em pesquisas oculares**

Ao longo da evolução da pesquisa na área da saúde, os animais têm desempenhado um papel fundamental como modelos para o estudo de doenças e o desenvolvimento de novas terapias, incluindo aqueles destinadas a doenças oculares humanas. Uma ampla gama de espécies animais, como coelhos, porcos, camundongos, ratos e macacos, tem sido utilizada nesses estudos devido à presença de certas semelhanças fisiológicas, anatômicas e patológicas com os olhos humanos (Doke & Dhawale, 2015). Por exemplo, os coelhos são frequentemente empregados em estudos de irritação ocular devido à sua sensibilidade semelhante à dos humanos (OECD, 2019), enquanto os porcos são selecionados por possuírem um tamanho e estrutura ocular que se assemelham aos dos humanos (Chan KY et al., 2014; Menduni F et al., 2018). Os macacos, por sua vez, são frequentemente utilizados em pesquisas sobre a visão, devido à sua visão binocular e capacidade de discernimento de cores semelhantes às humanas, o que lhes confere um sistema visual de elevada complexidade (Mustari MJ et al., 2017).

Apesar da relevância histórica dos modelos animais no avanço da pesquisa oftalmológica, a busca por abordagens alternativas tem recebido crescente atenção e apoio nos

últimos anos (Pound & Bracken, 2014). Essa tendência é impulsionada por diversos fatores, tais como preocupações éticas e ambientais relacionadas ao bem-estar dos animais, os elevados custos envolvidos na aquisição, criação e manutenção de animais em ambiente laboratorial, o baixo retorno sobre o investimento devido à reduzida taxa de sucesso na tradução para humanos e as limitações científicas inerentes aos modelos animais.

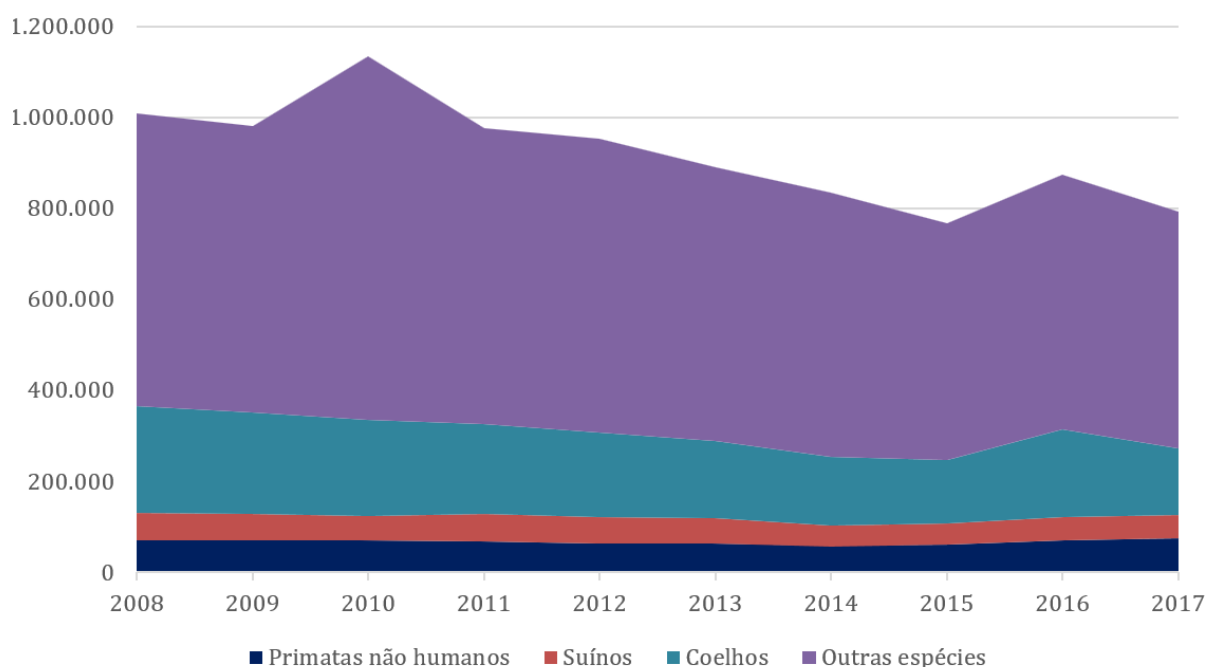
Uma das principais limitações dos modelos animais reside na heterogeneidade entre as diferentes espécies. Apesar das similaridades existentes, cada espécie animal apresenta características fisiológicas, metabólicas e imunológicas distintas que podem influenciar a resposta a fármacos e terapias. Diferenças significativas entre as espécies podem ser identificadas em aspectos fundamentais da fisiologia ocular, como a composição do filme lacrimal, a taxa de renovação celular da córnea, a resposta inflamatória a estímulos externos e a expressão de mucina pelas células epiteliais da córnea (Leonard BC et al., 2016).

Essas disparidades podem comprometer a aplicação direta dos resultados obtidos em estudos com animais na pesquisa clínica em seres humanos. Doenças oculares multifatoriais, como o glaucoma, a degeneração macular relacionada à idade e a retinopatia diabética, são afetadas por interações complexas entre fatores genéticos e ambientais (Nath M et al., 2017). A reprodução precisa dessas condições *in vivo* pode representar um desafio significativo, o que restringe a capacidade de prever a eficácia e a segurança de novos tratamentos em seres humanos.

Estudos envolvendo animais frequentemente enfrentam desafios metodológicos que restringem sua aplicabilidade aos seres humanos (Pound e Bracken, 2014). A diversidade de espécies e linhagens animais, com diferentes vias metabólicas e metabólitos, resulta em variações na eficácia e toxicidade de medicamentos. Os modelos utilizados para induzir doenças ou lesões muitas vezes não refletem com precisão as condições humanas, e os regimes de dosagem de fármacos podem não ser adequados para a situação clínica humana. Adicionalmente, a falta de padronização na seleção de animais, métodos de randomização, escolha de terapias comparativas e relato de perdas de seguimento pode comprometer a validade dos resultados. Grupos experimentais com tamanho reduzido e poder estatístico insuficiente, análises estatísticas simplistas e falhas na adesão aos princípios de intenção de tratamento também representam desafios.

Outros fatores, como variações nas técnicas laboratoriais e na escolha de medidas de desfecho de relevância questionável para a condição clínica humana, podem influenciar os

resultados sem serem devidamente reconhecidos ou reportados. Por fim, a duração do acompanhamento até a determinação do desfecho da doença varia e pode não refletir a latência da doença em seres humanos. Essas questões metodológicas suscitam dúvidas sobre a validade e a aplicabilidade dos resultados de estudos em animais para a pesquisa clínica em humanos. Além disso, a realização de estudos de longo prazo requer um grande número de animais, o que, aliado à variabilidade biológica e às condições experimentais, torna os modelos *in vivo* dispendiosos. Muitos estudos *in vivo* disponíveis apresentam problemas que impactam diretamente os resultados, como a má condição da córnea, a utilização de doses únicas para avaliação, embora a maioria dos tratamentos exija administração repetida, e o uso de anestesia, que pode afetar a resposta fisiológica lacrimal.



**Figura 5.** Relatório anual do uso de animais por espécie, 2008 até 2017. Pesquisa realizada em Robinson NB et al, 2019.

Conforme ilustrado na Figura 5, tem-se verificado uma redução gradual no uso de animais em pesquisas nos últimos anos. Este declínio é possivelmente atribuído às questões previamente mencionadas relacionadas ao uso de animais, bem como aos resultados questionáveis obtidos a partir desses testes.

### 2.2.1 Modelos *ex vivo* e *in vitro* em pesquisas oculares

Nos últimos anos, observa-se um crescente desenvolvimento e validação de modelos e métodos oftálmicos *ex vivo* e *in vitro* para avaliar a performance de fármacos. Avaliação essa

fundamental durante as etapas de pesquisa e desenvolvimento de novas formulações oftálmicas, permitindo determinar a eficácia do produto, a posologia ideal e identificar abordagens terapêuticas promissoras.

Os métodos *ex vivo* frequentemente utilizados empregam a córnea isolada ou o olho inteiro para investigar a permeação de fármacos, porém não consideram o fluxo lacrimal, um mecanismo de proteção que desempenha um papel crucial na depuração ocular. Essa limitação pode levar a uma superestimação da permeação do fármaco, o que compromete a confiabilidade dos resultados. No entanto, um modelo *ex vivo* mais recente incorpora um fluxo lacrimal (porém sem movimento de piscagem) para simular de forma mais precisa a drenagem durante a aplicação de uma formulação ocular (Barbalho G et al., 2023).

A ausência do movimento palpebral em modelos *ex vivo* e *in vitro* representa outra limitação significativa. O movimento dinâmico das pálpebras influencia diretamente a quantidade de formulação que permanece em contato com a superfície ocular, aumentando a depuração e conseqüentemente impactando a biodisponibilidade do fármaco.

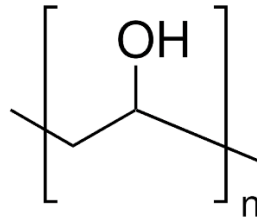
Portanto, os modelos *ex vivo* e *in vitro* disponíveis apresentam limitações consideráveis na reprodução das principais barreiras de proteção ocular, o que pode levar a uma superestimação da performance dos fármacos, uma vez que as formulações não são testadas sob condições que mimetizam o ambiente fisiológico *in vivo*.

O avanço de modelos oftálmicos mais complexos que consideram o fluxo lacrimal, o movimento palpebral e outras características relevantes do olho humano é fundamental para uma avaliação precisa da eficácia dos fármacos. Os modelos *in vivo* representam alternativas promissoras devido ao seu custo reduzido e maior capacidade de reprodução, sendo, portanto, essenciais no desenvolvimento de novas formulações para uma compreensão abrangente da biodisponibilidade, eficácia e segurança de formulações oftálmicas inovadoras.

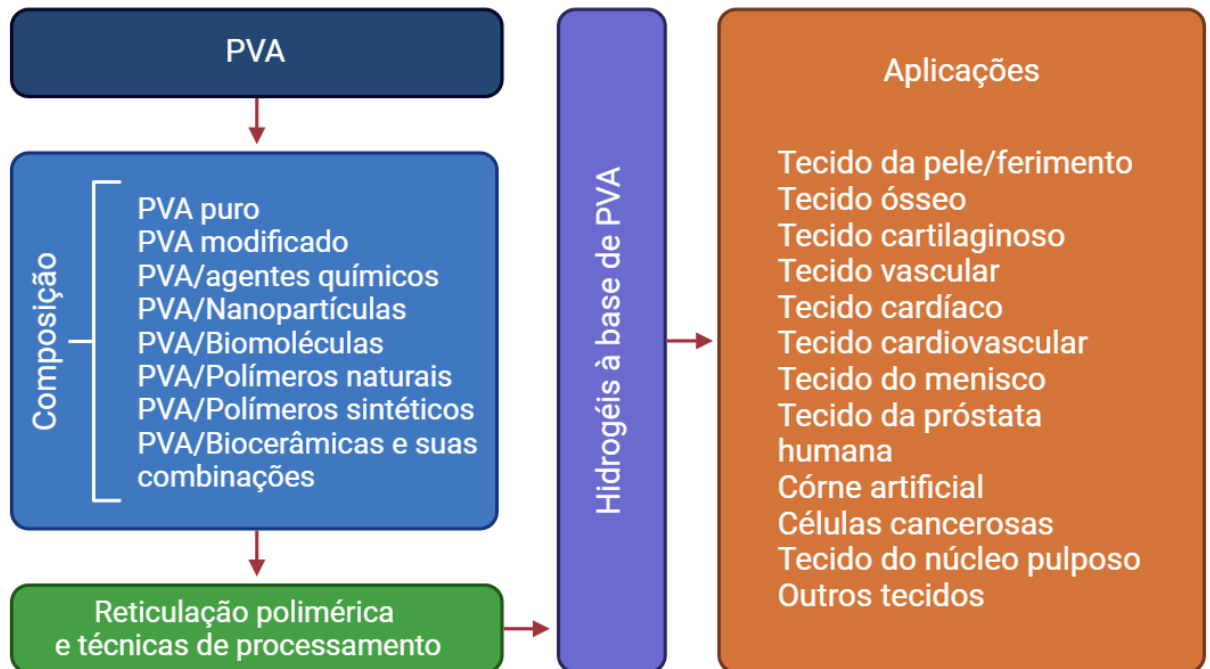
### **2.3 Membranas poliméricas**

As membranas poliméricas já são comumente utilizadas em diversas aplicações biomédicas para entrega de medicamentos, engenharia de tecidos, hemodiálise, desenvolvimento de órgãos artificiais, entre outros (Ribeiro M.H.L. et al., 2017; Radu E. et al., 2023). Polímeros biodegradáveis são amplamente utilizados no desenvolvimento de novos materiais biomédicos, incluindo córneas artificiais (Pal K et al., 2006; Bakhshandeh H et al., 2011; Jin S. et al., 2022). Nesse sentido, o álcool polivinil (PVA) é um polímero semicristalino sintético que possui

propriedades muito atrativas na aplicação biomédica e engenharia de tecidos. Sua natureza hidrofílica, conferida pelos grupos hidroxila, associada à biodegradabilidade, baixo custo, alta resistência mecânica e capacidade de formação de membranas, o torna um material promissor na obtenção de curativos, implantes e matrizes para cultivo celular (Patil M. et al., 2022).

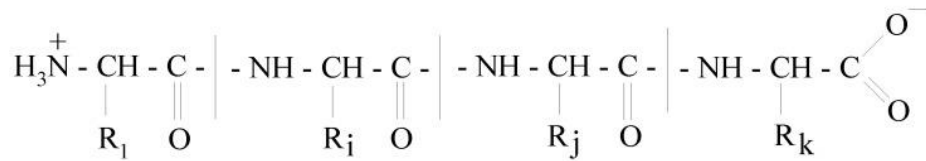


**Figura 6.** Estrutura química do monômero do álcool polivinil (PVA). Imagem retirada de sigmaaldrich.com.

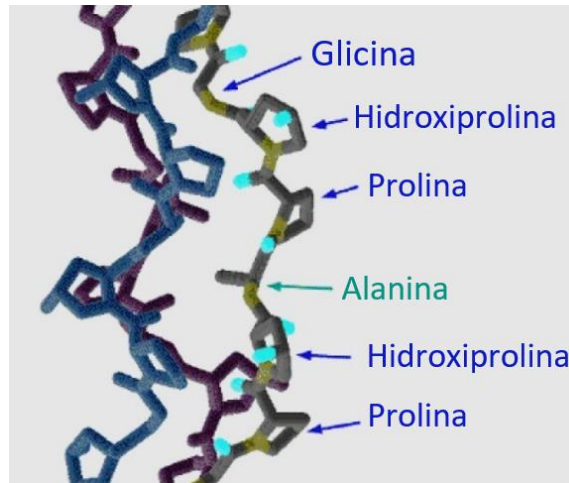


**Figura 7.** Esquema sobre as diversas composições e aplicações do PVA para obtenção de biomateriais de aplicação terapêutica. Imagem retirada e adaptada de Kumar A et al, 2016.

A gelatina é obtida através da desnaturação do colágeno presente na pele e ossos de animais. Sua estrutura é constituída por uma tripla-hélice peptídica com ligações de hidrogênio entre as cadeias, o que confere grande força e estabilidade ao material. Sendo assim a gelatina é um material de baixo custo muito utilizado para obtenção de hidrogéis devido à sua capacidade de conferir resistência mecânica (Bigi A. et al., 2004).

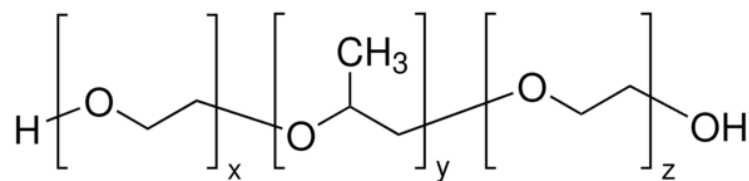


**Figura 8.** Fórmula estrutural da gelatina. Imagem retirada de Mikhailov OV et al., 2023.



**Figura 9.** Três cadeias polipeptídicas α formam uma tríplice hélice de gelatina. A gelatina é estabilizada pela formação de ligações cruzadas covalentes, tanto dentro da tríplice hélice de gelatina quanto entre as hélices de gelatina. Imagem retirada e adaptada de Mikhailov OV. et al., 2023.

Poloxamer 407, também conhecidos como Pluronic® F-127, é um surfactante hidrossolúvel não iônico com baixa toxicidade. Pertence a uma categoria de copolímeros sintéticos constituído por três blocos, onde a cadeia hidrofóbica central de poli(propilenoglicol) é flanqueada por duas cadeias hidrofílicas de poli(etilenoglicol).



**Figura 10.** Fórmula estrutural do Poloxamer 407. Imagem retirada de sigmaldrich.com.

As mucinas são glicoproteínas encontradas associadas a superfície ocular, que vem sendo muito estudadas para melhorar biodisponibilidade de fármacos através da mucoadesão, uma vez que a interação da formulação com a camada de mucina resulta em uma menor remoção da formulação através dos mecanismos de proteção ocular (Gratieri et al. 2010).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

Os materiais necessários para a realização do estudo foram adquiridos de diferentes fornecedores. O fluconazol, a quitosana, o álcool polivinílico (PVA), a mucina tipo II e o Poloxamer® 407 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A gelatina foi obtida da Vetec, localizada no Rio de Janeiro, Brasil. O carbonato de sódio foi adquirido da Reagen (Colombo, Brasil), enquanto o cloreto de sódio e o cloreto de cálcio foram adquiridos da Dinâmica (São Paulo, Brasil). A moxifloxacino foi fornecida pela Eurofarma (São Paulo, Brasil). O oleato de etila e o Cremophor® EL foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o Plurol® Oleique foi fornecido pela Gattefossé (Lyon, França). A acetonitrila e metanol de grau de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram adquiridos da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). A água ultrapurificada da Merck Millipore, (Illkirch-Graffenstaden, França) foi utilizada para todas as análises realizadas.

#### **3.2 Produção das membranas poliméricas e híbrida baseada em hidrogel**

As membranas poliméricas foram preparadas pela técnica de *casting*, utilizando uma combinação de álcool polivinílico (PVA), gelatina tipo A, mucina suína tipo II (0,5%) e Poloxamer® 407 (1,0%), conforme método descrito por (Barbalho G.N. et al, 2024a). Membranas híbridas à base de hidrogel foram sintetizadas utilizando metacrilato de gelatina e metacrilato de mucina por meio de fotopolimerização, seguindo procedimento descrito por (Barbalho GN. et al, 2024b).

#### **3.3 Quantificação e preparação das formulações**

Para a análise foram utilizados dois grupos de formulações distintas: (i) uma formulação mucoadesiva composta por 16% de poloxâmero, 0,2% de fluconazol e 1,0% de quitosana (PLX16C10) em comparação com uma formulação convencional composta por 16% de poloxâmero e 0,2% de fluconazol (PLX16); e (ii) uma formulação de microemulsão composta de moxifloxacino 5% com poloxamer 5% (NEMOX) em comparação com um controle de propilenoglicol 50% com 5 % depoloxamer e 5% de moxifloxacino (CONTROL). Ambos os géis de Fluconazol 0,2% foram preparados solubilizando 16% de poloxamer em água e um contendo 1,0% de quitosana, seguindo as instruções de (Gratieri et al., 2011). O fluconazol foi

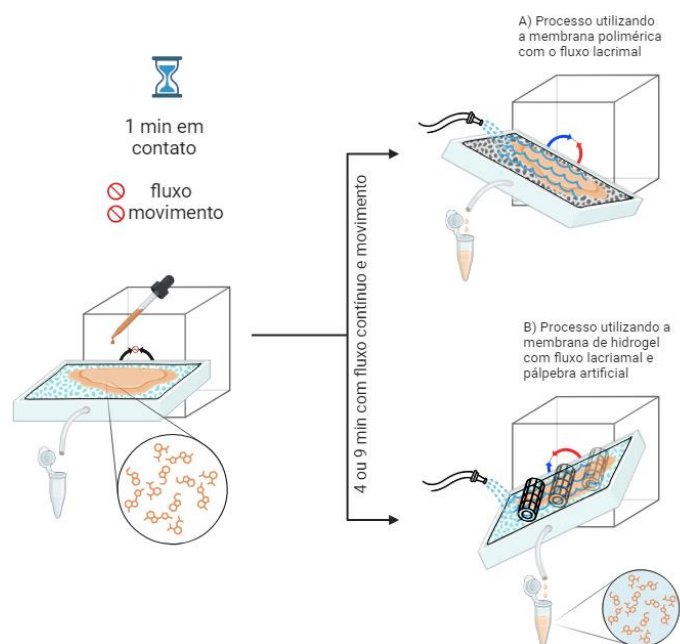


analisado a 210 nm, com um volume de injeção de 20 µL em sistema isocrático utilizando acetonitrila, metanol e água (15:5:80) como fase móvel. A vazão foi de 0,8 mL/min, e uma coluna C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm, Supelco Discovery BIO Wide-Pore) foi usada com a temperatura ajustada em 40°C.

A microemulsão de moxifloxacino foi preparada com uma combinação de surfactante e (Cremophor® EL e Plurol® Oleique, 4:1 p/p) dissolvidos na fase oleosa, seguida pela adição da fase aquosa sob agitação contínua a 1.000 rpm em temperatura ambiente. O preparo foi finalizado com a adição de 5% de poloxamer sob refrigeração, conforme descrito por (Cardoso et al., 2022). Um controle aquoso de propilenoglicol a 50% com 5% de poloxamer foi preparado solubilizando moxifloxacino a 5%. O moxifloxacino foi analisada utilizando uma coluna de fase normal µporasil (10 µm, 125 Å, 3,9 mm x 300 mm, Cambridge, EUA). A fase móvel consistiu em uma mistura de solvente A (ácido fosfórico 0,01 M) e solvente B (metanol) na proporção de 24:76 (v/v). A análise foi realizada a uma vazão de 0,8 mL/min, com um volume de injeção de amostra de 25 µL. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C, e a detecção UV foi realizada a 290 nm.

### **3.4 Variando as condições de testagem no dispositivo OphthalMimic**

Os testes de resistência foram realizados aplicando 300 µL de cada formulação. A solução lacrimal artificial foi preparada conforme descrito por (Miyazaki et al., 2001), contendo NaHCO<sub>3</sub> 0,2%, NaCl 0,67% e CaCl<sub>2</sub> 0,008%. Os testes foram realizados em dois tipos de membrana: uma membrana polimérica e uma membrana híbrida à base de hidrogel preparada conforme item 3.2. Como a membrana de hidrogel é mais resistente que a polimérica, só foi possível incorporar a pálpebra artificial nos testes de hidrogel (Figura 11). No aparelho, o movimento angular da plataforma (variando de 0° a 50°) faz com que a pálpebra artificial se mova a uma frequência de 32 movimentos por minuto, imitando o piscar natural. O fluido coletado durante o teste foi examinado para análise. As condições de teste variaram de acordo com a Tabela 2.



**Figura 11.** Representação esquemática ilustrando o processo de lavagem realizado pelo Dispositivo OphthalMimic. O processo envolve a aplicação de uma formulação acima da membrana, um período de descanso de um minuto e o início do processo de lavagem utilizando fluxo de lágrima artificial por 4 ou 9 minutos, com ou sem a utilização de pálpebra artificial.

Para melhorar a interação entre a formulação e a membrana, o fluxo lacrimal contínuo foi iniciado após 1 minuto da aplicação da formulação. A condição de 1 minuto sem fluxo seguido de 4 minutos de fluxo foi testada com taxas de fluxo regulares e reduzidas. A mesma condição de pré-aplicação estática de 1 minuto seguida de 9 minutos de fluxo contínuo de 0,5 mL/min foi avaliada em ambas as membranas com formulações de fluconazol e moxifloxacino.

**Tabela 2.** Protocolo com variações de fluxo, membrana e formulações testadas no dispositivo OphthalMimic.

| Duração                                      | Fluxo (mL/min) | Membrana   | Formulação testada                    |
|--|----------------|------------|---------------------------------------|
| 1 min de contato sem fluxo + 4 min com fluxo | 1              | Polimérica | PLX16<br>PLX16C10                     |
| 1 min de contato sem fluxo + 4 min com fluxo | 0.5            | Polimérica | PLX16<br>PLX16C10                     |
| 1 min de contato sem fluxo + 9 min com fluxo | 0.5            | Polimérica | PLX16<br>PLX16C10<br>CONTROL<br>NEMOX |
| 1 min de contato sem fluxo + 9 min com fluxo | 0.5            | Hidrogel   | PLX16<br>PLX16C10<br>CONTROL<br>NEMOX |

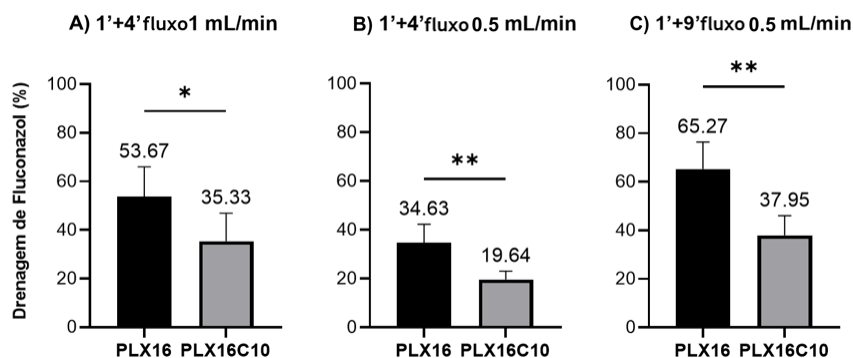
### 3.5 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada no software GraphPad Prism®, versão 9.0.0 (San Diego, CA, EUA), pelo método *t-test*. A hipótese nula foi rejeitada com segurança a um nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

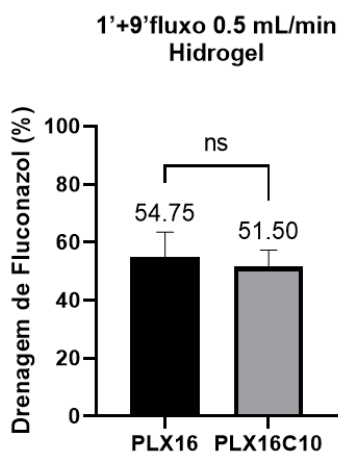
De acordo com os resultados de publicações anteriores, a membrana polimérica contendo gelatina (2,5% p/v), PVA (10% p/v) e uma combinação de poloxamer e mucina na proporção de 2:1 (m/m) apresentou melhor resistência de acordo com os testes de propriedades mecânicas, incluindo capacidade de intumescimento, alongamento mínimo e deformação. Portanto essa membrana polimérica foi escolhida para realizar as seguintes variações de protocolo em relação ao fluxo e tempo no dispositivo OphthalMimic. A membrana polimérica é uma membrana seca de camada única que contém mucina em sua composição para simular a superfície da córnea.

Nossos resultados anteriores mostraram que a membrana é adequada para avaliar formulações que possuem compostos mucoadesivos em sua composição. No entanto, para melhorar ainda mais a capacidade do teste em diferenciar formulações com uma propriedade mucoadesiva mais discreta, como formulações nanoestruturadas, propusemos variações de protocolo que poderiam melhorar o tempo de contato da formulação com a membrana (Singh M et al., 2020). Os resultados apresentados na Figura 12a e b mostram que a diminuição do fluxo lacrimal simulado de 1,0 para 0,5 mL/min realmente melhorou o poder de discriminação do dispositivo, fornecendo um valor de  $p$  menor para este último. A vazão reduzida também permitiu uma duração de teste mais longa de 9 minutos, reduzindo o estresse na membrana (Figura 12c).



**Figura 12.** Porcentagem de FLU drenada no dispositivo OphthalMimic para as formulações PLX16% e PLX16C1.0% utilizando a membrana polimérica. A) 1 minuto de contato com a membrana sem fluxo, seguido por 4 minutos de fluxo lacrimal contínuo a uma taxa de 1 mL/min. B) 1 minuto de contato com a membrana sem fluxo, seguido por 4 minutos de fluxo lacrimal a uma taxa de 0,5 mL/min. C) 1 minuto de contato com a membrana sem fluxo, seguido por 9 minutos de fluxo lacrimal a uma taxa de 0,5 mL/min. A análise estatística utilizando t-test confirmou diferenças significativas entre as formulações. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

O período de teste prolongado levou à mesma diferença estatística, mas a diferença entre as quantidades absolutas drenadas foi maior, o que poderia indicar um melhor comportamento discriminatório. O protocolo de repouso da formulação por 1 minuto sem fluxo na superfície da membrana e posterior aplicação de um fluxo lacrimal simulado de 0,5 mL/min por 9 minutos foi então aplicado para avaliar o tempo de residência do fluconazol das formulações PLX 16 e PLXC10 utilizando a membrana à base de hidrogel (Figura 13).

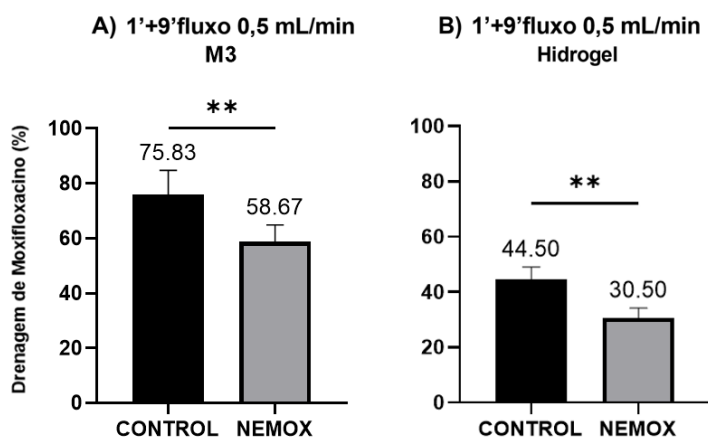


**Figura 13.** Porcentagem de FLU drenada no dispositivo OphthalMimic utilizando membrana de hidrogel com pálpebra artificial. A análise estatística utilizando t-test confirmou diferenças significativas entre as formulações. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Como afirmado anteriormente, como a membrana de hidrogel é mais resistente que a polimérica, a pálpebra artificial também poderia estar presente, simulando o movimento de piscar. Surpreendentemente, o dispositivo não foi capaz de diferenciar mais entre as duas formulações ( $p > 0,05$ ). Por um lado, o movimento de piscar melhorou a interação entre a formulação controle (PLX 16) e a membrana base, diminuindo sua drenagem de  $65,27 \pm 11,06\%$

para  $54,75 \pm 8,79\%$ . Por outro lado, o mesmo movimento de piscar foi responsável por promover uma maior drenagem da formulação mucoadesiva. A drenagem aumentou de  $37,95 \pm 8,07\%$  para  $51,50 \pm 6,16\%$ . A explicação mais plausível para esse efeito é a diferença de viscosidade das formulações. Assim, em um experimento anterior avaliando a membrana base de hidrogel submetida a um fluxo lacrimal contínuo por 10 minutos com uma taxa de 1,0 mL/min, também com movimento palpebral, a drenagem da formulação controle foi comparável à obtida com a condição atual de 1 + 9 min, PLX16  $72,01 \pm 3,57\%$  e a drenagem da formulação PLX16C10 também aumentou para  $64,73 \pm 3,46\%$ , mas o protocolo ainda foi capaz de diferenciar ambas as formulações ( $p = 0,0062$ ) (Barbalho GN et al, 2024b).

Os resultados atuais indicam que, para formulações com diferentes viscosidades, pode ser necessário ajustar as quantidades de formulação aplicada. De fato, a comparação do mesmo protocolo utilizando membranas diferentes com formulações diferentes (uma convencional (CONTROLE), a outra microestruturada (NEMOX)), mas com viscosidades aparentes similares, mostra que ambas as membranas, poliméricas e baseadas em hidrogel, são capazes de diferenciar as formulações (figura 14 b).



**Figura 14.** Porcentagem de drenagem de MOX no dispositivo OphthalMimic. A) Drenagem de MOX utilizando a membrana polimérica M3 sem pálpebra artificial. B) Drenagem de MOX utilizando membrana de hidrogel com pálpebra artificial. A análise estatística utilizando t-test confirmou diferenças significativas entre as formulações. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

O aumento da complexidade e capacidade de intumescimento do hidrogel trilamellar, juntamente com a presença do movimento palpebral, intensifica a interação da base com o microsistema, reduzindo assim a quantidade drenada em comparação com a membrana polimérica. Como o protocolo baseado em hidrogel adiciona a simulação do efeito de piscar, ele replica com mais precisão o processo fisiológico. Por outro lado, o protocolo baseado em filme polimérico com tempo prolongado e fluxo menor também diferencia as formulações e pode representar uma ótima opção, oferecendo mais praticidade aos testes. A inclusão dessa

abordagem de aplicação pré-estática também pode melhorar a avaliação de nanossistemas, como microemulsões, lipossomas e outros. São necessárias pesquisas adicionais para fundamentar esta proposta.

## 5 CONCLUSÃO

Neste estudo, foram implementadas variações de protocolo utilizando o dispositivo OphthalMimic. O protocolo que inclui uma pré-aplicação estática de 1 minuto, seguida por 9 minutos de um fluxo lacrimal simulado contínuo mais baixo, demonstrou maior capacidade de discriminação do dispositivo ao avaliar diferentes formulações. A viscosidade da formulação mostrou-se um fator relevante na seleção do protocolo, no qual formulações com viscosidade semelhante podem ser analisadas com o protocolo da membrana mais complexa baseada em hidrogel, que inclui um movimento simulado das pálpebras.

Ademais, o protocolo baseado em membrana polimérica, com tempo prolongado e menor fluxo lacrimal simulado, oferece uma abordagem mais prática, permitindo uma triagem rápida de diferentes formulações, o que aumenta a eficiência da pesquisa e desenvolvimento, reduzindo custos e o número de animais utilizados em experimentação. Essa vantagem é de grande importância para o desenvolvimento de novas formulações e para investigações regulatórias.

## 6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Jin, S. (2022). Production and application of biomaterials based on polyvinyl alcohol (PVA) as wound dressing: A mini review. *Chemistry, an Asian journal*. <https://doi.org/10.1002/asia.202200595>.
2. Silva, B., Braz, B., Delgado, E., & Gonçalves, L. (2021). Colloidal nanosystems with mucoadhesive properties designed for ocular topical delivery. *International journal of pharmaceutics*, 120873. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120873>.
3. Guérin LP, Le-Bel G, Desjardins P, Couture C, Gillard E, Boisselier É, Bazin R, Germain L, Guérin SL. The Human Tissue-Engineered Cornea (hTEC): Recent Progress. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 28;22(3):1291. <https://doi.org/10.3390/ijms22031291>.
4. Morrison, P. W., & Khutoryanskiy, V. V. (2014). Advances in Ophthalmic Drug Delivery. *Therapeutic Delivery*, 5(12), 1297–1315. <https://doi.org/10.4155/tde.14.75>.
5. Ribeiro, M.H.L. (2017). Emerging Technologies of Hydrogels in Bioactive Compounds

- Delivery. In: Puri, M. (eds) Food Bioactives. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-51639-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-51639-4_10).
6. Singh M, Bharadwaj S, Lee KE, Kang SG. Therapeutic nanoemulsions in ophthalmic drug administration: Concept in formulations and characterization techniques for ocular drug delivery. *J Control Release*. 2020 Dec 10;328: 895-916. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.025>.
  7. Pal K, Banthia AK, Majumdar DK. Polyvinyl alcohol--gelatin patches of salicylic acid: preparation, characterization and drug release studies. *J Biomater Appl*. 2006 Jul;21(1):75-91. <https://doi.org/10.1177/0885328206056312>.
  8. Bakhshandeh H, Soleimani M, Hosseini SS, Hashemi H, Shabani I, Shafiee A, Nejad AH, Erfan M, Dinarvand R, Atyabi F. Poly (epsilon-caprolactone) nanofibrous ring surrounding a polyvinyl alcohol hydrogel for the development of a biocompatible two-part artificial cornea. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:1509-15. <https://doi.org/10.2147/IJN.S19011>.
  9. Mantelli F, Argüeso P. Functions of ocular surface mucins in health and disease, *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008; 8(5), 477-83. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32830e6b04>.
  10. Meigs, L., Smirnova, L., Rovida, C., Leist, M. and Hartung, T. (2018) "Animal testing and its alternatives – the most important omics is economics", *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, 35(3), pp. 275–305. <https://doi.org/10.14573/altex.1807041>.
  11. Mantelli F, Mauris J, Argüeso P. The ocular surface epithelial barrier and other mechanisms of mucosal protection: from allergy to infectious diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2013 Oct;13(5):563-8. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e3283645899>.
  12. Sheppard JD, Nichols KK. Dry Eye Disease Associated with Meibomian Gland Dysfunction: Focus on Tear Film Characteristics and the Therapeutic Landscape. *Ophthalmol Ther*. 2023 Jun;12(3):1397-1418. <https://doi.org/10.1007/s40123-023-00669-1>.
  13. Chang AY, Purt B. Biochemistry, Tear Film. 2023 Jun 5. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 34283502. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572136/>.
  14. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol*. 2018 Feb;66(2):190-194. [https://doi.org/10.4103/ijo.IJO\\_646\\_17](https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_646_17).

15. Radu ER, Voicu SI, Thakur VK. Polymeric Membranes for Biomedical Applications. *Polymers (Basel)*. 2023 Jan 25;15(3):619. <https://doi.org/10.3390/polym15030619>.
16. Patil M.; Mathad, S.N.; Patil, A.Y.; Arshad, M.N.; Alorfi, H.S.; Puttegowda, M.; Asiri, A.M.; Khan, A.; Azum, N. Synthesis and Characterization of Microwave-Assisted Copolymer Membranes of Poly (vinyl alcohol)-g-starch-methacrylate and Their Evaluation for Gas Transport Properties. *Polymers* 2022, *14*, 350. <https://doi.org/10.3390/polym14020350>.
17. Kumar, A., & Han, S. S. (2016). PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 66(4), 159–182. <https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1190930>.
18. Bigi A, Panzavolta S, Rubini K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*. 2004 Nov;25(25):5675-80. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.033>.
19. Mikhailov OV. Gelatin as It Is: History and Modernity. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 10;24(4):3583. <https://doi.org/10.3390/ijms24043583>.
20. OECD (2023), Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264185333-en>.
21. McCall MA. Pig Models in Retinal Research and Retinal Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2024 Apr 1;14(4): a041296. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.%20a041296>.
22. Mustari MJ. Nonhuman Primate Studies to Advance Vision Science and Prevent Blindness. *ILAR J*. 2017 Dec 1;58(2):216-225. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilx009>.
23. Pound P, Bracken MB. Is animal research sufficiently evidence based to be a cornerstone of biomedical research? *BMJ*. 2014 May 30;348:g3387. <https://doi.org/10.1136/bmj.g3387>.
24. Leonard BC, Yañez-Soto B, Raghunathan VK, Abbott NL, Murphy CJ. Species variation and spatial differences in mucin expression from corneal epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2016 Nov; 152:43-48. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.09.001>.
25. Nath M, Halder N, Velpandian T. Circulating biomarkers in glaucoma, age-related macular degeneration, and diabetic retinopathy. *Indian J Ophthalmol*. 2017 Mar;65(3):191-197. [https://doi.org/10.4103/ijo.IJO\\_866\\_16](https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_866_16).
26. Robinson NB, Krieger K, Khan FM, Huffman W, Chang M, Naik A, Yongle R, Hameed I, Krieger K, Girardi LN, Gaudino M. The current state of animal models in research: A



- review. *Int J Surg*. 2019 Dec; 72:9-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2019.10.015>.
27. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg*. 2011 Mar;37(3):588-98. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2010.12.037>.
28. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol*. 2018 Feb;66(2):190-194. [https://doi.org/10.4103/ijo.IJO\\_646\\_17](https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_646_17).
29. Doke, S. K., & Dhawale, S. C. (2015). Alternatives to animal testing: A review. *Saudi pharmaceutical journal: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 23(3), 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>.
30. Menduni, F., Davies, L. N., Madrid-Costa, D., Fratini, A., & Wolffsohn, J. S. Characterisation of the porcine eyeball as an in-vitro model for dry eye, Contact lens & anterior eye : the journal of the British Contact Lens Association. **2018**, 41(1), 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2017.09.003>.
31. Chan, K. Y., Cho, P., & Boost, M. Corneal epithelial cell viability of an ex vivo porcine eye model, *Clinical and Experimental Optometry*. **2014**, 97(4), 337–340. <https://doi.org/10.1111/cxo.12128>.