

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

FRANCIELI PEREIRA

**Desenvolvimento de nanodispersões lipídicas contendo insulina para
tratamento tópico da doença do olho seco**

Ribeirão Preto
2017

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Desenvolvimento de nanodispersões lipídicas contendo insulina para
tratamento tópico da doença do olho seco**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Francieli Pereira

Orientadora: Profa. Dra. Renata F. V. Lopez

Ribeirão Preto
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pereira, Francieli

Desenvolvimento de nanodispersões lipídicas contendo insulina para tratamento tópico da doença do olho seco. Ribeirão Preto, 2017.

p.: 143; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Profª Drª Renata Fonseca Vianna Lopez

1. Doença do olho seco. 2. Insulina. 3. Lipossoma.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Francieli Pereira

Desenvolvimento de nanodispersões lipídicas contendo insulina para tratamento tópico da doença do olho seco.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Profa. Dra. Renata F. V. Lopez

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Ao Universo, a Deus, a Mãe Terra ou qualquer outro nome dado a essa força maior, divina e criadora, pelo dom da vida e da criação.

A minha família, mãe, pai e irmão, os quais sempre me incentivaram e apoiaram em absolutamente todas as minhas escolhas pessoais e profissionais. Aos meus amigos especiais, aqueles quase irmãos, por fazerem da rotina pesada algo mais leve.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez pelo maior exemplo de competência a ser seguido, exemplo de profissional, de professora e de mulher pesquisadora. Por todo incentivo e motivação para que este trabalho fosse o melhor possível, incluindo desde as orientações científicas à motivação profissional e pessoal, me fazendo lembrar que, por trás do lado profissional, ainda somos humanos. Agradeço ainda pela oportunidade de fazer parte do Centro de Inovação em Sistemas Nanoestruturados e de Administração Tópica (NanoTop) da FCFRP-USP.

Ao Prof. Dr. Eduardo Milani Rocha por todo os ensinamentos repassados e pela ajuda referente a grande parte desse projeto. Pela doutoranda Lara Dias e pela técnica Marina da Casa 19, por terem me auxiliado nos ensaios de cultura de células.

À Profa. Marcia Fantini e ao Prof. Cristiano de Oliveira do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, *campus* São Paulo, pelos experimentos em espalhamento de raio-X à baixo ângulo (SAXS). Ao doutorando Pedro Leônidas que nos ajudou com a parte técnica desses experimentos, repassando um pouco dos seus ensinamentos de física.

À técnica Patrícia Sper, por toda a sua paciência, compreensão e disposição em ajudar. À técnica Marina pela disposição e apoio científico na execução deste trabalho.

Às minhas queridas companheiras de laboratório e sobretudo amigas: Luciana, Camila Lemos, Camila Cubayachi, Danielle Nishida por me ajudaram imensamente em todas as questões que precisei desse trabalho, incluindo experimentos, ideias, conhecimentos, conversas, em especial a Camila Lemos que me auxiliou muito nos experimentos finais.

Aos demais companheiros de bancada: Abayomi, Karina, Daniela Bernardi, Raquel que também sempre foram muito prestativos e grandes colegas de trabalho.

Às alunas de iniciação científica Mariane e Brenda, que me proporcionaram a experiência de orientar, ensinar e aprender durante o desenvolvimento desse projeto, contribuindo para meu crescimento profissional como futura docente.

Ao Prof. Hamilton Cabral e à técnica Nathalia Rosa que me auxiliaram em várias análises relacionadas à insulina.

À Prof^a Lorena Gaspar Cordeio e a sua aluna Larissa Sá pelo auxílio na execução do teste de irritação ocular HET-CAM.

À Prof^a Juliana Marchetti pelo empréstimo dos equipamentos homogeneizador de alta pressão e TGA. Ao técnico Henrique pelo auxílio na execução desses experimentos.

À empresa Lipid Ingredients & Technology, por gentilmente doar matérias-primas para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos Eduardo Tozatto da FCFR-RP, Ivana da FFCLRP-RP, José Augusto e Tuca da FMRP-RP pelas análises em microscopia de confocal de varredura à laser, microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de transmissão.

À Prof^a Dr^a Maria Vitória Lopes Badra Bentley pelo empréstimo do equipamento NTA. Ao técnico José Orestes Del Ciampo pelo auxílio nas leituras.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto por proporcionar todos os meios de aprendizado e desenvolvimento desse projeto de pesquisa e do curso de mestrado. Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Eleni Angeli Passos, Rafael Braga Poggi e Rosana Florêncio, pela gentileza, preocupação e colaboração durante o período da pós graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) (número de processo 132557/2015-0) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio técnico e financeiro à pesquisa e desenvolvimento desse projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido na bolsa de Mestrado no país (número de processo 2015/04008-1) e pela concessão do projeto temático (número de processo 2014/22457-1), sem o qual este e outros trabalhos não poderiam ter sido desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento dessa pesquisa, um profundo e imenso agradecimento.

“Acho que o quintal onde a gente brincou é maior do que a cidade. A gente só descobre isso depois de grande. A gente descobre que o tamanho das coisas há que ser medido pela intimidade que temos com as coisas. Há de ser como acontece com o amor. Assim, as pedrinhas do nosso quintal são sempre maiores do que as outras pedras do mundo. Justo pelo motivo da intimidade.”

(Manoel de Barros)

RESUMO

PEREIRA, F. **Desenvolvimento de nanodispersões lipídicas contendo insulina para tratamento tópico da doença do olho seco.** 2017. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A doença do olho seco (DOS) é uma desordem multifatorial relacionada a um processo inflamatório das estruturas oculares. Ela afeta a produção do filme lacrimal e resulta em feridas na córnea que são de difícil cicatrização. Estudos recentes demonstraram que a insulina (INS) facilita o processo de cicatrização de feridas e restaura a produção de filme lacrimal em ratos diabéticos. No entanto, a INS é uma proteína que degrada com facilidade em meio biológico, carecendo de estratégias que melhorem sua biodisponibilidade para sua administração ocular. Neste contexto, lipossomas podem ser um veículo promissor para liberação tópica ocular da INS devido a sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e alto tempo de residência na superfície ocular. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver lipossomas contendo INS para uso tópico no tratamento da DOS. Pelo método de hidratação do filme lipídico e homogeneização em homogeneizador de alta pressão, foram preparados lipossomas compostos por fosfatidilcolina de soja (PC), colato de sódio (NaC) e poloxamer 188 em tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4. A INS foi adicionada ao tampão PBS, usado para hidratação do filme lipídico, na concentração de 0,4 mg/mL. Os lipossomas foram esterilizados por filtração em membrana 0,22 μm e caracterizados quanto ao tamanho de partícula e índice de polidispersão (Pdl) por espalhamento dinâmico de luz, potencial zeta, pH, eficiência de encapsulação (EE,%) e recuperação do fármaco (RF,%). Lipossomas de 125 ± 3 nm, Pdl de $0,27\pm 0,01$, potencial zeta de $-11\pm 1,5$ mV, pH 7,1, EE $32\pm 2\%$ e RF $82\pm 12\%$ foram obtidos. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão e de força atômica permitiram a observação de vesículas esféricas e assimétricas na presença de INS, com diâmetro médio variando de 120 a 150 nm. Estudos realizados por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) mostraram que a bicamada lipídica dos lipossomas contendo INS apresentaram simetria, com espessura de 42 Å, e INS dispersa em populações compostas por 6 a 15 monômeros com tamanho hidrodinâmico variável. Armazenados a 4°C, os lipossomas mantiveram suas características físicas estáveis por até 60 dias; e à temperatura ambiente, não houve degradação da INS por pelo menos 72 h. O ensaio *in vitro* de irritação ocular HET-CAM demonstrou baixo potencial irritante para as formulações sem e com INS. Estudos em cultura de células de epitélio de córnea humana (HCE) imortalizada demonstraram que o tratamento com as formulações contendo 1 UI de INS não foram citotóxicos e não promoveram aumento de MMP-9 em relação aos controles. Observou-se, no entanto, aumento na produção de IL-6, o qual pode contribuir para a cicatrização de feridas. Desta forma, os lipossomas demonstraram ser um sistema de liberação promissor para a administração tópica ocular da INS para DOS e cicatrização de feridas. Palavras-chave: Doença do olho seco (DOS). Insulina (INS). Lipossomas.

ABSTRACT

PEREIRA, F. **Development of lipid nanodispersions containing insulin for the topical treatment of dry eye disease.** 2017. 143 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Dry eye disease (DED) is a multifactorial disorder related to an inflammatory process in ocular structures. It affects tear film production and results in corneal wounds which are difficult to heal. Recent studies have shown that insulin (INS) facilitates the healing process of wounds and restores tear film production in diabetic rats. However, INS is a protein that degrades easily in biological environment, requiring strategies that improve its bioavailability in ocular delivery. In this context, liposomes may be a promising vehicle for ocular topical delivery of INS due to its biocompatibility, low toxicity and high residence time on the ocular surface. Thus, the aim of the present work was to develop liposomes containing INS for topical treatment of DED. Liposomes containing soy phosphatidylcholine (PC), sodium cholate (NaC) and poloxamer 188 in 10 mM phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 were prepared by the thin lipid film hydration method followed by high pressure homogenization. The INS was added to the PBS buffer used for lipid film hydration at a concentration of 0.4 mg/mL. The liposomes were sterilized using 0.22 μm filter and their particle size, polydispersity index (Pdl), zeta potential (ZP), pH, encapsulation efficiency (EE%) and drug recovery (DR,%) were determined. Liposomes particle size was 125 ± 3 nm, Pdl was 0.27 ± 0.01 , ZP was -11 ± 1.5 mV, pH was 7.1 while EE and DR were $32 \pm 2\%$ and $82 \pm 12\%$, respectively. Transmission electron and atomic force microscopy showed spherical and slightly asymmetric liposome vesicles in the presence of INS with a mean diameter varying from 120 to 150 nm. Small angle X-ray scattering (SAXS) studies showed symmetry in lipid bilayer of INS-loaded liposomes, with 42 Å thickness, and INS dispersed in populations varying from 6 to 15 monomers. Liposomes maintained their physical characteristics when stored at 4°C for up to 60 days while at room temperature, there was no INS degradation for at least 72 h. The *in vitro* ocular irritation assay HET-CAM showed low irritation potential for the formulations containing or not INS. Immortalized human corneal epithelial (HCE) cells culture demonstrated that formulations treatment containing 1 IU of INS were non-cytotoxic and did not increase MMP-9 levels compared to controls. However, increased IL-6 production has been observed, which may contribute to wound healing. Therefore, liposomes seem to be a promising delivery system for topical ocular delivery of INS for dry eye disease and wound healing.

Keywords: Dry eye disease. Insulin. Liposomes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia do globo ocular, estrutura e anexos.....	4
Figura 2. Anatomia do olho humano: segmento anterior e segmento posterior.....	5
Figura 3. Representação esquemática das diferentes camadas da córnea.....	8
Figura 4. Morfologia típica de Cultura de Epitélio de Córnea Humana (HCE)..	8
Figura 5. Anatomia do aparelho lacrimal humano.....	10
Figura 6. Tipos de células do epitélio de GL.....	11
Figura 7. Representação esquemática da estrutura do filme lacrimal.....	13
Figura 8. Estrutura primária da INS humana.....	27
Figura 9. Estruturas tridimensionais da INS.....	29
Figura 10. Receptor de INS e as principais vias de sinalização envolvidas na reparação tecidual, síntese de biomacromoléculas e uptake de glicose.....	30
Figura 11. Representação esquemática de uma vesícula lipídica lipossomal.....	34
Figura 12. Estrutura química dos componentes empregados no desenvolvimento dos lipossomas.....	44
Figura 13. Ensaio de irritação <i>in vitro</i> – modelo organotípico HET-CAM.....	54
Figura 14. Cromatograma de uma solução de INS 100 µg/ mL em solução de acetonitrila e água contendo 0,1% TFA na proporção de 40:60 (v/v).....	61
Figura 15. Cromatogramas obtidos no teste de seletividade.....	62
Figura 16. Curva analítica da INS no intervalo de concentração de 3 a 100 µg/mL.....	63
Figura 17. Distribuição do tamanho de partícula da dispersão de INS 0,4 mg/mL e dos lipossomas obtida por DLS.....	69
Figura 18. Distribuição do tamanho de partícula da dispersão de INS 0,4 mg/mL e dos lipossomas obtida por NTA.....	70
Figura 19. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos lipossomas (PC:NaC branco e PC:NaC INS).....	72
Figura 20. Fotomicrografias obtidas por microscopia de força atômica (MFA) modo contato-intermitente dos lipossomas (PC:NaC branco e PC:NaC INS) e da INS em solução de hidratação.....	73
Figura 21. Perfil de espalhamento SAXS para INS a 25°C.....	75

Figura 22. Ajuste das curvas experimentais de SAXS da INS (em tampão PBS e meio ácido) usando o procedimento Transformada Indireta de Fourier (IFT).....	76
Figura 23. Modelo tridimensional da proteína INS.....	77
Figura 24. Ajuste das curvas experimentais de lipossomas usando o procedimento IFT, medidos na temperatura de 25°C.....	79
Figura 25. Estabilidade física em função do tempo para os lipossomas PC:NaC Branco e PC:NaC INS.....	81
Figura 26. Porcentagem remanescente de INS em função do tempo de armazenamento do lipossoma PC:NaC INS e da dispersão de INS em PBS, a temperatura ambiente (25°C).....	82
Figura 27. Avaliação da irritação da membrana corioalantóide com ovos embrionados após contato com as dispersões lipossomais testadas.....	83
Figura 28. Citotoxicidade dos lipossomas e da dispersão de INS nas células da linhagem HCE-SV40.....	85
Figura 29. Estudo de viabilidade celular da cultura de células HCE-SV40 avaliada pelo método de vermelho neutro após estímulo inflamatório com diferentes concentrações de LPS (A) e com 2000 ng/mL de LPS, seguido ou não de scratch com ponteira, ou com SDS 0,5% (B).....	86
Figura 30. Expressão de marcadores inflamatórios na cultura de células HCE-SV40 estimulada com 2000 ng/mL de LPS por 24 h.....	87
Figura 31. Expressão de marcadores inflamatórios na cultura de células HCE-SV40 após estímulo com LPS e tratamento com diferentes concentrações de lipossoma branco por 24	88
Figura 32. Expressão de marcadores inflamatórios na cultura de células HCE-SV40 após estímulo com LPS e tratamento com $4 \cdot 10^9$ partículas/mL de lipossoma branco e lipossoma contendo INS por 24 h.....	89
Figura 33. Expressão de marcadores inflamatórios na cultura de células HCE-SV40 após tratamento com formulações por 24	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos lipossomas.....	44
Tabela 2 – Resultados do teste de <i>System Suitability</i>	61
Tabela 3 – Precisão e exatidão do método analítico.....	63
Tabela 4 – Parâmetros obtidos por CLAE ($\lambda = 220$ nm) para a análise da sensibilidade do método analítico.....	64
Tabela 5 – Características físico-químicas das formulações preliminares após 24 h.....	65
Tabela 6 – Características físico-químicas dos lipossomas convencionais PC:CH 3:1 e flexíveis PC:NaC 4:1, hidratados com 0,1% de poloxamer, com e sem INS, após 24 h do preparo.....	66
Tabela 7 – Características físico-químicas dos lipossomas PC:NaC em função do tempo de homogeneização em HAP.....	67
Tabela 8 – Tamanho e Pdl das dispersões lipossomais antes e após filtração em membrana esterilizante (0,22 μ m).....	68
Tabela 9 – Características físico-químicas das dispersões lipossomais e de INS.....	69
Tabela 10 – Tamanho, medida da dispersão de tamanho (Span) e concentração de partículas nas dispersões lipossomais e de INS em solução de hidratação obtidos por NTA.....	70
Tabela 11 – Recuperação do fármaco (RF,%) e eficiência de encapsulação (EE,% corrigida) obtida pela técnica de filtração e centrifugação em membrana AMICON.....	71
Tabela 12 – Resultados obtidos de tamanho de partícula por MFA.....	74
Tabela 13 – Resultados dos valores de intensidade extrapolada para $q = I(0)$, obtidos a partir do procedimento IFT (Figura 22A e 22C) bem como as massas moleculares (MM) calculadas para cada caso usando-se a Equação XV.....	78
Tabela 14 – Pontuação média (P) atribuída para as formulações testadas quanto aos fenômenos de hiperemia, hemorragia e coagulação observados na CAM por dois pesquisadores diferentes.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
CAM	Membrana Cório-alantóide
CH	Colesterol
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COX	Ciclooxigenase
CV	Coeficiente de Variação
Disp	Dispersão
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOS	Doença do olho seco
DP	Desvio padrão
EE	Eficiência de encapsulação
EGF	Fator de crescimento epidermal
ELISA	Do inglês <i>Enzyme Linked Immuno Sorbert Assay</i>
ER	Erro relativo
FC	Fator de correção
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GL	Glândula lacrimal
GSH	Glutationa
HAP	Homogeneizador de alta pressão
HCE-SV40	Linhagem celular de epitélio de córnea humana imortalizada
HET-CAM	<i>Hen's egg test</i> – Membrana corioalantóide
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IFN	Interferon
IFT	Transformada indireta de Fourier
IGF	Fator de crescimento ligado à insulina
IGFR	Receptor do fator de crescimento ligado à insulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
INS	Insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina

LD	Limite de detecção
Lip	Lipossoma
LPS	Lipopolissacarídeo
LQ	Limite de quantificação
LUV	<i>Large unilamellar vesicles</i>
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MFA	Microscopia de Força Atômica
MLV	<i>Multilamellar vesicles</i>
MM	Massa molecular
MMP	Metaloproteinase de matriz
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
N	Número de pratos
NaC	Colato de sódio
NF- $\kappa\beta$	Fator nuclear $\kappa\beta$
NLR	Receptor do tipo NOD
NTA	Análise de rastreamento de nanopartículas
P	Pontuação média
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina de soja
PdI	Índice de polidispersão
PEO	Polioxietileno
pI	Ponto isoelétrico
PPO	Polioxipropileno
RE	Resolução
RF	Recuperação do fármaco
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SAXS	Espalhamento de raio-X a baixo ângulo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHEM	<i>Supplement hormonal epidermal medium</i>
SUV	<i>Small unilamellar vesicles</i>

TBUT	Tempo de ruptura do filme lacrimal (do inglês <i>tear film break up time</i>)
Tc	Temperatura de transição de fase
TFA	Ácido trifluoroacético
TLR	Receptor do tipo <i>Toll</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UI	Unidade internacional
UV-B	Radiação ultravioleta B
XTT	2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5- [carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazóliohidróxido

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	v
Lista de abreviaturas e siglas.....	vi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 GLOBO OCULAR HUMANO.....	4
2.1.1 Conjuntiva e esclera.....	6
2.1.2 Córnea.....	7
2.1.3 Glândula lacrimal e aparelho lacrimal.....	10
2.1.4 Filme lacrimal.....	12
2.2 SUPERFÍCIE OCULAR.....	16
2.3 DOENÇA DO OLHO SECO (DOS).....	17
2.3.1 Olho seco por deficiência aquosa (Aqueous Deficient Dry Eye – ADDE).....	18
2.3.2 Olho seco evaporativo (Evaporative dry eye – EDE).....	18
2.3.3 Consequências, causas e prevalência da DOS.....	19
2.3.4 Diagnóstico.....	21
2.3.4.1 Hiperosmolaridade e inflamação.....	21
2.3.4.2 Alterações epiteliais.....	23
2.3.5 Tratamento da DOS.....	25
2.4 INSULINA E TRATAMENTO DE DOENÇAS OCULARES.....	26
2.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NANOPARTICULADOS LIPÍDICOS PARA ADMINISTRAÇÃO OCULAR DE FÁRMACOS.....	32
2.5.1 Lipossomas.....	34
3 OBJETIVO.....	39
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4 MÉTODOS.....	40
4.1 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DA INS POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	40

4.2 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE INSULINA POR CLAE.....	40
4.2.1 Avaliação dos parâmetros de <i>System Suitability</i>	41
4.2.2 Seletividade.....	42
4.2.3 Linearidade e intervalo.....	42
4.2.4 Precisão e exatidão.....	42
4.2.5 Sensibilidade.....	43
4.3 PREPARO DOS LIPOSSOMAS.....	43
4.3.1 Preparo dos lipossomas contendo INS.....	45
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS E DA INS.....	46
4.4.1 Determinação do tamanho de partícula.....	46
4.4.1.1 Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	46
4.4.1.2 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).....	46
4.4.2 Determinação do potencial zeta.....	47
4.4.3 Determinação do pH.....	48
4.4.4 Eficiência de encapsulação (EE,%) e recuperação do fármaco (RF,%).....	48
4.4.5 Análises morfológicas.....	49
4.4.5.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	49
4.4.5.2 Microscopia de força atômica (MFA).....	49
4.4.6 Estudo de difração de raios-X a baixo ângulo (SAXS).....	50
4.5 ESTABILIDADE.....	52
4.5.1 Estabilidade física dos lipossomas.....	52
4.5.2 Estabilidade química da INS.....	53
4.6 ENSAIO DE IRRITAÇÃO OCULAR <i>IN VITRO</i> – HET-CAM.....	53
4.7 ESTUDOS <i>IN VITRO</i> EM CULTURA DE CÉLULAS EPITELIAIS DA CórNEA HUMANA (HCE-SV40).....	55
4.7.1 Citotoxicidade das formulações em cultura de células imortalizadas de epitélio de córnea humana (HCE-SV40).....	55
4.7.2 Estímulo das células para produção de mediadores do processo inflamatório.....	56
4.7.2.1 Ensaio de citotoxicidade após estímulo.....	57
4.7.3 Tratamento das células com as formulações desenvolvidas.....	57

4.7.4 Quantificação dos mediadores pró-inflamatórios.....	59
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	60
5 RESULTADOS.....	61
5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA INS POR CLAE.....	61
5.2 PREPARO DOS LIPOSSOMAS.....	64
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS E DA INS.....	68
5.3.1 Caracterização físico-química.....	68
5.3.2 Eficiência de encapsulação (EE,%) e recuperação do fármaco (RF,%).....	71
5.3.3 Análises morfológicas (MET e MFA).....	72
5.3.4 Estudo de difração de raios-X a baixo ângulo (SAXS).....	75
5.4 ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS E DA INS.....	80
5.5 ENSAIO DE IRRITAÇÃO OCULAR <i>IN VITRO</i> – HET-CAM.....	82
5.6 ESTUDOS <i>IN VITRO</i> EM CULTURA DE CÉLULAS EPITELIAIS DA CÓRNEA HUMANA.....	84
5.6.1 Citotoxicidade das formulações.....	84
5.6.2 Estímulo das células para produção de mediadores do processo inflamatório.....	85
5.6.3 Tratamento das células com as formulações desenvolvidas.....	87
6 DISCUSSÃO.....	91
6.1 QUANTIFICAÇÃO DA INS.....	91
6.2. PREPARO DOS LIPOSSOMAS.....	93
6.3 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS E DA INS.....	96
6.4 ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS E DA INS.....	105
6.5 ENSAIO DE IRRITAÇÃO OCULAR <i>IN VITRO</i> – HET-CAM.....	107
6.6 ESTUDOS <i>IN VITRO</i> EM CULTURA DE CÉLULAS EPITELIAIS DA CÓRNEA HUMANA.....	108
7 CONCLUSÕES.....	116
REFERÊNCIAS.....	117

1 INTRODUÇÃO

A doença do olho seco (DOS), também denominada síndrome do olho seco, ou ainda *Keratoconjuntivitis sicca*, é uma doença multifatorial que afeta a integridade do filme lacrimal, estando associada a um processo inflamatório crônico na superfície ocular (COURSEY et al., 2015). Sintomas como desconforto e irritação, visão distorcida ou embaçada, sensibilidade à luz, dor e fadiga ocular são comuns em pacientes portadores da doença, a qual chega a afetar de 5 a 30% da população, tendo maior prevalência em pessoas acima de 65 anos (DRY EYE WORKSHOP, 2007; DING; SULLIVAN, 2012; COURSEY et al., 2015; AZIZI et al., 2016; CWIKLIK, 2016; LANZA et al., 2016).

De papel fundamental na homeostase da superfície ocular, o filme lacrimal fornece umidade, nutrientes e oxigênio para estruturas oculares como a córnea. De maneira geral, qualquer alteração no volume, composição, distribuição ou *clearance* lacrimal, leva à instabilidade na lágrima e à instalação da DOS, que induz a perda da integridade ocular (FUJI et al., 2013; CWIKLIK, 2016). Sendo considerada multifatorial, a DOS pode estar relacionada a doenças autoimunes, como Síndrome de *Sjögren* e *diabetes mellitus*, disfunções hormonais e até mesmo ao envelhecimento (DING; SULLIVAN, 2012; COLLIGRIS et al., 2014; CWIKLIK, 2016; SHEN; MA, 2016). Embora seja bastante prevalente na população, o tratamento para a doença ainda é realizado de forma paliativa. As chamadas “lágrimas artificiais”, colírios compostos por soluções iso ou hipotônicas são ainda o tratamento convencional. Embora aliviem os sintomas mais incômodos, colírios lubrificantes envolvem alta frequência de instilação e nenhuma eficácia clínica no controle da doença.

Fármacos anti-inflamatórios, como corticoesteróides, são amplamente utilizados via tópica para tratar as condições inflamatórias envolvidas na DOS severa. O uso desses fármacos pode inibir os vários mediadores envolvidos na fisiopatologia da doença e reduzir alguns sintomas presentes na doença. Porém, esse tipo de terapia traz inúmeros efeitos adversos, como por exemplo, o aumento da pressão intraocular e formação de catarata no segmento posterior, restringindo seu uso para casos mais severos e por pouco tempo (ERDINEST et al., 2014; NAKAMURA et al., 2015). Nos EUA, o uso de ciclosporina incorporada em uma nanoemulsão (Restasis®), foi recentemente aprovado pelo FDA para tratamento tópico da DOS. Porém, por possuir efeito imunossupressor, a sua absorção sistêmica traz riscos à

saúde, além de aumentar a susceptibilidade a infecções oculares (LAIBOVITZ et al., 1993). Sendo assim, uma nova terapia que pudesse combinar efeitos secretagogos a efeitos protetores na GL e superfície ocular seria uma alternativa promissora para os pacientes portadores de DOS.

Neste contexto, estudos recentes sugerem que a insulina (INS), o hormônio anabólico envolvido no metabolismo da glicose, tem efeitos secretagogos em glândula lacrimal (GL) de animais experimentais, protetor contra danos oxidativos em estruturas oculares (MODULO et al., 2009), além de auxiliar no processo de cicatrização de feridas de córnea, tanto em animais (BARTLETT et al., 1994; ROCHA et al., 2002; CUNHA et al., 2005; ZAGON et al., 2007; ALVES et al., 2008; YU et al., 2010), quanto em humanos (BASTION; LING, 2013). Apesar de não ter seu mecanismo elucidado nessas estruturas oculares, a INS possui receptores descritos em glândulas lacrimais, tecidos neurais e vasculares da retina, incluindo epitélio de córnea e conjuntiva (IM et al., 1986; ROCHA et al., 2002; MODULO et al., 2009; YU et al., 2010).

Sendo assim, considerando a relevância e a incidência cada vez mais crescente da DOS, e ainda a falta de estudos concretos a respeito de novas terapias para o tratamento desta desordem, estudos com formulações inovadoras contendo INS tornam-se promissores. A administração por via tópica dessas formulações é naturalmente preferida, mas apresenta desvantagens, como o rápido *clearance* lacrimal e o baixo tempo de residência na superfície ocular que resultam em baixa biodisponibilidade de fármacos, principalmente de macromoléculas (COURSEY et al., 2015; REIMONDEZ-TROITIÑO et al., 2015). Contudo, com o avanço da nanotecnologia, surge a possibilidade de incorporação de fármacos peptídicos em sistemas de liberação nanoparticulados, aumentando sua biodisponibilidade e diminuindo a frequência de instilação destas formulações.

Neste contexto, os lipossomas são uma estratégia conveniente para a liberação de fármacos na região anterior ocular. Lipossomas são vesículas pequenas, de formato esférico, variando de 30 nm até alguns micrômetros, formadas, em sua maioria, pela associação de fosfolípidos biocompatíveis e colesterol (ALLEN; CULLIS, 2013). Quando hidratados em soluções aquosas, os fosfolípidos formam estruturas vesiculares que consistem em uma ou mais bicamadas lipídicas fechadas em torno de um núcleo aquoso, semelhantes às membranas celulares (AKBARZADEH et al., 2013). Por serem sistemas formados por fosfolípidos

biocompatíveis e biodegradáveis, podem ocorrer interações entre as vesículas lipossomais e os lipídeos presentes na membrana celular epitelial e na camada lipídica do filme lacrimal. Essas interações podem levar a um aumento do tempo de residência da formulação na superfície da córnea, possibilitando a liberação direcionada da INS para os receptores aí presentes, aumentando sua biodisponibilidade local (NIU et al., 2011; HU et al., 2013; HOF AUER et al., 2013; CUI et al., 2015; ELNAGGAR, 2015). Do mesmo modo, a formulação lipídica pode favorecer a lubrificação da superfície ocular, formando uma camada de proteção contra a evaporação do fluido lacrimal (SOUZA et. al., 2013; FANGUEIRO et. al., 2014; SEVERINO, et. al., 2014; FANGUEIRO et. al., 2015).

Logo, uma formulação que seja capaz de associar nanodispersões lipossomais à INS demonstra ser uma estratégia inovadora e promissora para a terapia da DOS, podendo trazer além do alívio aos sintomas, restauração da homeostase da superfície ocular, aumentando, sobretudo a qualidade de vida dos pacientes.

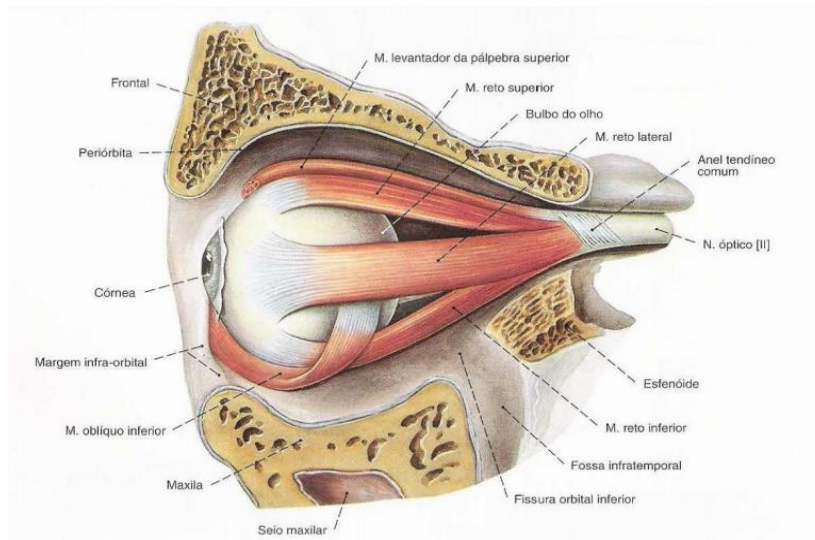
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. GLOBO OCULAR HUMANO

O olho humano é um dos órgãos mais complexos e resistentes do nosso organismo. Ele é o responsável por conter as estruturas capazes de receber o sinal de luz, os fótons, convertê-los em sinais elétricos, e processar a informação nas membranas neurais da retina, sendo esta transformada em uma imagem perceptível pelo córtex cerebral (GEORGIEV, 2011; GRIFFITHS e SCHIESSER, 2016).

O globo ocular está alojado em uma cavidade óssea chamada de órbita ocular, a qual é formada pelos ossos nasais, arco zigomático, fossa temporal, *sinus cavernosos*, *sinus frontais*, *sinus maxilar* e lobo frontal. Outras estruturas também estão presentes, como músculos, tecido adiposo, vasos sanguíneos, nervos e anexos oculares, como o aparelho lacrimal (Figura 1) (SMERDON, 2000; SOBOTTA, 2000).

Figura 1. Anatomia do globo ocular, estrutura e anexos.



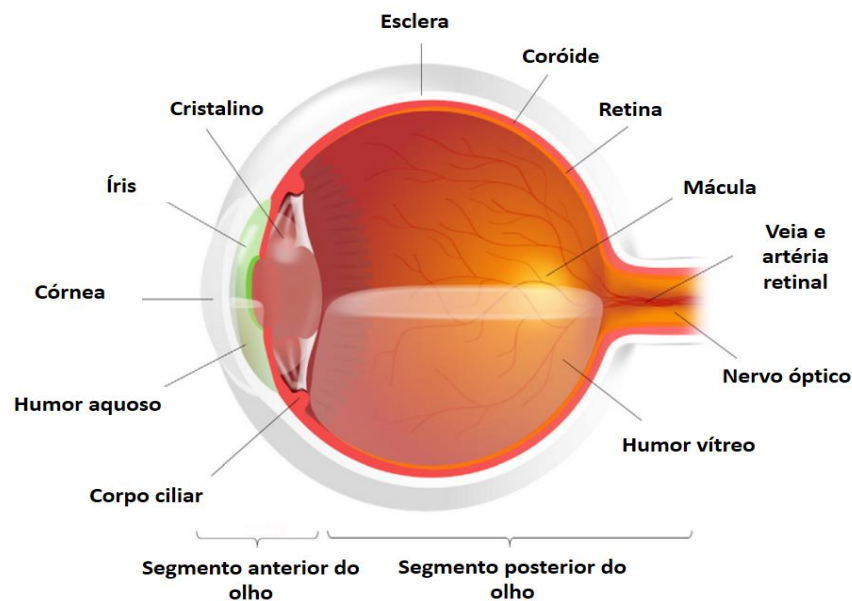
Fonte: Sobotta, 2000.

A posição do globo ocular dentro da órbita é bastante variável, ocupando um terço ou menos do volume total da cavidade. Seu tamanho aproximado é de 24 mm de diâmetro anteroposterior (variando entre 17-33 mm) e 13 mm de largura (SMERDON, 2000; SOBOTTA, 2000).

Considerado um órgão isolado imunologicamente do corpo humano, o globo ocular é uma estrutura esférica que pode ser dividida didaticamente em dois

segmentos: anterior e posterior (Figura 2), porém internamente, ele é dividido em três compartimentos: câmara anterior (entre a córnea e a íris), câmara posterior (entre a íris, corpo ciliar e cristalino) e a câmara vítrea (entre o cristalino e a retina) (SMERDON, 2000; ATCHISON; SMITH; SMITH, 2000; DELPLACE; PAYNE; SHOICHET, 2015; SANCHEZ LOPES et al., 2017).

Figura 2. Anatomia do olho humano: segmento anterior e segmento posterior.



O segmento anterior consiste na conjuntiva, esclera, córnea, íris, lentes cristalinas (cristalino), corpo ciliar e as câmaras anterior e posterior, as quais são preenchidas pelo humor aquoso. Já o segmento posterior envolve estruturas como a coróide, o epitélio pigmentado da retina e a retina propriamente dita. A câmara vítrea também faz parte do segmento anterior, sendo preenchida pelo humor vítreo.

Fonte: Adaptado de DELPLACE; PAYNE; SHOICHET, 2015.

O globo ocular apresenta uma pressão interna maior que a atmosférica, que varia entre 10 e 21 mmHG, que mantém o formato da córnea e a transparência do meio intraocular. Produzido pelo corpo ciliar, o humor aquoso é o responsável por manter essa pressão intraocular constante, por meio do seu fluxo contínuo dentro das câmaras anterior e posterior (equilíbrio entre produção e drenagem) (ATCHISON; SMITH; SMITH, 2000; WILLOUGHBY et al., 2010). Por ser basicamente um ultrafiltrado sanguíneo, o humor aquoso também é o responsável por fornecer oxigênio e nutrientes ao cristalino e à córnea (MACRI e CEVARIO, 1975; JARVINEN; JARVINEN; URTTI, 1995).

O olho humano possui duas barreiras hemato-oculares de fundamental importância para a proteção contra a entrada de moléculas da circulação sistêmica: barreira hemato-aquosa (BAB) e barreira hemato-retinal (BRB), localizadas nos segmentos anterior e posterior, respectivamente (KIM et al., 2014).

Ambos os segmentos podem ser afetados por doenças que impactam na visão e qualidade de vida do paciente. Glaucoma, conjuntivite, blefarite, ceratite, uveíte, DOS e catarata são algumas das doenças mais frequentes que afetam o segmento anterior, enquanto que retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade (AMD) estão relacionadas ao segmento posterior (DELPLACE; PAYNE; SHOICHET, 2015; REIMONDEZ-TROITIÑO et al., 2015; FANGUEIRO et al., 2016).

2.1.1 Conjuntiva e esclera

A esclera é uma estrutura densa, esbranquiçada e opaca, com uma área de superfície total de 6,3 cm² e espessura variando de 0,39 mm a 1 mm, responsável por proteger o globo ocular e manter sua forma (McCAA et al., 1982). Formada por tecido conectivo fibroso, ela é constituída principalmente por fibras de colágeno e elastina, sendo recoberta por uma membrana mucosa chamada conjuntiva (ATCHISON; SMITH; SMITH, 2000; EL SANHARAWI et al., 2010; SANCHEZ LOPES et al., 2017).

Além da sua função de proteção, a esclera auxilia na manutenção da pressão intraocular e serve como local de fixação dos músculos extraoculares (MALHOTRA et al., 2011). A região de transição entre a esclera e a córnea é denominada *limbus*, sendo esta uma região rica em células pluripotentes, com alta capacidade de autorrenovação, ciclo celular lento e alto potencial de proliferação celular (KIM et al., 2004)

Já a conjuntiva, membrana que recobre 80% da superfície ocular, é um tecido altamente vascularizado, composto por duas camadas, epitélio estratificado e estroma, e grande área de superfície (de 16 a 18 cm²) (SANCHEZ LOPES et al., 2017). Ela recobre toda a superfície da esclera anterior até as pálpebras inferior e superior. Sendo responsável por secretar eletrólitos e mucina, através das células caliciformes ou de Goblet, a conjuntiva exerce um papel fundamental na formação do filme lacrimal (CHOLKAR et al., 2013).

Suas células epiteliais são conectadas por *tight junctions* semelhantes à córnea, que formam a *zonula adherens*, e impedem a penetração de moléculas pela

via paracelular. Em comparação à córnea, a conjuntiva possui uma permeabilidade maior à substâncias, principalmente àquelas que possuem tamanho molecular reduzido (entre 20 kDa e 40 kDa) e caráter hidrofílico (JÄRVINEN; JÄRVINEN; URTTI, 1995; BENEDETTI et al., 2009).

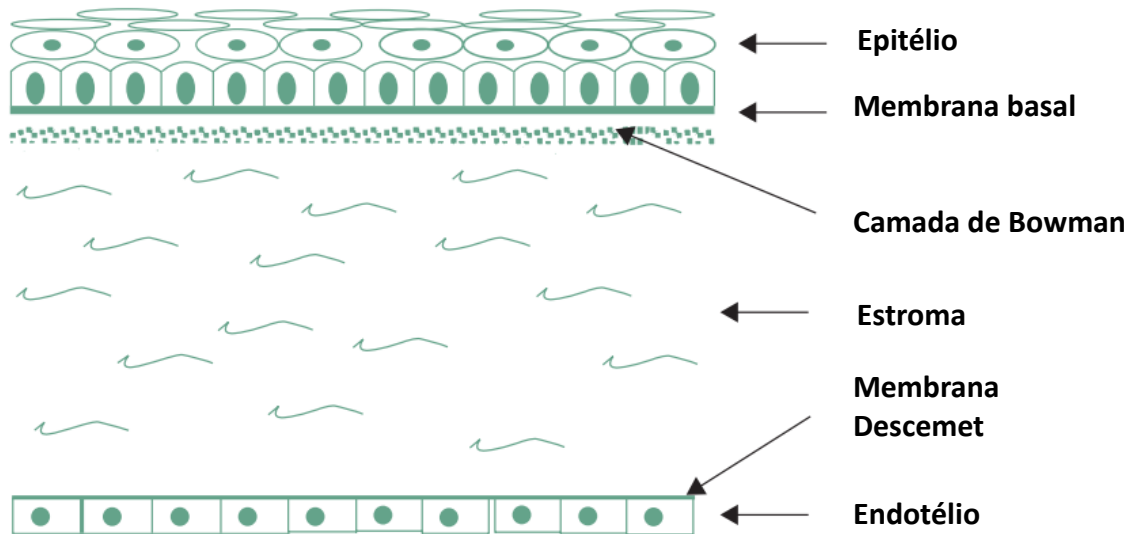
2.1.2 Córnea

A córnea é a principal estrutura refrativa do globo ocular. Correspondendo a 2/3 de todo o poder refrativo do nosso sistema visual, ela fica localizada na parte mais anterior do globo ocular (Figura 2) e é responsável por refratar e transmitir o feixe de luz incidente ao cristalino e à retina (GRIFFITHS e SCHIESSER, 2016; VÈREB et al., 2016). Em função disso, a córnea é uma estrutura transparente, avascular e com uma curvatura ideal que permanece praticamente constante durante toda a vida, tornando-a capaz de refratar a luz e manter a integridade física do olho humano. É uma estrutura altamente innervada com nervos sensoriais derivados, os quais são provenientes do ramo oftálmico do nervo do trigêmeo (WILLOUGHBY et al., 2010). Em um ser humano adulto, ela possui dimensões variando entre 11,5 mm e 10,5 mm de diâmetro médio horizontal e vertical, respectivamente, e um raio de curvatura aproximado de 8 mm (ATCHISON; SMITH; SMITH, 2000; WILLOUGHBY et al., 2010).

Além da sua função óptica, a córnea também age na proteção das estruturas intraoculares, como a íris e a pupila, contra agentes externos e danos mecânicos (WILLOUGHBY et al., 2010). Para auxiliar nessa função, o epitélio corneano é recoberto pelo filme lacrimal, que é responsável por protegê-la e nutri-la, fornecendo oxigênio e nutrientes à córnea.

Sua estrutura é dividida em três camadas (Figura 3): epitélio, em contato com o ambiente externo; estroma, camada intermediária; e endotélio, a camada mais interna. As três camadas são separadas entre si por duas membranas: a membrana de Bowman e a de Descemet (COLLINS; TRABOULSI; MAUMENEE; 2014).

Figura 3. Representação esquemática das diferentes camadas da córnea.



Fonte: Adaptado de WILLOUGHBY et al., 2010.

O epitélio da córnea possui uma espessura que varia entre 40 a 50 μm , sendo a principal barreira física da córnea, possuindo a principal função de proteção contra agentes externos e outras substâncias, incluindo fármacos (NAGATA et al., 2015; GAUSE et al., 2016). Formado por uma única camada de células basais, seguido de 4 a 5 camadas de células epiteliais escamosas estratificadas, o epitélio é não queratinizado, sendo suas células também denominadas de “*wing cells*” por possuírem formato de asas (Figura 4) (WILLOUGHBY et al., 2010).

Figura 4. Morfologia típica de Cultura de Epitélio de Córnea Humana (HCE).

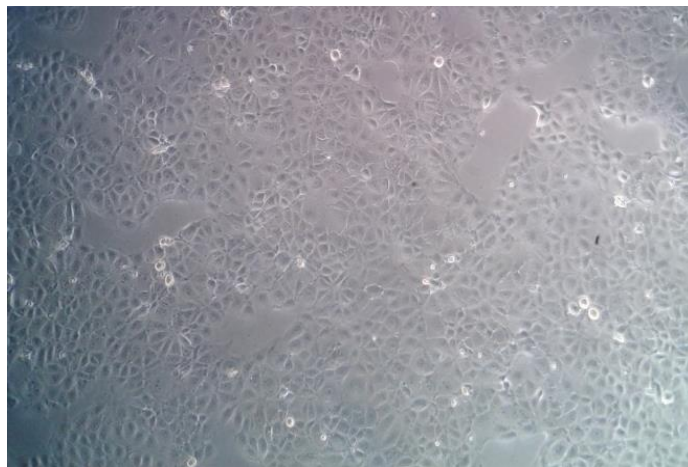


Imagem obtida por microscópio óptico, aumento de 20 x.
Fonte: autoria própria.

Assim como células epiteliais da conjuntiva, as células do epitélio da córnea são mantidas unidas por *tight junctions* (*zonula occludens*) que formam uma efetiva barreira contra a perda de água e entrada de patógenos, além de limitar a permeação de moléculas hidrofílicas pela córnea. Moléculas pequenas e lipofílicas são mais propensas à permeação pelo epitélio, uma vez que podem se difundir pela via transcelular, onde a lipofilicidade e pKa são determinantes para a difusão através das bicamadas lipídicas das membranas celulares (GAUSE et al., 2016; SANCHEZ LOPEZ et al., 2017).

O *limbus*, região de transição corneoescleral, é um reservatório de células pluripotentes renovando e regenerando constantemente o epitélio corneano (NAGATA et al., 2015). Essa região possui células com ciclo celular lento e um alto potencial de crescimento celular, não expressando marcadores de diferenciação celular (MYASHITA et al., 2017). Essa alta taxa de renovação celular, aproximadamente a cada 7 a 10 dias (WILLOUGHBY et al., 2010) é essencial para a manutenção da integridade visual, uma vez que qualquer opacidade ou dano na estrutura da córnea, causada por lesões ou infecções, pode levar a formação de tecido de cicatrização, que por sua vez induz a perda de visão (VÈREB et al., 2016).

A camada intermediária da córnea, por sua vez, o estroma, é uma camada hidrofílica formada por fibras de colágeno, que conferem um alto conteúdo aquoso (cerca de 80%), limitante para permeação de moléculas lipofílicas. Com espessura variando entre 450 a 500 μm , o estroma é responsável por 90% da espessura total da córnea e é responsável principalmente pela manutenção de sua estrutura (VÈREB et al., 2016). Os queratinócitos presentes na região do estroma secretam colágeno e proteoglicanas, fundamentais para a manutenção do estado de hidratação e transparência da córnea. A membrana de Bowman, uma área acelular de 10-15 μm , é a estrutura que separa o estroma do epitélio da córnea (WILLOUGHBY et al., 2010).

Já o endotélio da córnea é formado por uma camada única de células, com espessura aproximada de 13 μm , sendo responsável por manter uma barreira entre o estroma e o humor aquoso (GAUSE et al., 2016; SANCHEZ LOPEZ et al., 2017). A membrana de Descemet é uma estrutura elástica que separa o endotélio do estroma, ficando mais espessa com o processo de envelhecimento (WILLOUGHBY et al., 2010).

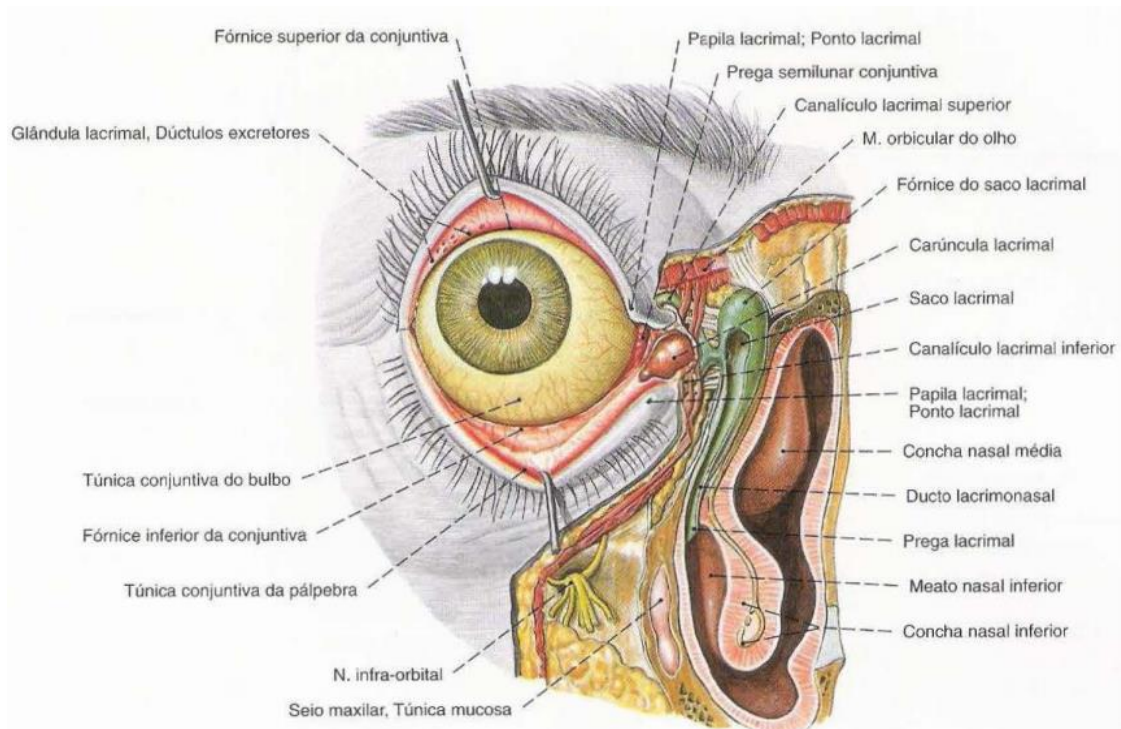
Estudos indicam que a homeostase do epitélio da córnea depende de três fatores igualmente: perda de células da superfície, proliferação das células basais do epitélio e o movimento centrípeto das células a partir da periferia. Estudos recentes

demonstram que o crescimento e desenvolvimento normal da estrutura corneana está relacionada a hormônios e fatores de crescimento, como a INS e o EGF (THOFT e FRIEND, 1977; BARABINO et al., 2012; SONG et al., 2016).

2.1.3 Glândula lacrimal e aparelho lacrimal

O aparelho lacrimal consiste nas glândulas lacrimais (GL) principal e acessória, no saco lacrimal, ductos e canaliculos lacrimais, incluindo o canal e o ducto nasolacrimais (SOBOTTA, 2000) (Figura 5).

Figura 5. Anatomia do aparelho lacrimal humano.



Fonte: SOBOTTA, 2000.

A GL principal é uma glândula exócrina, como a glândula mamária e salivar, possuindo formato piramidal, tubuloacinar. Ela é responsável por produzir e secretar a porção aquosa do filme lacrimal, além de proteínas e eletrólitos, como a lacritina, lactoferrina, lisozima e lipocalina além de sais inorgânicos, ureia e glicose (LUDWIG, 2005; MAKARENKOVA e DARTT; 2015).

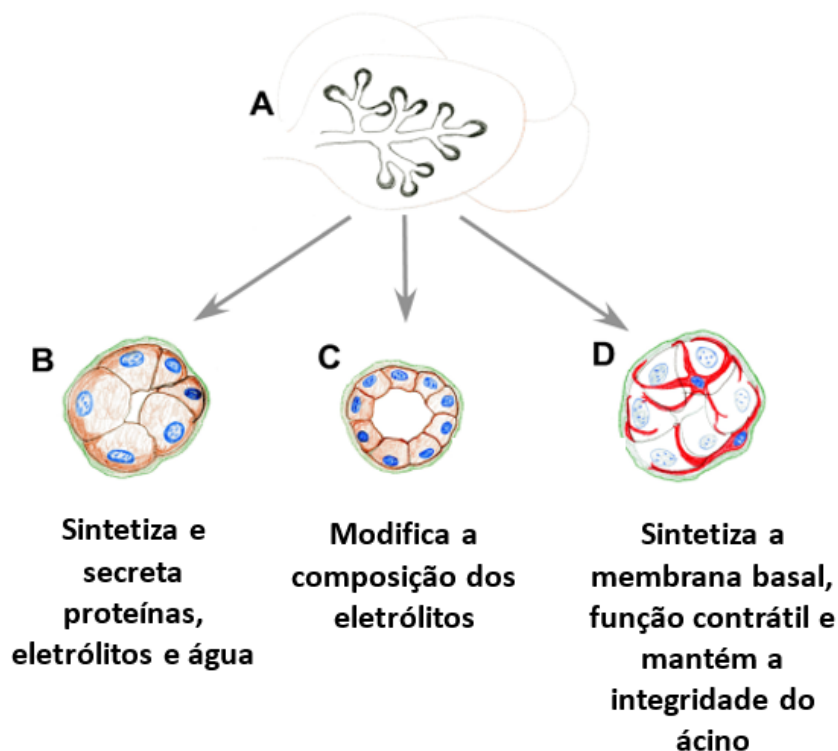
A GL principal possui tamanho aproximado de 20 x 25 mm e se divide em dois lóbulos: palpebral e orbital, com espessura variando de 3 a 5 mm, respectivamente.

Os lóbulos se conectam entre si por tecido conjuntivo e são constituídos por inúmeras unidades secretoras denominadas ácinos (OBATA, 2006). Cada ácino possui em seu centro um lúmen, sendo que vários ácinos convergem para os ductos intra e interlobulares, dando origem aos ductos excretores (MALKI, 2012).

As glândulas acessórias são divididas em dois grupos anatômicos: glândulas de Krause e glândulas de Wolfring. Essas, por sua vez, são glândulas pequenas e estão localizadas na lâmina própria da conjuntiva, onde secretam o filme lacrimal (OBATA, 2006).

O epitélio da GL é composto por três tipos celulares: ductais, acinares e mioepiteliais, os quais fazem fronteira com a lâmina basal e a matriz extracelular. (MAKARENKOVA e DARTT, 2015) (Figura 6).

Figura 6. Tipos de células do epitélio de GL.



Epitélio de GL é composto por três tipos celulares (A) acinar; (B) ductal; (C) mioepitelial. Fonte: Adaptado de MAKARENKOVA e DARTT, 2015.

As células acinares possuem formato piramidal, apresentam polaridade e são responsáveis por secretar o fluido lacrimal primário, enquanto que as células ductais modificam a composição de eletrólitos desse fluido. Já as células mioepiteliais circundam o tecido epitelial secretório e possuem miofilamentos de músculo liso, como a α -actina e a citoqueratina, o que as tornam flexíveis e com alta capacidade contrátil.

Esses filamentos atuam na propulsão da secreção e modulam a função secretória da GL. De maneira geral, as células mioepiteliais têm importância fundamental na homeostase e manutenção da estrutura e polaridade das células acinares (MAKARENKOVA e DARTT, 2015)

A produção do filme lacrimal pela GL ocorre de três formas distintas: pela secreção basal, que é necessária para manutenção da lubrificação natural da superfície ocular, mantendo sua integridade óptica; pela secreção reflexa, resultante de estímulo externo seja ele químico, físico ou mecânico (como por exemplo luz ou temperatura); e pela secreção emocional (LUDWIG, 2005). A produção basal de fluido lacrimal é de aproximadamente 1,2 $\mu\text{L}/\text{min}$ (variando entre 0,5 e 2,2 $\mu\text{L}/\text{min}$), que resulta em uma taxa de retorno de 16%/min (MISHIMA et al., 1966).

Após ser produzido e secretado pelos ductos excretórios, o filme lacrimal é recolhido através de canaliculos e chega até o saco lacrimal, que é conectado ao ducto nasolacrimal, onde o fluido lacrimal é drenado até o meato nasal inferior (SOBOTTA, 2000).

A GL recebe inervação parassimpática e simpática, sendo que neurotransmissores e hormônios estão intimamente relacionados com o crescimento, metabolismo e manutenção das funções normais da glândula, incluindo a secreção de eletrólitos e proteínas pelas células ductais. Fatores de crescimento, como EGF (Van Setten, 1994), são responsáveis por controlar a morfogênese e diferenciação celular da GL, enquanto estudos comprovam que a lacritina tem efeito autócrino no estímulo da produção de lágrimas (FUJI et al., 2013; WANG et al., 2015). Além deles, sabe-se que a INS, objeto de estudo deste trabalho, também possui um papel fundamental na homeostase das GL (ROCHA et al., 2000; MODULO et al., 2009; MALKI, 2012) o qual será detalhado no item 2.4.

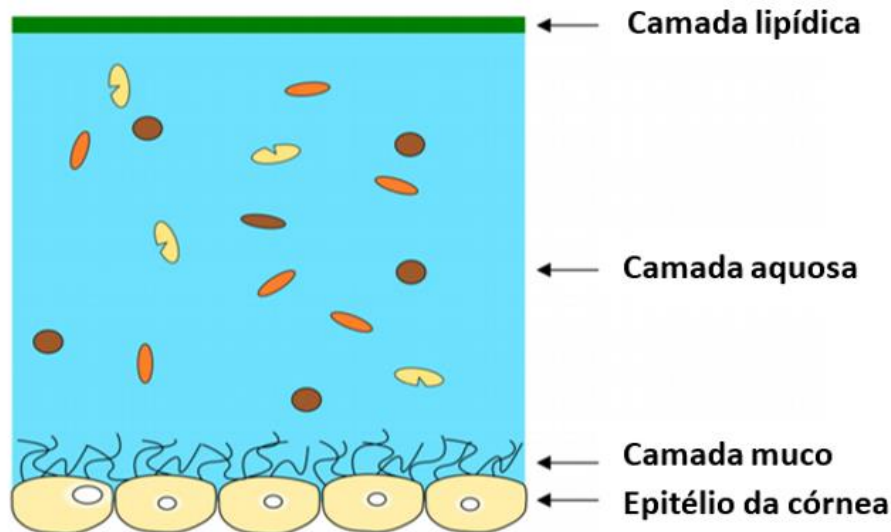
2.1.4 Filme lacrimal

O fluido lacrimal é uma camada fina (3 – 10 μm de espessura) (LUDWIG, 2005) formada por um fluido aquoso que recobre toda a superfície ocular, responsável por manter a umidade e uma superfície ótima para a refração da luz. De volume de residência aproximado de 10 μL (ROBINSON, 1993 KING-SMITH et al., 2000; STEVENSON; PUGAZHENDHI; WANG, 2016), o filme lacrimal distribui-se por toda a superfície ocular, com auxílio das pálpebras e do movimento de piscar. O reflexo de

pisca estimula a produção do filme lacrimal, a liberação de lipídeos pelas glândulas de meibômio e reabastece o filme a partir do menisco inferior (STEVENSON; PUGAZHENDHI; WANG, 2016).

Trata-se de uma unidade complexa não homogênea que pode ser subdividida didaticamente em três camadas: camada lipídica externa, camada aquosa intermediária e uma camada interna de mucina, a qual interage com a superfície do epitélio de córnea e conjuntiva (WOLF, 1954; MCCULLEY; SHINE, 1997; LUDWIG 2005; CHOLKAR et al., 2013) (Figura 7). Entretanto, a camada intermediária e a camada de muco não são claramente delimitadas, uma vez que ambas possuem caráter hidrofílico interagindo entre si, o que traz controversas ao meio científico com relação a sua subdivisão em três camadas (PRYDAL et al., 1992; CHEN et al., 1998).

Figura 7. Representação esquemática da estrutura do filme lacrimal.



Fonte: CWIKLIK, 2016.

Camada lipídica externa:

A camada mais externa do filme lacrimal (em interface com ar) é basicamente formada por lipídeos de baixo ponto de fusão (19-32°C), que permanecem em estado fluido à temperatura corporal (TIFFANY; DART, 1981), sendo ésteres de ceras e esteróis, triglicerídeos e fosfolipídeos os mais frequentes (LUDWIG, 2005) (Quadro 1). Essa camada é excretada pelas glândulas de meibômio e em menor porcentagem, pela glândula de Zeis (STEVENSON; PUGAZHENDHI; WANG, 2016). De espessura

variando entre 15 a 160 nm (LUDWIG, 2005; FONSECA; ARRUDA; ROCHA, 2010; KING-SMITH; HINE; NICHOLS, 2010), a principal função da camada lipídica é proteger o filme lacrimal, retardando sua evaporação e reduzindo a tensão superficial do filme, estabilizando-o na superfície da córnea (FONSECA et al., 2010). A presença de lipídeos polares é essencial para manutenção da estabilidade estrutural da camada como um todo (CWIKLIK, 2016).

As glândulas de meibômio são glândulas túbulo-acinares holócrinas, presentes nas placas tarsais das pálpebras superior (30-40%) e inferior (20-30%). Cada glândula consiste em um ducto principal, formado por um aglomerado de células acinares, que secretam seu conteúdo na margem palpebral durante o movimento de piscar (FOULKES, 2007).

Quadro 1 – Lipídeos presentes no filme lacrimal

Lipídeos apolares (MILLAR; SCHUETT, 2015)	Lipídeos polares (RANTAMAKI, 2011)
30-45 mol% esters de colesterol (CE) com grandes cadeias acilas (C22:1 – C34:1)	> 60 mol% fosfatidilcolinas (PC)
30 – 50 mol% ésteres de cera	15% fosfatidiletanolaminas (PE)
Ácidos graxos C18:1 misturados com alcoóis de cadeia longa C18-C30	<5% ceramidas e esfingomielinas
4 mol% (O-acyl)-u-hydroxy fatty acids (OAHFAs)	

Fonte: Adaptado de RANTAMAKI, 2011; MILLAR, SCHUETT, 2015

Camada aquosa intermediária:

A camada aquosa é secretada pelas GLs principal e acessórias, constituindo 99,78% do total do volume do filme lacrimal (WALLCOTT, 1998). Uma parte da camada aquosa secretada permanece no menisco até sua eliminação pelo meato inferior nasal, enquanto outra é distribuída pela superfície ocular para formar o filme lacrimal (SANCHEZ LOPES et al., 2017).

Água, eletrólitos (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^-), solutos, peptídeos e proteínas, como albumina e lisozima, além de outras substâncias como ácido ascórbico, ureia, retinol, imunoglobulinas e glicoproteínas formam a camada aquosa (LUDWIG, 2005). De espessura aproximada de 4 μm (KING-SMITH, 2004), tem como funções facilitar a oxigenação, nutrição e regulação de eletrólitos do epitélio da córnea e da conjuntiva, e principalmente, proporcionar uma superfície regular para refração da luz (CWIKLIK, 2016). Lipocalina (DATT, 2011) e lisozima (WIESNER; VILCINSKAS, 2010) demonstram ser as proteínas mais abundantes da camada aquosa, que conferem ao filme lacrimal atividade antimicrobiana (KIJLSTRA, KUIZENGA, 1994).

Camada de muco interna:

O principal componente da camada interna do filme lacrimal é a mucina, uma glicoproteína de alta massa molecular que se apresenta carregada negativamente em pH fisiológico. Além da sua presença, outras glicoproteínas, proteínas, eletrólitos, enzimas e mucopolissacarídeos também fazem parte de sua constituição, que está intimamente associada ao epitélio da superfície ocular (LUDWIG, 2005).

Sua espessura varia entre 2,5 e 5 μm e ela exibe um comportamento reológico semelhante a um gel, o que auxilia na adesão, estabilização e distribuição do filme lacrimal por toda a superfície epitelial, além de proteger o globo ocular da entrada de partículas e microrganismos (LUDWIG, 2005; STEVENSON; PUGAZHENDHI; WANG, 2016).

A camada de mucina é produzida, principalmente, pelas células caliciformes da conjuntiva. Em menor grau, a mucina também é excretada pelo epitélio de conjuntiva e da córnea, além das GLs acessórias (HARTLEY; WILLIAMS; ADAMS, 2006). De maneira geral, essa camada é responsável por ancorar e manter a coesão entre o filme lacrimal hidrofílico e a superfície do epitélio da córnea e da conjuntiva, que são hidrofóbicos (DAVIDSON; KUONEN, 2004).

As células caliciformes estão presentes na conjuntiva em número aproximado a 1,5 milhões. Elas são responsáveis por sintetizar e secretar um volume de 2 a 3 μL por dia de mucinas, como a MUC5AC, sialomucinas ou sulfomucinas, e peptídeos, como TFF-peptídeos ou peptídeos formadores de domínio-P (HENRIKSSON et al., 2015).

O pH do fluido lacrimal é fisiológico, por volta de 7,4 e sua osmolaridade varia entre 310 a 350 mOsm/kg. Íons HCO_3^- , proteínas e mucina conferem ao filme lacrimal uma capacidade tamponante, fazendo com que as variações de pH durante o dia sejam corrigidas (BAYENS; GURNY, 1997). A viscosidade do fluido é de 3 mPa.s, que apresenta comportamento reológico não-Newtoniano, com uma tensão de superfície próxima a 44 mN/m, a qual pode sofrer variação dependendo de sua composição (PANDIT et al., 1999).

Apesar de ser formado por três camadas diferentes, o filme lacrimal é um fluido coeso e age como uma unidade que lubrifica e mantém a superfície ocular regular para que os fenômenos ópticos possam ocorrer. Além dessas funções, ele também previne a superfície ocular da desidratação, protegendo-a contra patógenos e partículas externas e nutre as células da córnea (ZHOU; BEUERMAN, 2012; CWIKLIK, 2016).

2.2 SUPERFÍCIE OCULAR

O termo “superfície ocular” foi primeiramente introduzido em 1977 por Thoft e Friend, que descreveram a importância do filme lacrimal e dos epitélios de conjuntiva e da córnea como uma unidade fundamental para manutenção da função visual (THOFT e FRIEND, 1977). Dentro deste contexto, outro termo surgiu, identificado como Unidade Funcional Lacrimal (UFL), o qual consiste em um sistema integrado do qual fazem parte as glândulas lacrimais (GL), a superfície ocular (córnea, conjuntiva e glândulas de meibômio), as pálpebras e os nervos sensoriais e motores. A UFL, particularmente o eixo glândula lacrimal-córnea, é responsável pela manutenção da homeostase da superfície ocular por meio do filme lacrimal, conferindo proteção e lubrificação à superfície ocular e um ambiente adequado para renovação epitelial celular (FONSECA; ARRUDA; ROCHA, 2010). Enquanto a córnea tem a função refrativa e de barreira de proteção das estruturas intraoculares, a GL tem seu papel fundamentado na excreção do fluido lacrimal, de proteínas e eletrólitos, que são de suma importância para nutrição, atividade antibacteriana e sustentação da função corneal (WANG et al., 2015). Qualquer desequilíbrio em sua unidade, seja por déficit quantitativo ou qualitativo, pode levar a DOS, que acomete toda a superfície ocular.

2.3 DOENÇA DO OLHO SECO (DOS)

Primeiramente proposto por Schirmer em 1903, o conceito de olho seco ficou por anos restrito ao conceito de *déficit* na produção de lágrimas ou instabilidade do filme lacrimal (TSUBOTA et al., 2017). Somente em 2007 foi estabelecido uma definição consensual no Primeiro *Workshop* Internacional do Olho Seco (em inglês: *International Dry Eye WorkShop*), realizado pela Sociedade do Filme Lacrimal e Superfície Ocular (do inglês *Tear Film and Ocular Surface Society* - TFOS) a qual ampliou seu conceito:

Olho seco é uma doença multifatorial que afeta as lágrimas e a superfície ocular, a qual resulta em sintomas como desconforto, distúrbios visuais e instabilidade do filme lacrimal, com potenciais danos à superfície ocular. Ela é acompanhada por um aumento na osmolaridade do filme lacrimal e inflamação na superfície ocular (DRY EYE WORKSHOP, 2007)

Sendo assim, sabe-se hoje que a DOS é resultado de um desequilíbrio na Unidade Funcional da Lágrima (UFL), sendo que qualquer alteração no volume, composição, produção ou *clearance* do filme lacrimal, pode levar a uma perda de sua estabilidade e da integridade da superfície ocular (STERN et al., 1998; LIANG 2016). Normalmente a doença inicia-se após estímulo ambiental em indivíduos susceptíveis, que leva, em um segundo momento, à instabilidade do filme lacrimal (FONSECA; ARRUDA; ROCHA, 2010). A desordem segue perpetuando-se com alterações no epitélio da córnea e conjuntiva, desbalanço de eletrólitos, proteínas e do muco (mucinas), dano permanente à superfície epitelial da córnea e conjuntiva, além das fibras nervosas presentes na córnea (BAUDOIN et al., 2013), via instalação de um processo inflamatório crônico (FONSECA; ARRUDA; ROCHA, 2010; WEI e ASBELL, 2014).

Os sintomas da DOS podem ser classificados como leves, que englobam visão distorcida, embaçada, desconforto visual, sensação de presença de corpo estranho, secura, irritação, coceira e lacrimação excessiva, e mais severos, como ceratite, úlcera corneal, neovascularização e afinamento e/ou perfuração da córnea (FONSECA; ARRUDA; ROCHA, 2010).

Baseado nos fatores etiológicos, a DOS pode ser classificada em duas categorias: deficiência na produção aquosa do filme lacrimal (*Aqueous Deficient Dry Eye* - ADDE), decorrente de uma falha em sua secreção pela GL, ou como uma

desordem evaporativa (*Evaporative Dry Eye* - EDE), resultante da evaporação excessiva da camada aquosa do filme (DRY EYE WORKSHOP, 2007; DING; SULLIVAN, 2012; LIN et al., 2014).

2.3.1 Olho seco por deficiência aquosa (Aqueous Deficient Dry Eye - ADDE)

Nesse tipo de olho seco ocorre uma diminuição da secreção e do volume lacrimal devido a uma falha na produção pela GL (Barabino 2012). Essa desordem pode estar ou não relacionada à Síndrome de Sjögren (FONSECA; ARRUDA; ROCHA, 2010). A Síndrome de Sjögren é uma exocrinopatia autoimune que atinge glândulas exócrinas, como as lacrimais e salivares, relacionando-se com outras doenças sistêmicas autoimunes, como artrite reumatoide e *Lupus eritematoso* (BARABINO et al., 2012). Quando a ela relacionada, a GL sofre infiltração de células T ativadas, as quais destroem suas células acinares e ductulares, responsáveis pela produção e secreção da camada aquosa do filme (FONSECA; ARRUDA; ROCHA, 2010). Quando não relacionado à Síndrome de Sjögren, o *déficit* na produção aquosa pode ser devido a disfunções (primárias ou secundárias) da GL não associadas a doenças autoimunes, como aquelas relacionadas à idade (OBATA, 2006; DRY EYE WORKSHOP, 2007; BARABINO et al., 2012; DING; SULLIVAN, 2012).

Outras causas para essa desordem seriam a obstrução do ducto lacrimal (causada por tracoma, queimaduras químicas ou térmicas, entre outros), hiposecreção reflexa (redução reflexo-induzida) e uso de medicamentos sistêmicos, os quais podem bloquear a neurotransmissão parassimpática, como o uso de bloqueadores, antiespasmódicos, diuréticos, antidepressivos tricíclicos, inibidores da recaptção de serotonina e outros antipsicóticos (FONSECA; ARRUDA; ROCHA, 2010).

2.3.2 Olho seco evaporativo (Evaporative dry eye – EDE)

A desordem evaporativa é causada quando há uma elevada taxa de evaporação do filme lacrimal na superfície ocular, não estando relacionada a problemas na produção da camada aquosa (BARABINO et al., 2012). Neste caso, a causa mais comum se dá por disfunções na glândula de Meibômio, que podem estar associadas à *acne rosácea*, dermatite atópica ou seborréica e uso de isotretinoína

sistêmica (FONSECA; ARRUDA; ROCHA, 2010). Outras causas para o aumento da evaporação do filme lacrimal incluem desordens no fechamento palpebral, redução da frequência de piscar, deficiência de vitamina A, uso de lentes de contato, além de atitudes como permanecer por muito tempo em frente a telas de computadores ou em ambientes com ar condicionados e baixa umidade do ar (DRY EYE WORKSHOP, 2007).

2.3.3 Consequências, causas e prevalência da DOS

Independente do tipo de desordem, ADDE ou EDE, ambas as alterações levam a uma perda da integridade do filme lacrimal, sendo que sua progressão está intimamente relacionada ao aumento da osmolaridade da lágrima que progride para um processo inflamatório, conforme discutido adiante (LUO et al., 2011; BARABINO et al., 2012; PFLUGFELDER et al., 2013; CONRADY et al., 2016).

Estudos epidemiológicos apresentam dados de prevalência da DOS bastante variáveis, uma vez que sua prevalência varia dependendo da população estudada, da localização geográfica e do critério utilizado para o diagnóstico e classificação da doença. Alguns estudos da última década estimavam que cerca de 5 milhões de estadunidenses com 50 anos ou mais tinham a DOS, sendo que a maioria destes eram mulheres (65% dos casos) (LEE et al., 2002; SCHAUMBERG et al., 2003; SHAUMBERG et al., 2003; DRY EYE WORKSHOP, 2007; MILJANOVIC et al., 2007b, SHAUMBERG et al., 2009). Outros estudos indicam uma prevalência de 5% (McCARTY et al., 1998) a 35% (LIN et al., 2003) da doença do olho seco na população mundial, sendo que este percentual varia muito de acordo com os critérios de diagnóstico utilizados ou com o país analisado. Uma pesquisa mais recente realizada no Reino Unido mostrou prevalência de 15,5% de pacientes com DOS dentro de uma amostra de 2819 pessoas, com idade variando em 17 e 82 anos (VEHOF; HYSI; HAMMOND, 2017).

Estima-se que esses números sejam ainda maiores se forem considerados sintomas menos severos da doença ou considerando, ainda, o envelhecimento populacional e o uso cada vez maior de computadores e ar condicionado.

No Brasil, os dados epidemiológicos são escassos. Em um dos poucos estudos conduzidos no país, pesquisadores correlacionaram uma maior prevalência da DOS em pacientes portadores de artrite psoriásica (LIMA et al., 2012). Outro estudo

demonstrou uma alta prevalência (62,7%) em pacientes portadores de glaucoma, os quais faziam uso de medicação para redução da pressão intraocular (COSTA et al., 2013).

Embora bastante variáveis, os estudos convergem para a idade de maior prevalência, 50 anos; conforme a população envelhece, a incidência da doença aumenta (DRY EYE WORKSHOP, 2007). O processo natural de envelhecimento, por si só, está relacionado à diminuição do volume e fluxo lacrimal (BARABINO et al., 2012), além de alterações na composição lipídica do filme, por alterações na glândula de Meibômio (DING; SULLIVAN, 2012). Estas alterações incluem diminuição quantitativa e atrofia dos ácinos, obstrução dos ductos ou alteração na secreção dos lipídeos (OBATA, 2006; DING; SULLIVAN, 2012).

Hormônios sexuais também demonstram estar relacionados a aspectos funcionais e estruturais do olho humano, incluindo produção da camada aquosa e lipídica, secreção de muco e estabilidade do filme lacrimal (SULLIVAN, 2004). Diminuição de estrógenos, geralmente no período pós-menopausa em mulheres, também se relaciona com alterações nas glândulas de meibômio e instalação da DOS, o que justifica sua maior prevalência em pessoas do gênero feminino (BAUDOIN, 2001; SULLIVAN; 2004; FONSECA; ARRUDA; ROCHA, 2010).

Além dos sintomas visuais, diversos estudos referem-se à síndrome do olho seco a um impacto na qualidade de vida dos pacientes portadores. A DOS pode afetar, em vários níveis, atividades diárias simples como leitura, dirigir automóveis, utilizar computadores, impactando na produtividade, no dia-a-dia e no trabalho desses pacientes (MILJANOVIC et al., 2007a; BENÍTEZ-DEL-CASTILLO et al., 2013; BARABINO et al., 2016; TSUBOTA et al., 2017). Geralmente os sintomas são mais severos naqueles que trabalham em frente a telas de computadores, embora nem sempre os sinais clínicos acompanhem os sintomas (TSUBOTA et al., 2017). Schiffman e colaboradores (SCHIFFMAN et al., 2003) compararam o impacto na qualidade de vida de pacientes portadores da DOS com pacientes portadores de *angina pectoris*. Seus dados indicaram uma queda na qualidade de vida dos pacientes portadores de olho seco moderado a severo, semelhante aos portadores de angina. Outros estudos corroboram com esses dados, associando uma maior propensão dos pacientes portadores da DOS a desenvolver ansiedade e depressão (LI et al., 2011; VAN DER VAART; WEAVER; DAVIS, 2015). Conviver com a dor e os sintomas de irritação ocular e o impacto na acuidade visual, além de um tratamento que envolve a

instilação frequente de colírios de alto custo e baixa eficácia clínica, são um dos fatores impactantes na qualidade de vida dos portadores (DRY EYE WORKSHOP, 2007).

2.3.4. Diagnóstico

O diagnóstico da DOS ainda carece de testes mais específicos, sendo na maioria das vezes baseado apenas na avaliação dos sintomas retratados pelo paciente (MCGINNIGLE; NAROO; EPERJESI, 2012; COLLIGRIS; ALKOZI; PINTOR, 2014). Um diagnóstico mais apurado pode ser realizado com base na combinação dos sintomas com os sinais clínicos, que nem sempre estão presentes. Entre os testes mais comuns, estão o teste de Schirmer e vermelho fenol, que envolvem a inserção de um papel de filtro ou um papel indicador de pH, respectivamente, no saco conjuntival, e uso de corantes específicos para avaliação de alterações no epitélio, como a fluoresceína (DRY EYE WORKSHOP, 2007). A avaliação da osmolaridade do filme lacrimal ou ainda quantificação de marcadores moleculares, como a metaloproteinase 9 (MMP-9) em excesso, são considerados padrões ouro para o diagnóstico da doença, embora raramente utilizados na rotina clínica (FARRIS, 1994; SOBRIN et al., 2000).

2.3.4.1 Hiperosmolaridade e inflamação

A hiperosmolaridade do filme lacrimal, geralmente com valores acima de 316 mOsm/Kg (TOMLINSON et al., 2006), é um dos eventos centrais da DOS, estando intimamente relacionada ao processo inflamatório instalado na superfície ocular. Uma vez instalado, seja por qualquer uma das causas da doença, o aumento da osmolaridade do filme lacrimal leva a um estresse nas células epiteliais, que por sua vez estimula a produção de mediadores e inicia uma cascata de eventos pró-inflamatórios, envolvendo MAPquinases (Proteinoquinase Ativada por Mitógenos) e NFkB (Fator Nuclear de Cadeia Leve Kappa potenciador de células ativadas B) (BAUDOIN et al., 2013). Esses mediadores pró-inflamatórios (principalmente IL-1 α e IL-1 β , TNF- α e metaloproteinases de matriz) podem, por sua vez, aumentar a disfunção nas glândulas secretórias, desencadeando um processo crônico e um *déficit*

cada vez maior na secreção de fluido lacrimal (STEVENSON; PUGAZHENDHI; WANG, 2016).

Em outros casos, estímulos irritativos crônicos, como por exemplo, o uso de lentes de contato ou até mesmo doenças autoimunes sistêmicas, podem gerar um processo inflamatório na superfície ocular, que também por meio da liberação de mediadores pró-inflamatórios provocam um estímulo inibitório da secreção de filme lacrimal pelas células acinares. De uma forma ou de outra, instala-se uma disfunção secretória e um processo inflamatório crônico (FONSECA; ARRUDA; ROCHA, 2010).

Além da hiperosmolaridade e aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios, o estresse oxidativo também pode exercer um papel fundamental na DOS. Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) são associados a inúmeras doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, e também oculares, como a degeneração macular relacionada à idade e a catarata. Estes levam a um dano celular que pode se estender inclusive ao material genético, desencadando apoptose e necrose celular (FONSECA; ARRUDA; ROCHA, 2010). Modulo e colaboradores. (MODULO et al., 2009) relacionaram o aumento do estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia nos casos de diabetes mellitus à alteração histológicas presentes nas GLs de ratos com resistência à INS.

O Quadro 2 mostra os principais sintomas e sinais clínicos da DOS e seu grau de severidade.

Quadro 2 – Grau de severidade baseado nos sintomas e sinais clínicos da DOS.

Grau de Severidade*	Perfil do Paciente
Nível 1	<ul style="list-style-type: none"> • Sintomas suaves a moderados que ocorrem sob estresse ambiental e nenhum sinal clínico • Nenhum ou algum episódio de fadiga suave
Nível 2	<ul style="list-style-type: none"> • Sintomas moderados a severos esporádicos ou crônicos • Sinais no filme lacrimal • Coloração pontual suave na córnea • Coloração na conjuntiva • Sinais visuais
Nível 3	<ul style="list-style-type: none"> • Sintomas severos frequentes ou constantes sem estresse ambiental • Coloração pontual córnea • Coloração no centro da córnea • Ceratite filamentosa • Atividades limitadas
Nível 4	<ul style="list-style-type: none"> • Sintomas severos constantes • Sinais presentes • Erosões, coloração severa na córnea • Cicatrizes na córnea

*Deve estar presente pelo menos um sinal ou um sintoma em cada categoria para qualificar o grau de severidade.

Fonte: Adaptado de TSUBOTA et al., 2017.

2.3.4.2 Alterações epiteliais

Uma das alterações clínicas mais comuns da DOS é a perda da integridade da superfície ocular, mediada pelo processo inflamatório e citocinas pró-inflamatórias. De maneira geral, após a instalação da doença, ocorre um aumento na densidade e espessura de células epiteliais, diminuindo seu tamanho e aumentando o processo de renovação celular. Dentre os mediadores celulares mais importantes envolvidos na

perda da integridade epitelial, principalmente da córnea, pode-se citar IL-1, TNF- α , INF- γ , IL-17 e MMP-9. Além das citocinas e enzimas degradadoras de matriz, protooncogenes (c-myc), autoantígenos (Ro, La, a-fodrin) e moléculas co-estimuladoras (B71, B72) também são expressas pelas células epiteliais (STEVENSON; CHAUHAN; DANA, 2012).

Interleucinas IL-1 e INF- γ estão envolvidas no processo de metaplasia escamosa, enquanto INF- γ também diminui a diferenciação celular das células calciformes. O aumento da apoptose das células epiteliais pode ser causado por duas vias: via proteína quinase, do tipo MAPK induzida por estresse (intrínseca) ou via TNF- α pela interação do Fas ligante expresso em células T, com o Fas expresso nas células epiteliais da córnea, conjuntiva e GL (Fas/Fas ligante - extrínseca) (ZOUKHRI, 2006).

Outra alteração muito comum na DOS é a degradação da matriz extracelular, causada por metaloproteinases, principalmente a MMP-9 e MMP-2, que leva a perda celular (STEVENSON; CHAUHAN; DANA, 2012). A MMP-9 possui papel fundamental na cicatrização de feridas de córnea e na inflamação, porém é responsável por alterações epiteliais patológicas na superfície da córnea (COLLIGRIS; ALKOZI; PINTOR, 2014). Associada a ela, a perda da função barreira do epitélio de córnea ocorre também via IL-17, secretada por linfócito T helper subtipo 17 (STEVENSON; CHAUHAN; DANA, 2012). Essa perda da integridade do epitélio pode levar a abnormalidades na inervação corneana, como alterações morfológicas, que ajudam ainda mais a perpetuar o ciclo da inflamação no DOS (STEVENSON; CHAUHAN; DANA, 2012).

Liang e colaboradores (LIANG et al., 2016) observou um aumento da espessura do epitélio bulbar da conjuntiva, enquanto que o epitélio do limbo se tornou mais fino, alterações que os autores correlacionaram com o grau de severidade da doença. A redução da densidade das células calciformes em resposta a hiperosmolaridade ocorre por meio de eventos apoptóticos ou citotóxicos. A morte dessas células reduz ainda a produção de mucina e perpetua a instabilidade do filme lacrimal (VIAU et al., 2008; BAUDOIN et al., 2013).

2.3.5 Tratamento da DOS

O tratamento farmacológico da DOS baseia-se em dois princípios: restaurar a umidade da superfície ocular e diminuir o processo inflamatório. Porém ainda hoje o tratamento de escolha é predominantemente sintomático, ainda que haja fármacos anti-inflamatórios e secretagogos na clínica ou em estudo clínico. Neste contexto, para os casos mais leves, as lágrimas artificiais são ainda a primeira escolha, auxiliando na reposição da umidade e hidratação da superfície ocular, trazendo um alívio temporário aos sintomas de irritação e distorção visual (COLLIGRIS; ALKOZI; PINTOR et al., 2014; LIN et al., 2014a; COURSEY et al., 2015; SCHMIDL et al., 2015).

Em 2003, um estudo realizado pelo *International Market Survey* mostrou que dos 750 milhões de frascos de colírio vendidos naquele ano, cerca de 120 milhões foram para o olho seco (FONSECA; ARRUDA; ROCHA, 2010). Colírios lubrificantes são soluções tamponadas iso ou hipotônicas, que contém em sua composição eletrólitos, polímeros hidrossolúveis (derivados de celulose, álcool polivinílico, dextrano), tensoativos e agentes de viscosidade (hialuronato de sódio e polietilenoglicol) atuando apenas parcialmente na reposição da umidade da superfície ocular (ALBIETZ e BRUCE; 2001; BILKHU et al., 2014; NAKAMURA et al., 2015). Mais recentemente, eles foram enquadrados como medicamentos específicos na RDC 05/2015 da ANVISA (ANVISA, 2015).

Casos crônicos da doença, em que há a instalação do processo inflamatório (abrangem cerca de 30% dos pacientes portadores), o tratamento é realizado com fármacos anti-inflamatórios tópicos, como corticosteroides ou imunomoduladores, como a ciclosporina (COURSEY et al., 2015). A administração de corticosteroides se limita a poucas semanas, uma vez que seu uso prolongado pode levar ao aumento da pressão intraocular, além de risco aumentado de infecções fúngicas e bacterianas, além da pré-disposição para formação de catarata (BOWLING e RUSSELL, 2015). Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) também são uma alternativa para o tratamento da DOS por aliviarem a dor e o desconforto provocado pelo processo inflamatório (COLLIGRIS; ALKOZI; PINTOR et al., 2014). Outros fármacos tópicos ainda incluem o diquafasol, secretagogo de mucina (FUJIHARA et al., 2002; COLLIGRIS; ALKOZI; PINTOR et al., 2014), e a ciclosporina, responsável por inibir a via de sinalização da calcineurina que resulta na supressão genética de citocinas, impedindo a ativação de células T (RODRIGUEZ-ALLER et al., 2012).

Entretanto, devido ao rápido *clearance* lacrimal, o reflexo de piscar e a lacrimação, o tempo de residência das formulações usadas na terapia da DOS, que em sua maioria são soluções simples, é curto, necessitando de uma alta frequência de administração. Isso pode levar a uma baixa adesão ao tratamento por parte do paciente (ALVES et al., 2013; COLLIGRIS; ALKOZI; PINTOR, 2014), além do aumento dos efeitos adversos.

Outras medicações de uso sistêmico incluem ainda alguns antibióticos e ácidos graxos, como ômega-3 (DE PAIVA et al., 2006; FONSECA; ARRUDA; ROCHA, 2010; COLLIGRIS; ALKOZI; PINTOR, 2014). Além do tratamento farmacológico, existem outras alternativas como a instalação de dispositivos que impedem a drenagem lacrimal, como *plug* no ponto lacrimal (WILLIS et al., 1987; YAGUCHI et al., 2012; KAKIZAKI et al., 2012) e algumas técnicas cirúrgicas, aplicadas em casos mais extremos.

Entretanto, as terapias disponíveis atualmente apresentam baixa relevância terapêutica, uma vez que proporcionam pouca ou nenhuma eficácia clínica, além de alta frequência de administração nos casos das soluções simples e efeitos adversos severos. Novas alternativas de tratamento, que possuam maior relevância terapêutica, são cada vez mais imprescindíveis. Desta forma, estudos recentes associam diversas classes de substâncias à restauração da produção do fluido lacrimal e de seus componentes, visando o tratamento da DOS.

Nakamura e colaboradores (NAKAMURA et al., 2015) demonstraram o efeito do peptídeo JBP485 na expressão e secreção de mucina pelas células epiteliais de conjuntiva. Outras substâncias em estudo envolvem o antitumoral infliximab (Li et al., 2012), a lacritina, com potencial secretagogo (FUJI et al., 2013; WANG et al., 2015), o fator do crescimento neural (JAIN et al., 2011), a doxiciclina (DE PAIVA et al., 2006), o imunossupressor sirolimus (LINARES-ALBA et al., 2016) e outras substâncias capazes de inibir receptores de citocinas envolvidas na inflamação e alterações do epitélio (ANGLADE et al., 2007; SISTO; LISI; LOFRUMENTO, 2012).

2.4 INSULINA E TRATAMENTO DE DOENÇAS OCULARES

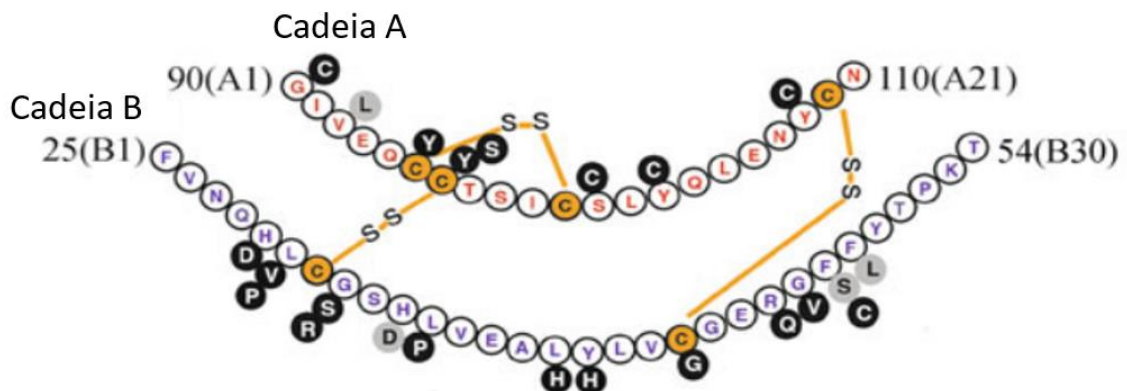
A INS é um dos hormônios peptídicos mais importantes para a vida nos seres vertebrados, atuando no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos. Ela está

diretamente relacionada à produção e armazenamento de substratos energéticos (WAIZUMI e EGUCHI, 2005; HUA, 2010).

Primeiramente isolada em 1921 de pâncreas suíno por Frederick Banting e Charlen Best, seu efeito sistêmico na glicemia foi logo observado em animais, o que deu um salto na medicina a partir do surgimento de uma terapia para o diabetes, até então incurável (BLISS, 1982). Hoje, a administração de INS e seus análogos é a principal terapia para o *diabetes mellitus* tipo 1 e 2, estando disponível no mercado diferentes tipos ou análogos de INS (GOMEZ-PEREZ e RULL, 2005).

A INS é um hormônio anabólico, produzido em condições normais pelas células β do pâncreas, sendo formada por 51 aminoácidos, com massa molecular aproximada de 5800 Da (HRYNYK; NEUFELD, 2014). Ela é uma proteína globular, sendo sua estrutura primária descrita na Figura 8. Sua molécula consiste em duas cadeias polipeptídicas ligadas entre si por duas pontes dissulfeto (A7-B7 e A20-B19). A cadeia A é formada por 21 aminoácidos e possui uma ponte dissulfeto intracadeia, enquanto a cadeia B possui 30 aminoácidos (HUUS et al., 2005).

Figura 8. Estrutura primária da INS humana.



Fonte: HUA et al., 2010.

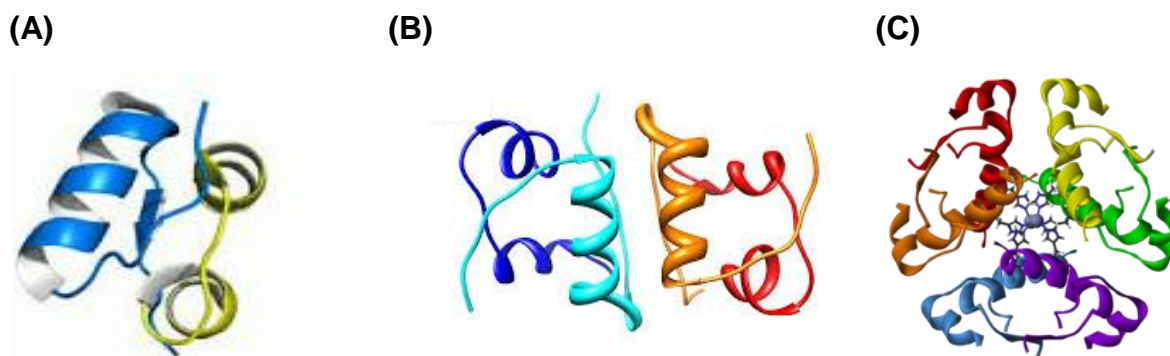
A estrutura secundária da INS é formada por duas α -hélices não paralelas na cadeia A e uma única α -hélice na cadeia B, seguida de um desdobramento β nos resíduos B21 e B30 (BRANGE e LANGKJØER, 1993). A molécula apresenta residual de cargas negativo em meio fisiológico, com ponto isoelétrico (pI) entre 5,3 e 5,4 (WINTERSTEINER e ABRAMSON, 1933). Próximo ao pI, ela apresenta-se com baixa solubilidade em meio aquoso, precipitando. Em pH fisiológico a solubilidade e

estabilidade depende de vários fatores, como sua concentração, temperatura de armazenamento, presença de enzimas e concentração de cátions divalentes, como íon Zn^{2+} (WEISS; STEINER; PHILIPSON, 2014). Na presença de dois íons Zn^{2+} , ocorre a formação de um complexo não covalente quelado INS- Zn^{2+} , que pode assumir duas conformações diferentes: “estado T” de geometria octaédrica ou “estado R” de geometria tetraédrica, que por sua vez podem se agregar, formando agregados estáveis, os hexâmeros (FABRIS e FENSELAU, 1999).

Sua estrutura tridimensional está intimamente relacionada a sua estabilidade e atividade biológica. Em baixas concentrações, como a sanguínea ($\sim 10^{-6}$ M), ela se encontra em sua forma monomérica (5,8 kDa). A INS tende a se oligomerizar, principalmente como resultado de uma ligação de hidrogênio entre o C terminal de duas cadeias B (SHARMA et al., 2010). Em concentrações mais altas, em soluções aquosas de pH entre 2-8, a INS dimeriza, apresentando massa molecular aproximada de 12 kDa, ou forma hexâmeros, com 36 kDa, em geral na presença de íons Zn^{2+} (GUALANDI-SIGNORINI e GIORGI, 2001). Os hexâmeros podem ser formados a partir da associação de três dímeros (estado T dimérico T_6 , estado R dimérico R_6 ou mistura de estados T_3R_3) (FABRIS e FENSELAU, 1999).

Hoje, sua estrutura está bem elucidada. Métodos de cristalografia de Raios-X e outras técnicas de espectrometria demonstraram que a INS é uma proteína alostérica em sua forma hexamérica, podendo ser formados a partir da associação de três dímeros (estado T dimérico T_6 , estado R dimérico R_6 ou mistura de estados T_3R_3) (FABRIS e FENSELAU, 1999; WEISS; STEINER; PHILIPSON, 2014). A forma monomérica e hexamérica são globulares, enquanto a forma dimerizada é elipsoide (CHIEN, 1996; SILVA et al., 2003) (Figura 9). Quando submetida a processos como aquecimento e agitação, a molécula tende a seguir uma via de agregação alternativa, polimerizando-se e formando fibras amiloides insolúveis de alta massa molecular (WHITTINGHAM et al., 2002).

Figura 9. Estruturas tridimensionais da INS.

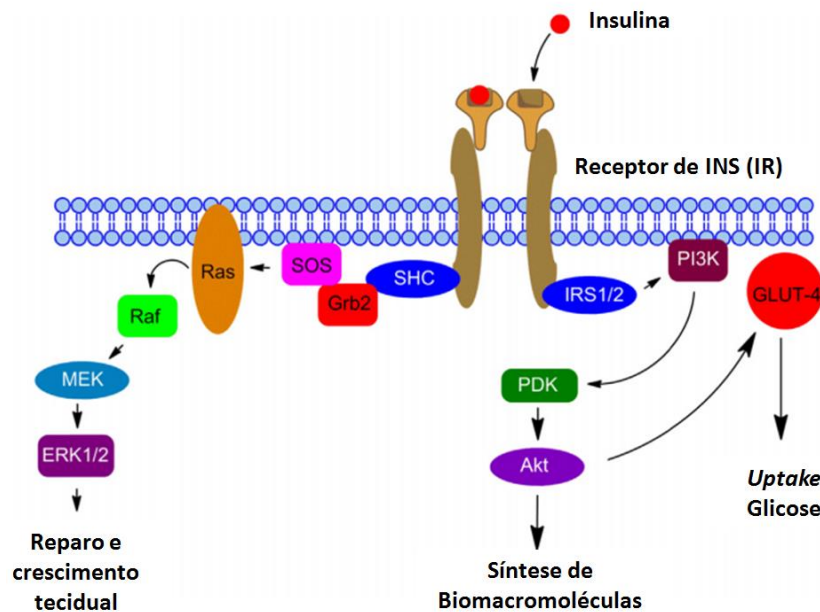


(A) Forma monomérica; (B) forma dimérica; (C) forma hexamérica.
 Fonte: Adaptado de WHITTINGHAM et al., 2002.

Após sua produção nas células pancreáticas, a INS é armazenada na forma de matrizes microcristalinas hexaméricas, sendo secretada em sua forma bioativa em resposta aos níveis de glicose e INS na circulação sanguínea (RAWAT et al., 2015; SAH et al., 2016). A forma monomérica é a única capaz de se ligar ao receptor de INS (IR) (Figura 10). Esse receptor pertence a uma família de receptores transmembrana do tipo tirosina quinase, sendo formado por uma glicoproteína heterotetramérica com duas porções extracelulares (duas subunidades α e duas β) (SAH et al., 2016). Entre os primeiros mensageiros podemos citar substratos do receptor de INS-1 e INS-2 (IRS-1 e IRS-2), a molécula Shc, que pode se complexar com o receptor de fator de crescimento ligante a proteína 2 (Grb2) e SOS, que levam a via de sinalização Ras-Proteína-quinases ativadas por *mitógeno* (MAP)quinase, e à ativação de proteínas janus quinase-2 (JAK-2) e ativador de transcrição-1 (STAT-1) responsáveis pela transcrição. Após se ligar a subunidade α do receptor, ocorre a autofosforilação do resíduo de tirosina na subunidade β , levando a múltiplas vias de sinalização pós-receptor, envolvendo diversas proteínas (SAH et al., 2016) (Figura 10).

Entretanto, sabe-se que esses eventos são capazes de induzir diferentes vias de sinalização, resultando em diversas interações intracelulares que abrangem outros hormônios, citocinas e fatores de crescimento, os quais induzem diferentes efeitos biológicos como *uptake* de glicose, a partir da circulação sistêmica e supressão da gluconeogênese hepática, aminoácidos, síntese de glicogênio, proteínas e ácidos graxos. A INS também age como fator de crescimento, regulando a síntese de DNA e RNA, diferenciação e proliferação celular, e crescimento tecidual, por diferentes vias de sinalização (STRAUS, 1991; WEISS; STEINER; PHILIPSON, 2014).

Figura 10. Receptor de INS e as principais vias de sinalização envolvidas na reparação tecidual, síntese de biomacromoléculas e *uptake* de glicose.



Fonte: HRYNK e NEUFELD, 2014.

Nas estruturas oculares, sabe-se que a INS também exerce papel fundamental na homeostase da GL e da superfície ocular. A sua presença já foi descrita no fluido lacrimal, GL e superfície ocular. Seu receptor (IR) já foi documentado tanto nas GL, quanto nas estruturas oculares como córnea, conjuntiva, tecidos neurais e vasculares da retina (IM et al., 1986; ROCHA et al., 2002; MODULO et al., 2009; YU et al., 2010). Além da INS e do IR, evidências demonstram que o hormônio é essencial para homeostase da GL e para proliferação de outros tecidos, como o epitélio da córnea (HANN; KELLEHER; SULLIVAN, 1991; ZHU e WALLMAN, 2009). Em culturas de células primárias, a suplementação com INS é imprescindível para o crescimento, proliferação e diferenciação *in vitro* de células acinares de GL e epitélio de córnea humana (ROCHA et al., 2000; MALKI, 2012).

Outros estudos mostram a presença de receptores para substrato de INS 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2), assim como a presença do fator de crescimento semelhante a INS (IGF-1) e de seu receptor IGFR-1, que demonstram modular a migração celular em células HCE tanto *in vitro* como *in vivo* (LEE et al., 2006).

Apesar de ainda não estar bem elucidado seu papel nestas estruturas, sabe-se que a INS é fundamental para a manutenção da acuidade visual. O diabetes mellitus é uma das maiores causas de problemas oculares, incluindo a cegueira, além de

desordens no epitélio da córnea, que incluem maior susceptibilidade a danos, úlceras, erosões epiteliais recorrentes, reepitelização retardada e cicatrização de feridas anormais (SHANLEY et al., 2004; KLOCEK 2009). Wakuta e colaboradores (WAKUTA et al., 2007) mostraram que animais com diabetes tipo 2 após 13-15 semanas de vida, tiveram redução no volume lacrimal e baixa taxa de cicatrização de feridas de córnea.

Muitos trabalhos mostram que a administração de INS pode auxiliar no processo de cicatrização de feridas da córnea, tanto em animais (BARTLETT et al., 1994; ROCHA et al., 2002; CUNHA et al., 2005; ZAGON et al., 2007; ALVES et al., 2008; YU et al., 2010), quanto em humanos (BASTION; LING, 2013). A INS demonstrou aumentar a reepitelização de células HCE via IP-3quinase e ERK $\frac{1}{2}$ (SHANLEY et al., 2004; KLOCEK et al., 2009).

Em ratos com *diabetes mellitus* induzida por estreptozotocina, concentrações farmacológicas (10 μ M) de INS levaram a fosforilação dos receptores IGF-1R em GL e glândulas salivares, mostrando que INS produz resposta dose-dependente ativando várias vias de sinalização celulares em ambos tecidos (ROCHA et al., 2000). Em GL de ratos saudáveis, a presença de INS leva à fosforilação dose-dependente, quase que imediatamente após sua infusão, dos receptores de INS, IGF-1R, dos receptores de substratos de INS 1 e 2 (IRS-1 e -2), Shc e STAT-1, o que indica que estes são parte fundamental do controle metabólico, crescimento tecidual e modulação da via de sinalização (LEITE et al., 2006). Já nos animais diabéticos, as vias de sinalização STAT e Shc demonstram estar desempareladas (ROCHA et al., 2000).

Em um estudo realizado por Modulo e colaboradores (2009) foi constatado que a diabetes mellitus induz danos estruturais e alterações funcionais em GL de ratos, seguidos de alterações oxidativas significativas, enquanto que a administração de pequenas doses de INS demonstraram reverter essas alterações. A injeção subcutânea de 1 UI (3,5 μ g) de INS uma vez ao dia foi capaz de prevenir alterações histológicas na GL e na superfície ocular induzidas pelo estresse oxidativo causado pela diabetes (MODULO et al., 2009). Outro estudo realizado em animais diabéticos demonstrou que o tratamento tópico diário com uma dispersão de INS foi eficaz em aumentar o volume lacrimal de ratos diabéticos e em reduzir o aparecimento de alterações celulares importantes na superfície da córnea (CRUZ, 2014). Por ser uma proteína, no entanto, a INS é rapidamente degradada em meio biológico (ODA et al., 2011; RAWAT et al., 2015), podendo sua biodisponibilidade local ser aumentada pela

sua incorporação em uma formulação adequada (KIM e PEPPAS, 2003; LI; NIELSEN; MÜLLERTZ, 2016).

2.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NANOPARTICULADOS LIPÍDICOS PARA ADMINISTRAÇÃO OCULAR DE FÁRMACOS

Como já descrito anteriormente, a administração de fármacos pela via ocular ainda é um desafio no campo farmacêutico, uma vez que o olho humano apresenta muitas barreiras anatômicas e fisiológicas, o que limita o acesso dos fármacos aos seus alvos moleculares (SANCHEZ LOPES et al., 2017). Tendo em vista que a DOS afeta a superfície ocular, a via de administração tópica é a via escolhida para o tratamento dessa desordem, sendo esta uma rota simples, conveniente e não invasiva para administração de formulações. Entretanto, a disponibilidade local de fármacos administrados topicamente enfrenta além das barreiras anatômicas e intraoculares, os fatores pré-corneais responsáveis pela rápida lavagem da formulação (SANHARAWI et al., 2010; KIM et al., 2014; REIMONDEZ-TROITIÑO et al., 2015).

Três principais barreiras afetam diretamente a biodisponibilidade de formulações aplicadas na superfície ocular: a) taxa de renovação lacrimal; b) drenagem nasolacrimal; c) reflexo de piscar. A rápida taxa de renovação lacrimal (variando de 0,5 ~ 2,2 $\mu\text{L}/\text{min}$) em associação ao tempo de restauração da lágrima 2 ~ 3 min e o reflexo de piscar são fatores limitantes para o tempo de residência de um fármaco (cerca de 1-2 min) e para sua biodisponibilidade ocular (<5%) (REIMONDEZ-TROITINO et al., 2015; FANGUEIRO et al., 2016; JANAGAM; WU; LOWE, 2017).

Além da lacrimação basal, após a instilação tópica de formulações na superfície ocular, também ocorre a lacrimação reflexa que promove diluição do fármaco, e em paralelo ao sistema de drenagem nasolacrimal e ao baixo volume anatômico no saco lacrimal, diminui ainda mais a biodisponibilidade do fármaco administrado (FANGUEIRO et al., 2016; SANCHEZ LOPES et al., 2017). Apenas cerca de 5 a 20% de uma solução administrada topicamente fica disponível na superfície ocular para absorção, o que requer que altas doses de fármaco, além de instilações frequentes, sejam administradas para que o efeito terapêutico seja alcançado, aumentando possíveis efeitos tóxicos (CHOLKAR et al., 2013; FANGUEIRO et al., 2016).

Nos últimos anos, a nanotecnologia aplicada ao delineamento de novos produtos farmacêuticos abriu o leque para uma área promissora de desenvolvimento

de formulações para administração ocular tanto para o segmento anterior quanto posterior. Sistemas nanoparticulados são carreadores de fármacos que apresentam tamanho na ordem nanométrica (entre 1 – 1000 nm), sendo utilizados para melhorar efeitos terapêuticos, solucionando problemas de estabilidade, solubilidade e dosagem de moléculas de baixa massa molecular e macromoléculas, como peptídeos e proteínas (FANGUEIRO et al., 2016).

No caso da DOS, sistemas de liberação desenvolvidos para essa terapia devem ser capazes de aumentar o tempo de residência e biodisponibilidade do fármaco nos tecidos extraoculares com o objetivo de aliviar os sintomas e sinais clínicos da inflamação da superfície ocular (JANAGAM; WU; LOWE, 2017). O que se tem hoje no mercado para o tratamento da doença, baseia-se apenas na instilação das soluções para lubrificação ocular, as quais devem ser instiladas com alta frequência (a cada 2 h ou quando sentir necessidade), ou quando em presença de outras substâncias farmacologicamente ativas, os efeitos tóxicos são comuns.

Os sistemas de liberação nanoparticulados apresentam várias vantagens em relação aos sistemas farmacêuticos convencionais, tais como: a) maior controle da liberação do princípio ativo, diminuindo doses tóxicas ou subterapêuticas; (b) utilização de menor quantidade do fármaco, que também diminui efeitos indesejados (c) maior intervalo de administração; (d) maior adesão ao tratamento pelo paciente; (e) possibilidade de direcionamento do princípio ativo para seu alvo específico; (f) maior biocompatibilidade, aumentando a interação com epitélio da superfície ocular (SHAFFER, 2005; REIMONDEZ-TROITINO et al., 2015). Além disso, nanocarreadores demonstram proteger fármacos contra degradação, aumentando sua estabilidade em relação a formulações convencionais (JANAGAM; WU; LOWE, 2017).

Os estudos envolvendo o uso de INS para tratamento de feridas de córnea envolvem em sua maioria administração sistêmica via subcutânea ou instilação de uma solução simples via tópica ocular com frequência variando de 12 a 6 vezes ao dia (ZAGON et al., 2007; MODULO et al., 2009; BASTION e LING; 2013; WEI-LI, 2016), o que justifica ainda mais o emprego de nanocarreadores para o tratamento tópico ocular. Neste contexto, sistemas nanoparticulados baseados em lipídeos, como os lipossomas, são uma estratégia promissora para administração ocular de fármacos, como a INS, visando aumentar o tempo de residência do fármaco nas estruturas

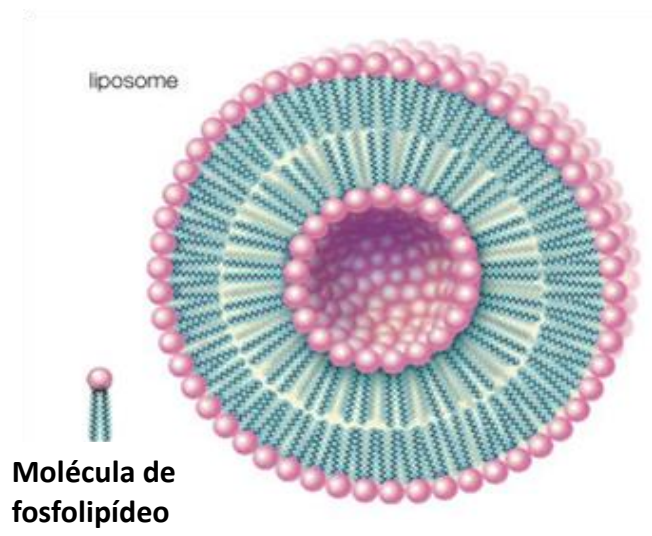
extraoculares da superfície ocular, evitar instilações frequentes e ainda auxiliar no desconforto causado pela DOS, conforme será discutido abaixo.

2.5.1 Lipossomas

Um dos sistemas de liberação de fármacos pioneiros foram os lipossomas. Inicialmente denominados “bangossomas”, em homenagem ao seu primeiro observador, Alec Bangham, em 1961, esses sistemas formados por bicamadas fosfolipídicas, são um dos mais estudados e difundidos da atualidade, com destaque a sua relevância na terapia gênica e antitumoral (ALLEN; CULLIS, 2013).

Lipossomas são vesículas esféricas de tamanho variável (20 nm a vários micrômetros de diâmetro) que podem ser produzidas com fosfolipídios naturais, como a lecitina ou fosfatidilcolina, em associação a outras substâncias, como colesterol e estabilizadores de membrana, polímeros e tensoativos (LI et al. 2015a) (Figura 11).

Figura 11. Representação esquemática de uma vesícula lipídica.



Fonte: Adaptado de Enciclopédia Britânica, 2007.

Em 1961, Alec Bangham durante um estudo com fosfolipídios e coagulação sanguínea verificou que os fosfolipídeos secos se autoorganizavam na forma de esfera com bicamada fosfolipídica na presença da água (BANGHAM, 1961). Essa estrutura começou então a ser utilizada primeiramente como modelo de membranas celulares na biologia e bioquímica. A sua utilização como sistema carreador de fármacos foi proposta somente por Gregoriadis, Leathwood e Ryman em 1971, e a

partir de então os lipossomas têm sido extensivamente utilizados no desenvolvimento de novos fármacos (GREGORIADIS; LEATHWOOD; RYMAN, 1971).

Por possuírem uma bicamada lipídica em torno de um núcleo aquoso, os lipossomas podem ser utilizados como carreadores de pequenas e macromoléculas, tanto lipofílicas quanto hidrofílicas (ALLEN; CULLIS, 2013; DUEHRKOP et al. 2016). Os fármacos hidrossolúveis ficam encapsulados no interior aquoso da cavidade lipossomal enquanto que os fármacos lipossolúveis são incorporados na bicamada lipídica.

Geralmente os lipossomas são classificados de acordo com sua lamelaridade (número de bicamadas) e tamanho da vesícula. Aqueles que possuem múltiplas bicamadas concêntricas, intercaladas por compartimentos aquosos, são denominados de multilamelares (*multilamellar large vesicles* – MLV), com tamanho superior a 1 μm . Já os que possuem apenas uma única bicamada são classificados como unilamelares, apresentando tamanho que varia de 20 a 50 nm, denominados vesículas unilamelares pequenas (*small unilamellar vesicles* - SUV), ou com tamanho entre 200 a 1 μm , chamados de vesículas unilamelares grandes (*large unilamellar vesicles* - SUV) (WEISSIG, 2010; FAN e ZHANG, 2013).

As principais vantagens dos lipossomas como sistemas de liberação de fármacos estão na sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de reduzir a toxicidade e aumentar a estabilidade de fármacos, protegendo-os da degradação e trazendo um ganho em relação ao seu índice terapêutico. A grande maioria dos fármacos sofre uma redução de seus efeitos colaterais ao serem incorporadas nos lipossomas (ALLEN; CULLIS, 2013).

Outra vantagem atribuída ao lipossoma é a sua facilidade em ter suas características facilmente modificadas pela incorporação de substâncias à bicamada lipídica durante o preparo, ou ainda ao processo de conjugação e associação de moléculas à superfície da vesícula, com o intuito de aumentar o direcionamento ao sítio-alvo, prolongar a circulação sanguínea e proteger o sistema de liberação contra o sequestro do sistema retículoendotelial (RES) do fígado (TORCHILIN, 2005; EL BAYOUMI; TORCHILIN, 2010; ALLEN; CULLIS, 2013; LI et al., 2015a; SERCOMBE et al. 2015).

Hoje em dia, novas gerações de lipossomas foram desenvolvidas, sendo a primeira delas os chamados *lipossomas convencionais*, formados em sua maioria por fosfolipídeos anfóteros (como a fosfatidilcolina) ou com carga (aniônicos ou catiônicos)

associados ao colesterol. Modificações na superfície foram propostas de modo a reverter as desvantagens dos convencionais, como o revestimento da membrana por um polímero hidrofílico. Essa segunda geração de lipossomas foi denominada de *lipossomas de longa-circulação* ou lipossomas PEGuilados (ALLEN; CULLIS, 2013; SERCOMBE et al. 2015). *Lipossomas sítio-específicos* ou imunolipossomas são uma nova geração de vesículas conjugadas a anticorpos monoclonais, que tem a finalidade de aumentar a seletividade da partícula ao seu receptor-alvo, muito estudados para o tratamento de câncer (EL BAYOUMI e TORCHILIN, 2010; BLENKE et al. 2013; SERCOMBE et al. 2015). Ainda hoje existem estudos a respeito de outras modificações que podem ser realizadas na vesícula, como conjugação a ácidos nucleicos, plasmídeos, partículas virais, de modo a proporcionar melhores resultados na terapia e vacinação gênica, imunização e terapia antitumoral (EL BAYOUMI; TORCHILIN, 2010; BLENKE et al. 2013; STRYJEWSKA et al. 2013; LIU et al. 2014; SERCOMBE et al. 2015).

Modificações na composição dos lipossomas também podem alterar sua flexibilidade. Sendo assim, em 1998 Cevc descreveu o preparo de lipossomas capazes de transportar fármacos através de membranas pouco permeáveis, como a pele (CEVC, 1998), dando origem a uma nova geração de lipossomas, os *lipossomas flexíveis*. Essas vesículas possuem como principal característica sua deformabilidade, conferida pela adição de alguns tensoativos aos fosfolipídeos, como sais biliares (colato de sódio, deoxicolato de sódio), Span e Tween, ou de etanol (BENSON, 2010). Essas substâncias agem como “ativadores de borda” ou, do inglês, “*edge activators*”, que desestabilizam as bicamadas lipídicas e aumentam a elasticidade da membrana. Geralmente, utiliza-se a fosfatidilcolina de soja ou de ovo como fosfolipídio principal em associação ao ativador de borda. No geral, esses lipossomas elásticos são preparados da mesma maneira que os convencionais, sendo os métodos mais comuns: hidratação do filme lipídico, evaporação de fase reversa, injeção de solvente, fluido supercrítico, sonicação, homogeneização por alta pressão e extrusão (GOYAL et al., 2016).

Por serem formados por fosfolipídios biocompatíveis e que fazem parte da membrana plasmática celular, os lipossomas são uma excelente estratégia para liberação de moléculas na superfície ocular. Em contato com o meio biológico, a bicamada lipídica tende a se fundir com a membrana plasmática das células, liberando o conteúdo de seus lipossomas (WEISSIG, 2010). Considerando a fisiopatologia da

DOS, podem ocorrer interações entre as vesículas lipossomais e os lipídeos presentes na camada lipídica do filme lacrimal e na membrana celular epitelial. Essas interações podem levar a um aumento do tempo de residência da formulação na superfície da córnea e possibilitar a liberação direcionada da INS para os receptores aí presentes, aumentando sua biodisponibilidade local (NIU et al., 2011; HU et al., 2013; HOF AUER et al., 2013; CUI et al., 2015; ELNAGGAR, 2015). Do mesmo modo, a formulação lipídica pode favorecer a lubrificação da superfície ocular, formando uma camada de proteção contra a evaporação do fluido lacrimal (SOUZA et. al., 2013; FANGUEIRO et. al., 2014; VICARIO-DE-LA-TORRE et al., 2014; SEVERINO, et. al., 2014; FANGUEIRO et. al., 2015).

O primeiro medicamento lipossomal a ser introduzido no mercado foi a doxorrubicina (Doxil/Caelix), em 1995, para o tratamento do sarcoma de Kaposi associado à AIDS (WEISSIG, 2010; MADNI et al., 2014). Visando o tratamento de doenças oculares, formulações lipossomais foram descritas no início da década de 1980 (REIMONDEZ-TROITINO et al., 2015). Hoje em dia já são dezenas de formulações lipossomais no mercado ou em fase de pesquisa clínica, incluindo formulações para tratamento de desordens oculares. Na Alemanha, o LipoNit[®] é um medicamento lipossomal de uso tópico administrado como *spray* para o tratamento dos sintomas de olho seco causado pela Síndrome de *Sjögren*. Formado basicamente por fosfolipídeos e vitamina E, o LipoNit[®] é indicado para restaurar a camada lipídica do filme lacrimal instável e diminuir sua evaporação. De maneira semelhante, o medicamento Tears again[®] (OCuSoft, TX) também no mercado na Alemanha, tem o mesmo apelo terapêutico e mesma forma de administração por *spray* tópico (HOF AUER et al., 2013; LIM; WENK; TONG, 2015).

Neste contexto, Vicario-de-la-Torre e colaboradores (VICARIO-DE-LA-TORRE et al., 2014) desenvolveram lipossomas sem preservativos contendo fosfatidilcolina, vitamina E e biopolímeros com boa tolerabilidade *in vivo* e *in vitro*, com a finalidade de reestabelecer a camada lipídica e evitar a evaporação do filme lacrimal. Linares-Alba e colaboradores (LINARES-ALBA et al., 2016) desenvolveram lipossomas para encapsulação de um imunossupressor, o sirolimus, obtendo bons resultados na produção de filme lacrimal em um estudo *in vivo*. Craig e colaboradores (CRAIG et al., 2010) mostraram resultados promissores em um estudo clínico com a administração de lipossomas convencionais, os quais foram capazes de melhorar a espessura do filme lacrimal e o desconforto visual causado pela DOS.

Entretanto, nenhum estudo foi realizado anteriormente associando o uso da INS como um potencial secretagogo e protetor da homeostase ocular com sistemas de liberação lipossomais, visando a terapia da DOS. Devido as características físico-químicas e biológicas complexas da INS, e as peculiaridades dos sistemas nanoparticulados, desenvolver uma dispersão lipossomal capaz de carrear a INS sem que ambos lipossoma e INS, percam suas funções, além de desvendar a influência dessa associação nas respostas biológicas é ainda um desafio que precisa ser enfrentado e faz parte do objetivo deste trabalho.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho é desenvolver nanodispersões lipossomais contendo INS visando sua administração tópica ocular para o tratamento da DOS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver metodologia analítica empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de INS em solução e nos lipossomas;
- Desenvolver e caracterizar físico-quimicamente lipossomas contendo INS;
- Caracterizar e avaliar a estabilidade e o estado de agregação da INS nas dispersões lipossomais;
- Avaliar a estabilidade físico-química e química das formulações;
- Verificar em membrana corioalantóide a irritação ocular causada pela administração do lipossoma desenvolvido;
- Avaliar a citotoxicidade do lipossoma desenvolvido em cultura de células de epitélio de córnea humana imortalizadas (HCE-SV40);
- Desenvolver um modelo experimental *in vitro* de inflamação em células HCE para avaliação do tratamento das formulações lipossomais;
- Avaliar a influência dos lipossomas na produção de mediadores presentes na DOS em cultura de células saudáveis e sensíveis a inflamação;

4 MÉTODOS

4.1 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DA INS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa Gemini RP-C18 (250 mm x 4,6 mm, 3 μ m, 110Å) (Phenomenex®, California, EUA) em Cromatógrafo Líquido modelo UFLC Prominence (Shimadzu®, Kyoto, Japão), equipado com bomba binária (LC – 20AD), detector de Arranjo de Diodos (SPD – M20A Prominence) e Módulo Controlador (CBM – 20A Prominence), acoplado a um computador com *software* Shimadzu® LC Solution. A condição analítica consistiu em fase móvel composta por acetonitrila : água contendo 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA), eluída em gradiente na proporção inicial 5 : 95 (v/v), sendo alterada linearmente para 95 : 5 (v/v) em 30 minutos, sob vazão de 1,0 mL/min, comprimento de onda de detecção de 220 nm, temperatura do compartimento da coluna de 30°C e volume de injeção de 10 μ L.

Antes das análises, as amostras contendo insulina recombinante humana (INS) (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) foram preparadas em fase móvel acetonitrila : água contendo TFA 0,1% (v/v) na proporção de 40:60 (v/v). As amostras foram filtradas em filtro de 0,45 μ m e injetadas em triplicata no CLAE utilizando as condições cromatográficas padronizadas.

4.2 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE INSULINA POR CLAE

Para se verificar a confiabilidade do método analítico proposto, realizou-se um estudo de validação do método de quantificação de INS de acordo com a RE 899 de 2003 (ANVISA, 2003) e diretrizes propostas pelo *International Conference on Harmonization* (ICH-Q2 R1) (ICH, 2005). De acordo com as normas, foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: linearidade e intervalo, sensibilidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e seletividade, além da avaliação de alguns parâmetros de *System Suitability* (FDA, 1994), conforme descrito a seguir.

4.2.1 Avaliação dos parâmetros de *System Suitability*

Com a finalidade de assegurar o melhor desempenho do sistema antes e durante as análises cromatográficas e definir suas melhores condições, foram avaliados os seguintes parâmetros de *system suitability*: fator de cauda (T) (Equação I), número de pratos (N) (Equação II) e repetibilidade determinado pelo coeficiente de variação (%) do tempo de retenção (Equação III). Os resultados foram expressos em média dos valores obtidos pelas equações e CV (%). (FDA, 1994).

$$T = W_x/2f \quad (\text{Equação I})$$

Onde T é o fator de cauda; W_x é a largura do pico determinada a 5% (0,05) ou a 10% (0,10) a partir da linha de base da altura do pico; f é a distância entre o pico máximo e o início do pico em W . Sendo o recomendado $T \leq 2$. (FDA, 1994).

$$N = 16 (t_R/t_W)^2 = L/H \quad (\text{Equação II})$$

Sendo N o número de pratos teóricos; t_R o tempo de retenção da INS; t_W a largura do pico na linha de base; L o comprimento da coluna (cm) e H a altura equivalente do prato teórico. O recomendado pelo FDA é $N > 2000$ (FDA, 1994).

$$CV(\%) = \frac{DP}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação III})$$

Onde DP é o desvio padrão entre os tempos de retenção obtidos e \bar{x} a média entre os tempos de retenção obtidos. O recomendando neste caso é $CV \leq 1\%$ para $n > 5$ (FDA, 1994).

Os ensaios foram realizados em três dias consecutivos injetando-se em quintuplicata soluções de trabalho da INS em fase móvel (acetonitrila:TFA 0,1% em água, 40:60) na concentração de 12,5 µg/mL.

4.2.2 Seletividade

A seletividade do método para a INS foi avaliada a partir da análise dos cromatogramas das amostras de i) fase móvel; ii) tampão fosfato salino PBS (10 mM pH 7,4); iii) lipossoma sem INS. Da mesma forma que as amostras que continham INS, essas amostras foram solubilizadas em acetonitrila (1:2), agitadas em vórtex por 1 min, sonicadas por 10 min, diluídas (1:5) em fase móvel (acetonitrila: água contendo TFA 0,1% (v/v), na proporção final 40:60 (v/v)) e filtradas em filtro de 0,45 µm antes de serem injetadas no cromatógrafo. Os perfis cromatográficos destas amostras foram comparados com o perfil de uma solução de INS padrão em fase móvel (acetonitrila: água contendo TFA 0,1% (v/v), 40:60 (v/v)) em concentração conhecida. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.3 Linearidade e intervalo

Para a construção das curvas analíticas, soluções de INS em fase móvel (acetonitrila:TFA 0,1% em água, 40:60) foram preparadas a partir da diluição sucessiva de uma solução estoque de INS a 1 mg/mL em HCl 0,01 M. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm e injetadas em quadruplicata no cromatógrafo. As curvas foram construídas a partir de 6 concentrações diferentes de INS: 100; 50; 25; 12,5; 6 e 3 µg/mL. A partir dos resultados encontrados, correlacionou-se as áreas dos picos (eixo das abscissas) com as concentrações conhecidas de INS (eixo das ordenadas), sendo tratados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A equação de reta foi expressa por $y = ax + b$, onde o coeficiente angular (a) é a inclinação da reta em relação aos eixos e o coeficiente linear (b) é a interseção da reta com o eixo y. A linearidade foi estabelecida pelo coeficiente de correlação linear (r).

4.2.4 Precisão e exatidão

Para determinação da precisão e exatidão, analisou-se soluções de trabalho da INS nas concentrações 3; 12,5; 50 µg/mL em quadruplicata. A precisão do método foi avaliada em dois níveis: i) repetibilidade ou precisão intracorrída e ii) precisão intermediária ou precisão intercorrídas (em dois dias consecutivos) (ANVISA, 2003).

Tabela 1 – Composição dos lipossomas.

Componentes	Concentração (%) (m/v)		
	Lipossoma Convencional		Lipossoma Flexível
	PC:CH 1:1 ¹	PC:CH 3:1 ²	PC:NaC 4:1 ³
Lecitina de soja (PC)	0,24	0,36	0,45
Colesterol (CH)	0,15	0,05	-
Colato de sódio (NaC)	-	-	0,05
Poloxamer 188	0; 0,03 ³ ; 0,1 ⁴	0; 0,03 ³ ; 0,1 ⁴	0; 0,03 ³ ; 0,1 ⁴
PBS 10 mM, pH 7,4 (qsp)	100	100	100

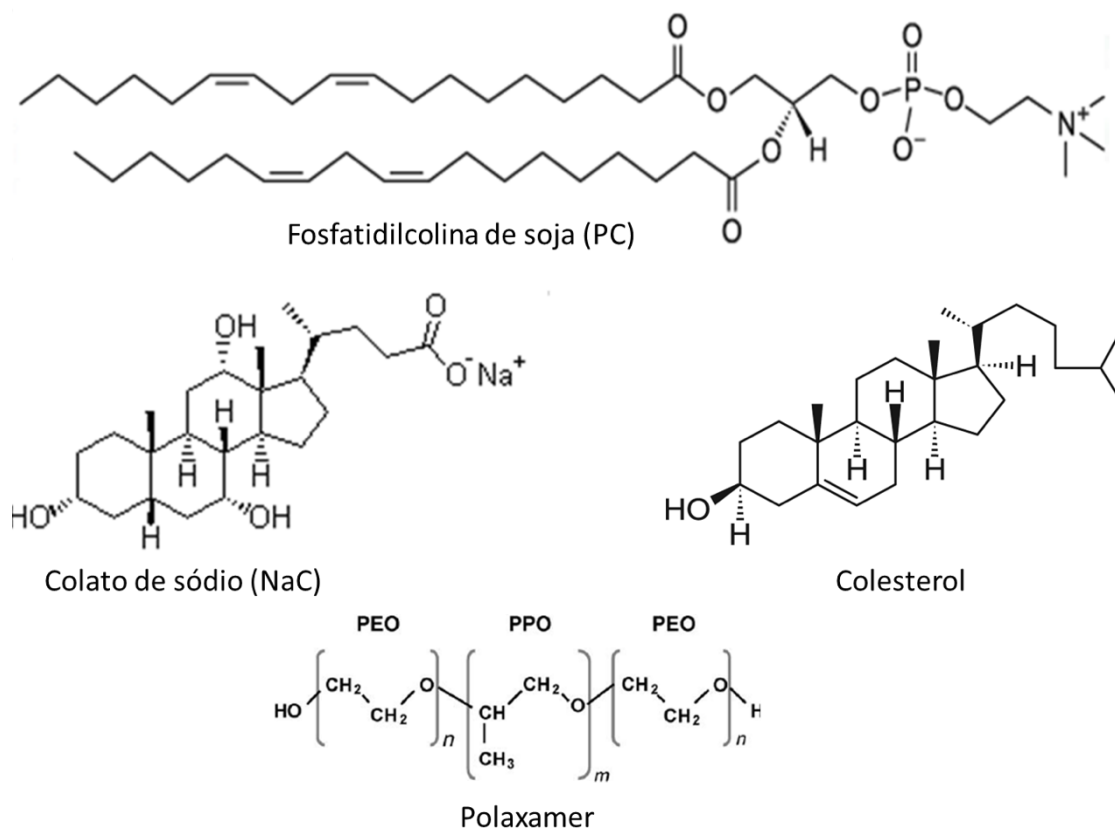
¹IWANAGA et al., 1997; DEGIM et al., 2004; MOZAFARI, 2010.

²CUI et al., 2015.

³CHEN et al., 2009; BENSON, 2010; NIU et al., 2011; HU et al., 2013.

⁴JAMSHOID et al., 1988; CHANDAROY et al., 2002.

⁵CASTILE et al., 1999; PEMBOUNGONG et al., 2011.

Figura 12. Estrutura química dos componentes empregados no desenvolvimento dos lipossomas.

Fonte: Adaptado de SANTANDER-ORTEGA et al., 2006; CHIANG et al., 2007; BASKIN e FROST, 2008; SILVA et al., 2015.

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico (BANGHAM, 1965). Como material de partida para os lipossomas convencionais, PC (Lipoid® S100, Ludwigshafen, Alemanha) e CH (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) foram pesados em diferentes proporções molares (PC:CH 1:1, PC:CH 3:1), de modo a se obter uma concentração final de 5 mg/mL de lipídeos. Para o preparo dos lipossomas flexíveis, empregou-se a PC em associação com o sal biliar NaC (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) na proporção molar PC:NaC 4:1. Os componentes foram solubilizados utilizando-se solvente orgânico (2 mL de clorofórmio ou mistura de clorofórmio e metanol 2:1) (J.T. Baker®, Center Valley, EUA), seguido de evaporação em rotaevaporador rotativo (MA 120, Marconi®, Piracicaba, Brasil) à 40°C e pressão reduzida, até completa evaporação do solvente e formação do filme lipídico (KOKKONA et al., 2000; MOZAFARI, 2010). Em seguida, o filme foi hidratado por 5 minutos em vórtex (Ika®, Staufen, Alemanha) utilizando-se tampão fosfato salino (PBS) a 10 mM, pH 7,4, na ausência ou presença de 0,032% ou de 0,1% de poloxamer 188 (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) (0,032 0,1%). Esta dispersão foi homogeneizada em homogeneizador de alta pressão (HAP) (EmulsiFlex-C3, Avestin Inc., Mannheim, Alemanha).

A influência da homogeneização em HAP no tamanho das partículas e índice de polidispersão (Pdl) foi avaliada por diferentes períodos de tempo (0, 5, 10, 15 e 20 minutos, respectivamente 0, 3,5, 7, 10,5 e 14 ciclos), à pressão constante de 500 Bar.

A caracterização das dispersões (item 4.4) foi feita sempre após 24 h do preparo, com as preparações mantidas em geladeira (a 4°C) durante este período.

4.3.1 Preparo dos lipossomas contendo INS

Lipossomas compostos por PC:NaC na proporção molar 4:1 e 0,1% de poloxamer foram utilizados para a incorporação da INS. Eles foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, como descrito anteriormente, mas adicionando-se à solução de hidratação 3 mL de uma dispersão de INS (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) em HCl 0,01M (Synth, Diadema, Brasil) a 4 mg/mL. Desta forma, a concentração final de INS nos lipossomas foi de 0,4 mg/mL (114 UI/mL). A dispersão hidratada foi homogeneizada em HAP por 5 min a 500 Bar.

Após 24 h de preparo, as dispersões foram filtradas em membrana esterilizante (filtro PVDF 0,22 µm) (Millipore, Massachusetts, EUA) e caracterizadas conforme

descrito no item 4.4. Esses lipossomas foram denominados PC:NaC INS. Os mesmos lipossomas preparados na ausência de INS foram denominados PC:NaC branco.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS E DA INS

4.4.1 Determinação do tamanho de partícula

O tamanho de partícula dos lipossomas foi analisado por duas diferentes técnicas: espalhamento de luz dinâmico (DLS) e análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). Uma dispersão de INS em solução de hidratação (0,1% poloxamer em PBS 10 mM pH 7,4), na mesma concentração teórica que foi adicionada aos lipossomas (0,4 mg/mL) foi também avaliada pelas duas técnicas e utilizada como controle.

4.4.1.1 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). As amostras que continham lipossomas foram diluídas 1:10 (v/v) em água ultra pura e analisadas a 25°C com ângulo de detecção de 90°. Os valores de Z-médio e índice de polidispersão (PDI) foram obtidos a partir de leituras em triplicata no modo intensidade.

Uma dispersão de INS em solução de hidratação também foi analisada, sem diluição (para garantir o mínimo de fótons por segundo para leitura confiável no aparelho), em triplicata, usando o processamento de dados do *Software* do equipamento como análises de proteínas. A leitura foi realizada em triplicata.

4.4.1.2 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

Foi utilizado o equipamento NanoSight NS 300 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido Reino Unido) e *software* “Análise e Rastreamento de Nanopartículas NTA 3.1”. As amostras de lipossomas foram diluídas 1:500 (v/v) em água ultra pura e, com auxílio de uma seringa estéril, foram aplicadas na câmara do porta-amostra evitando-se a presença de bolhas de ar. As análises foram realizadas na temperatura de 25°C, com ajustes necessários nos parâmetros ganho, duração de

captura, borrão e limiar de detecção de cinza. As leituras foram realizadas em quintuplicata e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Para avaliação do grau de polidispersão do sistema, utilizou-se o valor *Span*, que descreve a medida da largura da distribuição do tamanho de partícula, segundo a equação abaixo:

$$Span = \frac{D_{90}-D_{10}}{D_{50}} \quad (\text{Equação VI})$$

Onde D10, D50 e D90 correspondem, respectivamente, aos valores de diâmetro correspondentes a 10, 50 e 90% de volumes cumulativos.

Como controle, a análise de uma dispersão de INS em PBS 10 mM, pH 7,4 (concentração final 0,4 mg/mL) também analisada no equipamento sem necessidade de diluição prévia.

4.4.2 Determinação do potencial zeta

A determinação do potencial zeta dos lipossomas foi realizada no equipamento Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido), o qual emprega a técnica de mobilidade eletroforética para seu cálculo. Para as análises, as amostras foram diluídas 1:10 (v/v) em água ultra pura em triplicata.

Após a aplicação de um campo elétrico na célula contendo dois eletrodos de cargas opostas, as partículas presentes na amostra se deslocam a uma velocidade constante, denominada de mobilidade eletroforética. Para o cálculo do potencial zeta, o equipamento utiliza a equação de Henry (Equação VII) (MERTINS, 2008; BHATTACHARJEE, 2016).

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (\text{Equação VII})$$

Onde U_E é a mobilidade eletroforética, ε é a constante dielétrica, ζ é o potencial zeta; η é a viscosidade e $f(ka)$ é a função de Henry, a qual assumiu para as análises o valor referente ao modelo de Smoluchowski (MALVERN INSTRUMENTS, 2013).

4.4.3 Determinação do pH

Para a medida do pH das formulações finais, utilizou-se peagâmetro digital (Digimed DM-20, São Paulo, Brasil). As amostras foram medidas em triplicata, sem diluição e à 25°C.

4.4.4 Eficiência de encapsulação (EE,%) e recuperação do fármaco (RF,%)

A eficiência de encapsulação para os lipossomas contendo INS foi determinada indiretamente pela diferença entre a quantidade total de INS presente na dispersão lipossomal e a quantidade de INS livre, que consiste naquela que não foi encapsulada na vesícula lipossomal, conforme equação abaixo:

$$EE, \% = \left(\frac{\text{Quantidade total de INS no lipossoma} - \text{Quantidade INS livre}}{\text{Quantidade total de INS na dispersão lipossomal}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação VIII})$$

Para separação e quantificação da INS livre utilizou-se o seguinte protocolo: alíquotas dos lipossomas foram submetidas à centrifugação em dispositivo Amicon Ultra com membrana filtrante de 50 kDa (Millipore, Massachusetts, EUA) por 40 min a 7000 x g. O filtrado foi coletado e analisado por CLAE para quantificação da INS que atravessou a membrana (INS livre). Para a determinação da quantidade total de INS presente na dispersão lipossomal, ela foi diluída em acetonitrila (1:2), agitada em vórtex por 1 min e sonicada por 10 min para rompimento das vesículas e solubilização do fármaco, seguido de diluição (1:5) em fase móvel (acetonitrila: água contendo TFA 0,1% (v/v), na proporção final 40:60 (v/v)). As amostras foram filtradas em filtro de 0,45 µm e injetadas em triplicata no CLAE utilizando as condições cromatográficas padronizadas conforme descrito no item 4.1.

Para o cálculo da EE,% uma dispersão controle de INS a 400 µg/mL dispersa em solução de hidratação (PBS 10 mM, pH 7,4) foi submetida ao mesmo procedimento descrito acima. O percentual recuperado desta dispersão após a filtração foi utilizado para calcular o fator de correção (FC) (Equação IX), que foi utilizado para corrigir a EE (%) obtida para os lipossomas (Equação X).

$$FC = \frac{\text{Concentração dispersão INS após filtração}}{\text{Concentração dispersão INS teórica}} \quad (\text{Equação IX})$$

$$EE, \% corrigida = FC \times EE \text{ obtida Eq. IV} \quad (\text{Equação X})$$

O percentual de recuperação da INS (RF,%) foi obtido relacionando-se a quantidade de INS total presente na dispersão lipossomal pela quantidade teórica de INS adicionada à solução de hidratação (400 µg/mL) durante o processo de obtenção do lipossoma, de acordo com a Equação XI:

$$RF, \% = \frac{\text{Quantidade total de INS na dispersão lipossomal}}{\text{Quantidade INS teórica adicionada ao lipossoma}} \times 100 \quad (\text{Equação XI})$$

4.4.5 Análises morfológicas

4.4.5.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia dos lipossomas brancos e contendo INS obtidos a partir da PC:NaC foi avaliada por MET utilizando contraste negativo composto por solução aquosa de acetato de uranila 2% (m/v). Uma gota da dispersão lipossomal diluída 1:10 (v/v) em água ultra-pura foi colocada em contato com grades revestidas de carbono e corada com a solução de contraste por 5 minutos à 25°C (CUI et al., 2015). As amostras foram observadas em microscópio de transmissão eletrônico Jeol modelo 100 CX II (Jeol, São Paulo, Brasil) com voltagem de 80 kV, em aumentos de 50, 100 e 200 mil vezes.

4.4.5.2 Microscopia de força atômica (MFA)

A morfologia dos lipossomas foi avaliada por MFA empregando-se o modo contato-intermitente. As topografias das superfícies das amostras foram observadas em microscópio de varredura *Scanning Probe Microscope*, modelo SPM-9600 (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Para as análises, os lipossomas foram diluídos 1:10 (v/v) em água ultra pura, sendo aplicados 10 µL de cada amostra sobre a superfície de mica. As amostras foram deixadas secar à temperatura ambiente e posteriormente analisadas sob a faixa de frequência de ressonância de 204-497 kHz. As topografia de altura bidimensional

e tridimensional, amplitude e modo fase foram fornecidas simultaneamente pelo equipamento sobre um mesmo campo da amostra selecionado.

Como controle, uma dispersão de INS de mesma concentração que a presente nos lipossomas (0,4 mg/mL) em solução de hidratação (0,1% poloxamer em PBS 10 mM pH 7,4) também foi avaliada.

4.4.6 Estudo de difração de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

As medidas de SAXS foram feitas usando-se o equipamento Xeuss™ (Xenocs, Sassenage, França). Os lipossomas foram mantidos em um capilar de quartzo de diâmetro médio de 1,5 mm. O intervalo efetivo do módulo do vetor momento de transferência, $r = 4\pi\sin\theta/\lambda$ (onde θ é metade do ângulo de espalhamento e λ o comprimento de onda dos raios X) acessível experimentalmente foi de 0,01 – 0,35 Å⁻¹. As medidas foram feitas à 25°C. As intensidades coletadas foram corrigidas usando o espalhamento de *background*, capilar vazio e transmissão da amostra, passando pela posterior normalização para escala absoluta usando como padrão a água. Para o tratamento dos dados utilizou-se o pacote SUPERSAXS (OLIVEIRA E PEDERSEN, 2009).

Como controle e para determinar a massa molecular (MM) da INS nas dispersões em estudo, uma dispersão de INS em solução de hidratação (PBS 10 mM, pH 7,4 contendo 0,1% poloxamer) e outra em HCl 0,1M, ambas a 0,4 mg/mL, também foram analisadas.

De forma breve, a análise por SAXS consiste na aplicação de um feixe de raios-X de alta energia (comprimento de onda de 1,5 Å), que ao atingir uma determinada partícula da amostra e interagir com seus elétrons, sofre um espalhamento elástico. As ondas espalhadas interferem entre si de acordo com as relativas posições atômicas, estando sua amplitude e intensidade relacionadas à distribuição espacial dos átomos nessa partícula. Cada formato geométrico de uma estrutura da partícula (esfera, cilindro, prisma, etc.) possui um único perfil de intensidade, assim como distribuição de pares de distâncias, determinada pela função $p(r)$, única. Conhecendo-se esses perfis, pode-se, em uma análise inicial, sugerir informações a respeito da estrutura da partícula, assim como o tamanho máximo envolvido na partícula ($r_{\text{máx}}$) (OSELIERO FILHO, 2013).

Desta forma, para se obter informações a respeito da estrutura das partículas, a função $p(r)$ foi obtida por modelagem indireta dos dados (Transformada Indireta de Fourier - IFT) para cada uma das curvas de espalhamento. Para os cálculos, resumidamente, considerou-se primeiramente uma determinada partícula fixa no espaço, sendo que sua densidade eletrônica pode ser definida por $\rho(\vec{r})$, e a amplitude de espalhamento definida por $F(q)$, que é dada pela Transformada de Fourier da densidade eletrônica, segundo a Equação XII, que está relacionada com a intensidade espalhada $I_1(q)$, mensurável, por meio da Equação XIII.

$$F(q) = \frac{1}{4\pi} \int_V \rho(\vec{r}) e^{-i \vec{q} \cdot \vec{r}} d\vec{r} \quad (\text{Equação XII})$$

$$I_1(q) = F(q) \cdot F(q)^* \quad (\text{Equação XIII})$$

Como em medidas de SAXS não é possível acessar todo o domínio da função $I(q)$, a IFT foi utilizada para expressar a função $I(q)$. A IFT é uma variação da Transformada de Fourier para expressar dados ruidosos obtidos a partir da análise de SAXS de dispersões biológicas.

Para se determinar o perfil de intensidade e o perfil de distribuição de pares de distâncias considerando o sistema real, no qual as partículas não estão fixas no espaço, tomou-se a média sobre todas as orientações da partícula. Desta forma, a função $p(r)$, que fornece informações sobre a forma das partículas no espaço real, foi calculada a partir da sua intensidade espalhada $I_1(q)$ tratada por IFT de acordo com a Equação XIV (OSELIERO FILHO, 2013).

$$p(r) = \frac{r}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 I_1(q) \frac{\sin qr}{qr} dq \quad (\text{Equação XIV})$$

Para o cálculo da MM da INS após processamento das curvas SAXS e aplicação da IFT utilizou-se a Equação XV (OLIVEIRA, 2005).

$$MM = \frac{I(0) \cdot N_A}{c \cdot \Delta\rho^2} \quad (\text{Equação XV})$$

Onde N_A é o número de Avogadro, c é a concentração da INS em mg/mL (nos experimentos, essa concentração foi sempre 0,4 mg/mL), $I(0)$ é a intensidade espalhada extrapolada para $q = 0$, sendo q o vetor de espalhamento e $\Delta\rho$ é a densidade eletrônica. O parâmetro $\Delta\rho$, para proteínas, vale aproximadamente 2.10^{10} elétrons/g (OLIVEIRA, 2011).

Para o cálculo do número médio de monômeros de INS responsáveis por determinada MM, utilizou-se a Equação XVI.

$$\text{Número médio de monômeros} = \frac{MM}{MM_{1 \text{ monômero}}} \quad (\text{Equação XVI})$$

Sendo $MM_{1 \text{ monômero}}$ a MM correspondente a um monômero de INS (5,8 kDa).

4.5 ESTABILIDADE

4.5.1 Estabilidade física dos lipossomas

As dispersões lipossomais finais branca e contendo INS (PC:NaC branco e PC:NaC INS) foram armazenadas à 4°C e submetidas a um estudo de estabilidade física por 90 dias. Para tanto, após 24 h do preparo dos lipossomas, avaliou-se tamanho médio das partículas, Pdl, potencial zeta e valor de pH em períodos de tempo pré-determinados, sendo estes: 1, 2, 7, 14, 21, 28, 60 e 90 dias após o preparo. As análises físico-químicas foram realizadas conforme descrito no item 4.4.1.1 e 4.4.2 utilizando equipamento Zetasizer Nano ZS 90. O pH das formulações também foi avaliado, conforme descrito em 4.4.3, sem diluição das amostras, em peagâmetro digital (Digimed DM-20).

Os dados foram analisados estatisticamente por *one way*- ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Tukey. Considerou-se estatisticamente diferente os tempos que apresentaram valor $p < 0,05$ em relação ao tempo inicial (24 h após o preparo).

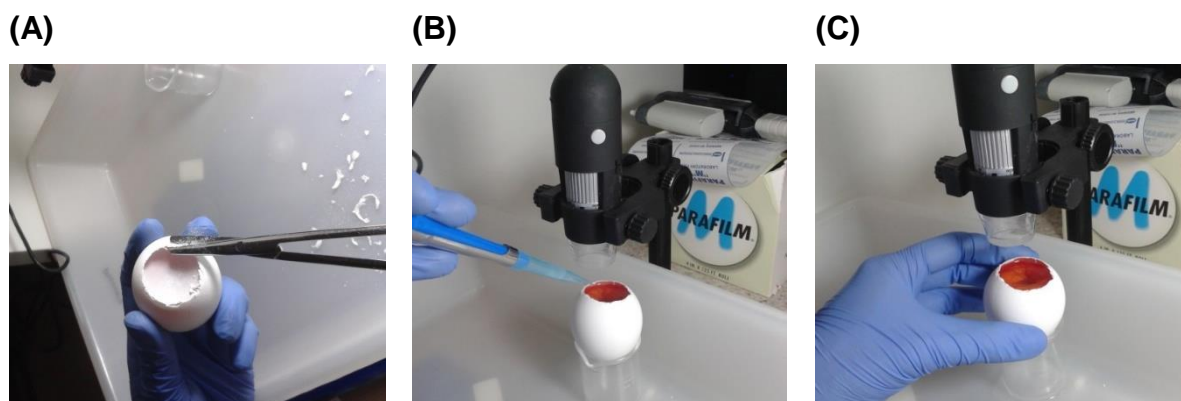
4.5.2 Estabilidade química da INS

Dispersões de INS em PBS (10 mM pH 7,4) e lipossomas PC:NaC INS, ambas contendo 0,4 mg/mL de INS, foram preparadas e, 24 h após o preparo, foram separadas em 9 diferentes frascos. Esses frascos foram mantidos sobre a bancada, a temperatura ambiente (25°C). A INS presente nos frascos foi avaliada por CLAE em cada dois frascos nos tempos 0, 24 e 48 h. A % remanescente de INS nas dispersões foi determinada em função da concentração inicial determinada por CLAE após 24 h do preparo (tempo 0). Também foi quantificada a INS logo após o preparo da formulação.

4.6 ENSAIO DE IRRITAÇÃO OCULAR *IN VITRO* – HET-CAM

Para avaliação da irritação ocular das formulações realizou-se o teste preditivo na membrana corioalantóide HET-CAM, empregando-se ovos de galinha embrionados como modelo experimental (LUEPKE, 1985). Para tanto, ovos fertilizados da raça *Leghorn* branca foram incubados a 37°C por 10 dias em incubadora. No 11º dia, com auxílio de uma tesoura e uma pinça, retirou-se cuidadosamente a casca na região superior dos ovos, de modo a deixar a membrana corioalantóide (CAM) exposta sob uma área aproximada de 4 cm² (Figura 13-A). 300 µL de cada formulação (PC:NaC branco e PC:NaC INS) foram aplicados diretamente sobre a CAM e, após 20 s, a membrana foi lavada cuidadosamente com 5 mL de solução fisiológica a 37°C (pH 7,4) para assegurar a completa remoção da formulação (Figura 13-B). A CAM foi então observada por 5 min com o auxílio de uma câmera digital (DigiMicro 2.0 Scale, Alemanha) posicionada a uma distância aproximada de 2 cm (Figura 13-C). Os efeitos de um controle positivo (solução de dodecil sulfato de sódio 10%) e de um controle negativo (solução fisiológica NaCl 0,9%) sob a CAM também foram avaliados. Os testes foram realizados em quadruplicata.

Figura 13. Ensaio de irritação *in vitro* – modelo organotípico HET-CAM.



(A) Retirada da casca do ovo. (B) Exposição da CAM e aplicação das formulações. (C) Visualização dos fenômenos ocorridos durante 5 min.

Para a observação da resposta da CAM, dois pesquisadores avaliaram cada vídeo em um ensaio duplo cego, para os seguintes fenômenos: hiperemia, hemorragia e coagulação. Os fenômenos foram analisados em função do tempo, atribuindo-se uma pontuação média (P), a cada resposta observada conforme indicado no Quadro 3.

Quadro 3 – Fenômenos que acometem a CAM após exposição a 300 μL de diferentes formulações por 20 s e escore atribuído de acordo com o tempo de surgimento dos fenômenos após retirada da formulação.

Fenômeno	Pontuação Média (P)		
	$t \leq 30 \text{ s}$	$30 \text{ s} < t \leq 2 \text{ min}$	$2 \text{ min} < t \leq 5 \text{ min}$
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Fonte: LUEPKE; KEMPER, 1986.

De acordo com o valor P obtido acima, as formulações foram classificadas conforme Luepke e Kemper (1986) e Kemper (1986) como descrito no Quadro 4.

Quadro 4 – Classificação para pontuações acumulativas no teste HET-CAM

Classificação	Pontuação média (P)
Praticamente não-irritante	$P < 1$
Ligeiramente irritante	$1 \leq P < 5$
Moderadamente irritante	$5 \leq P < 9$
Irritante	$P \geq 9$

Fonte: Luepke e Kemper (1986).

Os resultados obtidos entre os dois pesquisadores para a classificação final foram comparados entre si para avaliação da concordância entre eles.

4.7 ESTUDOS *IN VITRO* EM CULTURA DE CÉLULAS EPITELIAIS DA CÓRNEA HUMANA (HCE-SV40)

4.7.1 Citotoxicidade das formulações em cultura de células imortalizadas de epitélio de córnea humana (HCE-SV40)

O ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular foi realizado pela técnica do vermelho neutro, segundo descrito por Repetto et al., 2008.

Células de epitélio de córnea humana imortalizadas (HCE-SV40) foram cultivadas na densidade de 5×10^4 células por poço em placas de 96 poços e incubadas por 24 h em estufa a 37°C, 95% de umidade e 5% CO₂. Para o ensaio utilizou-se meio de cultura SHEM (*Supplemented Hormonal Epidermal Medium*), o qual consiste em mistura 1:1 de DMEM/Ham's F12 (Gibco, Grand Island, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, EUA), 5 ng/mL de EGF (Sigma Aldrich, St Louis, EUA), 5 µg/mL de INS (Sigma Aldrich, St Louis, EUA), 5 µg/mL de transferrina (Sigma Aldrich, St Louis, EUA), 5 ng/mL de selênio (Sigma Aldrich, St Louis, USA), 30 ng/mL de toxina cólera subunidade A (Sigma Aldrich, St Louis, EUA), 50 µg/mL de gentamicina (Gibco, Grand Island, EUA) e 1,25 µg/mL de anfotericina B (Gibco, Grand Island, EUA).

Após 24 h de incubação, o meio de cultura SHEM foi removido e os poços foram lavados com solução salina NaCl 0,9% (Sigma Aldrich, St Louis, EUA). Em seguida,

as células foram incubadas por 24 h com amostras de lipossoma branco (faixa de concentração de $4,5 \cdot 10^{10}$ a $7 \cdot 10^8$ partículas por mL), lipossoma com INS (faixa de concentração de $4,4 \cdot 10^{10}$ a $6,5 \cdot 10^8$ partículas por mL correspondentes às concentrações de INS de 40 a $0,672 \mu\text{g/mL}$) e solução de INS (faixa de concentração de 40 a $0,672 \mu\text{g/mL}$) diluídas em meio DMEM/Ham's F12 sem suplementos. As células foram tratadas em quadruplicata. Após o período de incubação, o meio contendo as formulações foi removido e os poços foram lavados três vezes com solução salina, seguido da adição de $100 \mu\text{L}$ de meio vermelho neutro (Merck, Darmstadt, Alemanha) ($40 \mu\text{g/mL}$ vermelho neutro em meio de cultura DMEM/Ham's F12). A placa de cultura foi incubada novamente por mais 3 h, seguida de lavagem com solução salina por três vezes e adição de solução reveladora composta por 50% de etanol absoluto (Synth, Diadema, Brasil), 49% de água deionizada e 1% de ácido acético glacial (Synth, Diadema, Brasil). A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm (REPETTO et al., 2008). A porcentagem de viabilidade celular (%) foi calculada em relação ao controle contendo somente células (100% de viabilidade).

4.7.2 Estímulo das células para produção de mediadores do processo inflamatório

Com o objetivo de simular um ambiente pró-inflamatório e, por conseguinte, a expressão e quantificação de citocinas pró-inflamatórias, as células HCE-SV40 foram cultivadas na densidade de 2×10^5 células por poço, em placas de 24 poços, e incubadas por 24 h em estufa a 37°C , 95% de umidade e 5% CO_2 , usando meio de cultura SHEM suplementado. No dia seguinte ao plaqueamento, os poços foram lavados com solução salina e as células submetidas a 3 diferentes tratamentos:

1) Estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) extraído de *Escherichia coli* 026:B6 (Sigma Aldrich, St Louis, EUA):

Diferentes concentrações de LPS em meio DMEM/Ham's F12 sem suplemento foram adicionadas às células para que as concentrações finais de LPS nos poços variasse de 0 a 4000 ng/mL e incubadas inicialmente por 3 h. Após este período o sobrenadante foi coletado e a concentração dos mediadores inflamatórios IL- 1β e TNF- α foi quantificada por ELISA kit *duo set* (*Enzyme Linked Immuno Sorbert Assay* - R&D Systems Minneapolis, EUA), conforme descrito em 4.7.4.

A partir deste estudo inicial, um outro protocolo de estímulo com LPS foi estabelecido, incubando-se as células com 2000 ng/mL de LPS por poço por 24 h, seguido da coleta do sobrenadante e avaliação de IL-1 β , TNF- α , além de MMP-9 por ELISA.

2) *Scratch* da cultura celular com ponteira:

Com uma ponteira de pipeta estéril, foi realizado um risco horizontal no poço contendo as células (*scratch*), simulando uma ferida no epitélio, seguido de lavagem com solução salina, adição de 500 μ l de meio incompleto e incubação por 24 h. Também se testou a associação de *scratch* e adição concomitante de 1 μ g de LPS (concentração final de 2 μ g/mL por poço), seguido de mesmo período de incubação. Após este período o sobrenadante foi coletado e a concentração dos mediadores inflamatórios IL-1 β e TNF- α foi quantificada por ELISA.

3) Adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma Aldrich, St Louis, EUA):

Uma solução de SDS foi adicionada aos poços, de forma que a concentração final por poço fosse de 0,5%, por 30 minutos, seguido de lavagem com solução salina, incubação por 24 h em meio incompleto, coleta do sobrenadante e quantificação de IL-1 β e TNF- α por ELISA.

4.7.2.1 Ensaio de citotoxicidade após estímulo

Após os estímulos descritos anteriormente, a viabilidade das células tratadas foi avaliada pelo teste do vermelho neutro para verificar a citotoxicidade dos diferentes protocolos utilizados para estímulo pró-inflamatório celular. Dessa forma, após o estímulo e coleta do sobrenadante, as células foram lavadas com salina. Em seguida, adicionou-se 500 μ L de meio vermelho neutro (40 μ g/mL) aos poços e o procedimento foi realizado conforme descrito em 4.7.1. A porcentagem de viabilidade celular (%) foi calculada em relação ao controle contendo somente células (100% de viabilidade).

4.7.3 Tratamento das células com as formulações desenvolvidas

Com a finalidade de avaliar a expressão de mediadores pró-inflamatórios no sobrenadante celular após o contato com os lipossomas desenvolvidos, as células HCE-SV40 foram plaqueadas na densidade de $2 \cdot 10^5$ células/poço em placas de 24 poços e incubadas por 24 h em estufa a 37°C, 95% de umidade e 5% CO₂, usando

meio SHEM. Após o plaqueamento, as células foram lavadas com salina e submetidas aos 3 diferentes protocolos de tratamento (Protocolos A, B e C, descritos mais adiante neste item). Após 24 h de incubação, o sobrenadante de cada poço foi coletado e quantificado em relação à produção de IL-1 β , TNF- α e MMP-9, conforme descrito em 4.7.4.

Os protocolos de tratamento utilizados foram realizados em triplicata e estão descritos a seguir:

1) *Protocolo A:*

As células foram tratadas concomitantemente com 1 μ g de LPS (concentração final no poço de 2 μ g/mL) e diferentes concentrações do lipossoma branco: 1,125.10¹⁰; 5,6.10⁹; 2,8.10⁹ e 1,4.10⁹ partículas/mL, em meio de cultura SHEM incompleto. Células tratadas apenas com LPS, na ausência dos lipossomas, foram utilizadas como controle.

2) *Protocolo B:*

As células foram tratadas concomitantemente com 1 μ g de LPS (concentração final no poço de 2 μ g/mL) e com os lipossomas branco ou contendo INS nas concentrações finais por poço de 4,5.10⁹ partículas/mL e 4 μ g/mL de INS (aproximadamente 1 UI/mL) em meio de cultura SHEM incompleto. Como controles, as células foram tratadas apenas com dispersão de INS em PBS (concentração final 4 μ g/mL), apenas com meio incompleto (somente células) e apenas com 1 μ g de LPS.

3) *Protocolo C:*

As células foram tratadas com os lipossomas branco e contendo INS nas concentrações finais nos poços de 4,5.10⁹ partículas/mL e 4 μ g/mL de INS (aproximadamente 1 UI/mL) em meio de cultura SHEM incompleto, **sem adição de estímulo LPS**. Como controle positivo, as células foram tratadas com uma dispersão de INS em PBS (concentração final 4 μ g/mL) e como controle negativo, apenas com meio incompleto.

4.7.4 Quantificação dos mediadores pró-inflamatórios

Para a quantificação dos mediadores pró-inflamatórios IL-1 β , TNF- α e da MMP-9 no meio extracelular, o sobrenadante da cultura de células foi coletado e quantificado empregando-se kits de ELISA *duo set* específico para cada mediador. O procedimento foi realizado conforme descrito no protocolo do fabricante. Resumidamente, microplacas *high binding* A-2 (Corning Costar, Nova Iorque, EUA) de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ L/poço de anticorpo de captura específico para cada mediador diluído em PBS (10 mM, pH 7,4) conforme especificações do fabricante. As placas foram incubadas *overnight* à temperatura ambiente. Em seguida, as microplacas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem 0,05% Tween[®] 20 (Synth, Diadema, Brasil) em PBS 10 mM pH 7,4 e uma vez apenas com PBS (10 mM pH 7,4).

Após a retirada dos tampões de lavagem, adicionou-se 300 μ L de tampão de bloqueio (1% albumina bovina sérica em PBS 10 mM, pH 7,4) (R&D Systems Minneapolis, EUA) em cada poço, seguido de incubação por 1 h à temperatura ambiente. Após novo ciclo de lavagem, 100 μ L de cada amostra coletada (sobrenadantes da cultura celular) diluídas 1:5 em reagente diluente, bem como diluições seriadas da curva padrão, foram adicionadas às placas e incubadas novamente por 2 h à temperatura ambiente.

As placas foram novamente lavadas e, em seguida, adicionou-se 100 μ L de anticorpo de detecção (anti-citocinas conjugados à biotina) específico para cada citocina, sendo incubadas por mais 2 h à temperatura ambiente, seguido de novo ciclo de lavagem. A seguir, 100 μ L da enzima estreptavidina peroxidase (R&D Systems Minneapolis, EUA) foram adicionados em cada poço sob abrigo da luz e, após 20 min à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas. Para a reação colorimétrica ocorrer, foram adicionados em cada poço 100 μ L da solução reveladora (substratos de tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio) (R&D Systems Minneapolis, EUA). Após o aparecimento da coloração azulada, a reação foi interrompida com 50 μ L de solução de ácido sulfúrico (2 N) (R&D Systems Minneapolis, EUA). As leituras da absorvância foram realizadas em leitor de microplaca a 450 nm.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando *software GraphPad Prism 5.0*, sendo dois testes empregados: 1) teste “t de *student*” para as análises que envolviam comparação entre os liposomas branco e contendo INS, quando se desejava comparar apenas dois grupos distintos; 2) *One-way* Análise de Variância (ANOVA) nos demais estudos (padronização do desenvolvimento da formulação, de estabilidade, citotoxicidade, estímulo inflamatório e tratamento em cultura de células), quando se desejava comparar mais de dois grupos levando em consideração apenas uma variável, seguido de pós teste Tukey.

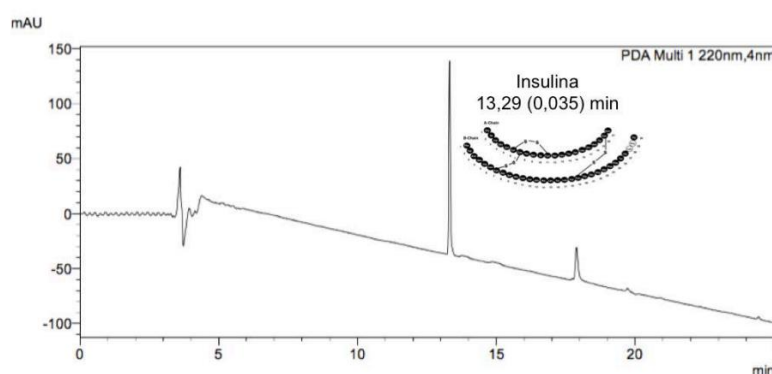
Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP) para no mínimo 3 replicatas, sendo os valores de p menor que 0,05 ($p < 0,05$) considerados estatisticamente significativos

5 RESULTADOS

5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA INS POR CLAE

O perfil cromatográfico de uma solução de INS (100 µg/mL) preparada em meio composto por acetonitrila e água acidificada e eluída por gradiente com fase móvel de mesma composição (acetonitrila : água contendo 0,1% TFA) está representado na Figura 14. A proporção inicial da fase móvel foi de 5 : 95 (v/v), sendo alterada linearmente para 95 : 5 (v/v) em 30 minutos.

Figura 14. Cromatograma de uma solução de INS 100 µg/ mL em solução de acetonitrila e água contendo 0,1% TFA na proporção de 40:60 (v/v).



Condições cromatográficas: fase móvel composta por acetonitrila:água contendo 0,1% de TFA inicialmente na proporção 5:95 (v/v) com gradiente de concentração linear até 90:10 (v/v) em 30 minutos, sob vazão de 1,0 mL/min, comprimento de onda de detecção de 220 nm, temperatura do compartimento da coluna de 30°C e volume de injeção de 10 µL.

A Tabela 2 mostra os resultados do teste de *System Suitability*.

Tabela 2 - Resultados do teste de *System Suitability*.

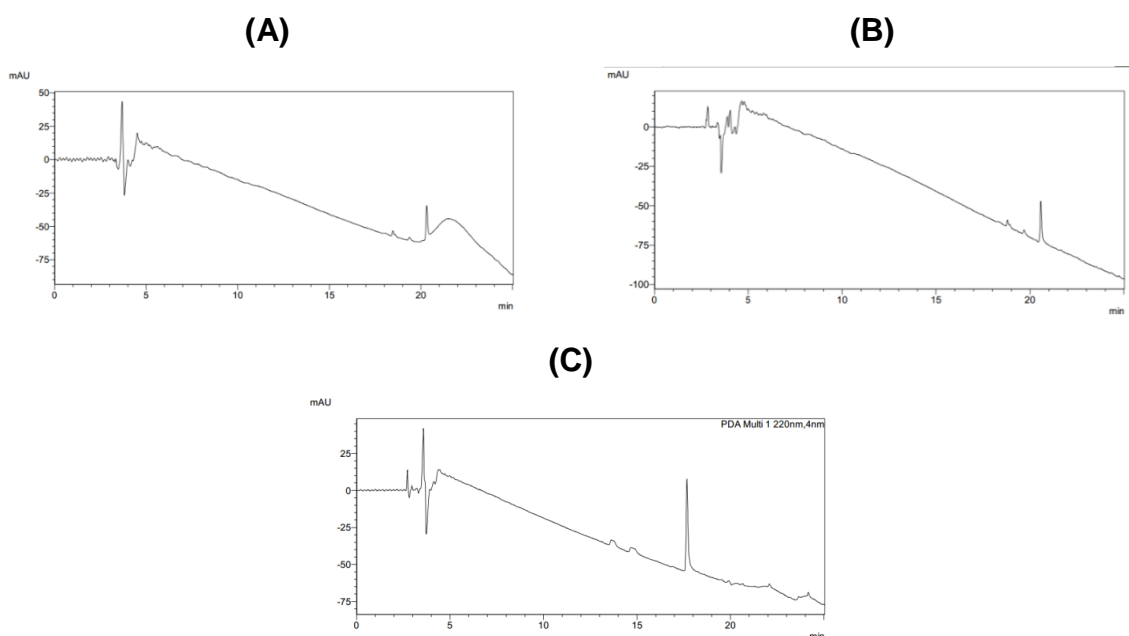
Parâmetro	INS (n = 15)	Recomendações (FDA, 1994)
Tempo de Retenção (min)	13,29 (0,26)*	CV (%) ≤ 1
Fator de cauda (T)	1,19 (2,14)*	T < 2
Número de pratos (N)	211204 (2,76)*	N > 2000

*Resultados expressos como média (CV, %). CV, coeficiente de variação expresso em %.

A avaliação dos parâmetros de *System Suitability* provém informações sobre o comportamento do sistema cromatográfico em questão. Os resultados obtidos demonstraram que há repetibilidade no tempo de retenção da INS na corrida cromatográfica ($CV < 1\%$); baixo fator de cauda ($T < 2$), que está inversamente relacionado à exatidão da quantificação, e número de pratos teóricos elevado ($N > 2000$), o qual mede a eficiência da coluna cromatográfica.

A Figura 15 mostra os cromatogramas das amostras de fase móvel, tampão fosfato salino PBS (10 mM pH 7,4) e lipossomas branco obtidos para o ensaio de seletividade.

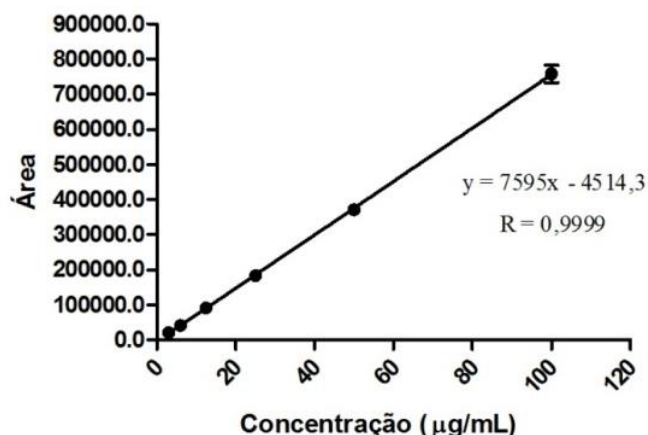
Figura 15. Cromatogramas obtidos no teste de seletividade.



(A) Fase móvel; (B) PBS (10 mM pH 7,4); (C) lipossoma sem o fármaco

Não foram observados nenhum pico no tempo de retenção próximo a $13,2 \pm 0,03$ min, referente à INS, na análise das amostras que não continham o fármaco. Desta forma, o método foi considerado seletivo para a INS.

A curva analítica de soluções de INS em fase móvel (nas concentrações de 3 a 100 $\mu\text{g/mL}$) está mostrada na Figura 16.

Figura 16. Curva analítica da INS no intervalo de concentração de 3 a 100 µg/mL.

λ Max = 220 nm. Equação da reta: $y = 7595x - 4514,3$; coeficiente de correlação linear: $r = 0,9999$.

A análise de regressão linear dos mínimos quadrados dos dados apresentados na Figura 16, com R próximo a 1, mostra que o método utilizado para quantificação da INS apresentou-se linear no intervalo de 3 a 100 µg/mL.

A precisão (CV%) e a exatidão, expressas em porcentagem de erro (ER), analisadas intra e inter-dia estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Precisão e exatidão do método analítico.

Parâmetro			INS		
Concentração nominal (µg/mL)			3	12,5	50
Intra-dia ($n^* = 4$)					
Concentração (µg/mL)	média	analisada	3,10 (0,06)	12,66 (0,38)	49,86 (0,58)
Precisão (CV, %) ⁱ⁾			2,20	3,07	1,17
Exatidão (ER, %) ⁱⁱ⁾			-3,26	-1,19	0,29
Inter-dias ($n^{**} = 2$)					
Concentração (µg/mL)	média	analisada	3,10 (0,06)	12,66 (0,38)	49,86 (0,58)
Precisão (CV, %) ⁱ⁾			2,95	1,85	1,69

ⁱ⁾Precisão expressa em coeficiente de variação (CV, %); ⁱⁱ⁾ Exatidão expressa em porcentagem de erro relativo (ER, %); *n = número de replicatas de cada concentração; **n = número de dias de análise.

Com CV e ER menores do que 5% o método pode ser considerado preciso e exato com base na RE 899 de 2003 (ANVISA, 2003).

A Tabela 4 mostra a média, desvio padrão, precisão e exatidão da análise de baixas concentrações de INS utilizadas para determinar a sensibilidade do método analítico.

Tabela 4 - Parâmetros obtidos por CLAE ($\lambda = 220$ nm) para a análise da sensibilidade do método analítico.

Concentração de INS ($\mu\text{g/mL}$)	Área*	CV (%)	ER (%)
3,0	21409 (558,7)	2,20	3,26
1,0	5873 (1597,9)	27,21	0,69
0,5	- ¹	- ¹	- ¹
0,1	- ¹	- ¹	- ¹

Precisão expressa em coeficiente de variação (CV, %); Exatidão expressa em percentagem de erro relativo (ER, %).

¹Nenhum pico identificado próximo ao tempo de retenção referente à INS (13,29 min).

Pode-se observar na Tabela 4 que a análise da solução de INS a 3 $\mu\text{g/mL}$, apresentou valores de CV e ER adequados, ou seja, inferiores ao máximo de 5% requerido para a análise ser considerada precisa e exata (ANVISA, 2003). No entanto, a análise da solução a 1 $\mu\text{g/mL}$ já apresentou valores de CV muito altos, apesar dos valores de ER serem adequados. Desta forma, a concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ foi considerada o limite de quantificação do método, enquanto o limite de detecção determinado experimentalmente foi de 1 $\mu\text{g/mL}$.

5.2 PREPARO DOS LIPOSSOMAS

Para nortear os estudos iniciais de desenvolvimento da formulação, as composições lipídicas/tensoativos mais comumente encontradas na literatura para lipossomas foram testadas. A Tabela 5 mostra o tamanho e o Pdl de lipossomas convencionais e flexíveis obtidos a partir da mistura de PC com diferentes proporções

de CH (lipossomas convencionais) e NaC (lipossomas flexíveis), além de diferentes porcentagens de agente estabilizador hidrofílico (poloxamer).

Tabela 5 - Características físico-químicas das formulações preliminares após 24 h.

Proporção lipídeos	% Poloxamer	Tamanho de Partícula (nm)	Pdl
PC:CH 1:1	0	155	0,41
PC:CH 1:1	0,03	195	0,42
PC:CH 1:1	0,1	212	0,49
PC:CH 3:1	0	194	0,39
PC:CH 3:1	0,03	185	0,37
PC:CH 3:1	0,1	209	0,37
PC:NaC 4:1	0	145	0,35
PC:NaC 4:1	0,03	132	0,27
PC:NaC 4:1	0,1	124	0,28

PC: fosfatidilcolina. CH: colesterol. NaC: colato de sódio.

É possível observar na Tabela 5 que as dispersões obtidas a partir da mistura PC:CH apresentaram tamanho de partículas variando de aproximadamente 150 nm a 210 nm e um Pdl alto (em torno de 0,4). Essas partículas foram, de maneira geral, maiores do que as obtidas a partir da mistura PC:NaC. Estas por sua vez apresentaram pequena variação de tamanho, ficando entre 120 e 150 nm, com Pdl máximo de 0,35. Ressalta-se que neste estudo inicial as partículas foram, na maioria das vezes, preparadas em experimentos únicos, sem repetições, apenas para nortear, dentre as opções encontradas na literatura, a escolha do componente e da proporção molar que gerasse as menores partículas com menor Pdl.

Com bases nos resultados preliminares, a INS foi incorporada na formulação que resultou em vesículas de menor tamanho, composta por PC:NaC 4:1 hidratado com 0,1% de poloxamer. Para efeito de comparação, a INS também foi incorporada no lipossoma convencional PC:CH estabilizado com 0,1% de poloxamer utilizando a proporção PC:CH que, com esta porcentagem de poloxamer, resultou em vesículas

de menor tamanho (PC:CH 3:1). A Tabela 6 mostra os resultados de tamanho de partícula, Pdl e potencial zeta dos lipossomas sem INS (branco) e com INS.

Tabela 6 - Características físico-químicas dos lipossomas convencionais PC:CH 3:1 e flexíveis PC:NaC 4:1, hidratados com 0,1% de poloxamer, com e sem INS, após 24 h do preparo.

Formulação	Tamanho médio de Partícula (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
PC:CH branco	204 ± 13 ^a	0,38 ± 0,07 ^a	-4 ± 4 ^a
PC:CH INS	197 ± 8 ^a	0,33 ± 0,03 ^{a,b}	-3 ± 1 ^a
PC:NaC branco	124 ± 1 ^b	0,28 ± 0,01 ^b	-11 ± 2 ^b
PC:NaC INS	129 ± 5 ^b	0,30 ± 0,02 ^{a,b}	-12 ± 2 ^b

Resultados expressos em média ± desvio padrão, n=3. ^{a,b} Valores analisados por coluna, onde letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes significam diferença estatística com $p < 0,05$ (*One-way* ANOVA, seguido de teste de comparação múltipla de Tukey).

Os lipossomas compostos por PC:NaC apresentaram tamanho médio menor do que os formados por PC:CH e potencial zeta mais negativo ($p < 0,05$), tanto na ausência como na presença de INS. O índice de polidispersão (Pdl) não foi estatisticamente significativo para ambas formulações. A adição de INS aos lipossomas não alterou significativamente seu tamanho médio, Pdl e potencial zeta.

Pelos resultados apresentados nesta primeira etapa, decidiu-se continuar os estudos posteriores apenas com os lipossomas flexíveis, obtidos a partir da associação de PC com NaC, uma vez que estes se mostraram menores e com maior potencial zeta (em módulo).

Na segunda etapa do desenvolvimento da formulação, a influência do tempo de homogeneização em HAP foi avaliada com base no tamanho e Pdl das partículas (Tabela 7).

Tabela 7 – Características físico-químicas dos lipossomas PC:NaC em função do tempo de homogeneização em HAP.

Tempo (min)	Número de Ciclos	Tamanho (nm) (média ± DP)	Pdl (média ± DP)
0	0	1337 ± 14*	0,55 ± 0,01*
5	3,5	126 ± 3	0,26 ± 0,01
10	7	121 ± 1	0,27 ± 0,01
15	10,5	116 ± 1	0,28 ± 0,01
20	14	125 ± 1	0,29 ± 0,02*

*Valor significativamente diferentes em relação aos demais tempos ($p < 0,05$). Resultados expressos em média ± desvio padrão, $n = 3$ a 4 , analisados por *One-way ANOVA*, seguido de teste de comparação múltipla de Tukey.

A passagem da dispersão no HAP reduziu significativamente o tamanho de partícula e Pdl dos lipossomas, mesmo no menor tempo de passagem (5 minutos referente a 3,5 ciclos), quando comparados às formulações que não foram submetidas à homogeneização (tempo 0). Ao se comparar os quatro tempos de passagem no equipamento, não há diferença estatística significativa ($p > 0,05$) no tamanho de partícula (nm).

Por não haver diferença estatística significativa ($p > 0,05$) no tamanho de partícula (nm) e Pdl nos diferentes tempos de passagem em HAP, padronizou-se homogeneizar a dispersão após a hidratação do filme lipídico por apenas 5 minutos à 500 Bar, de forma a reduzir a dissipação de energia no processo de obtenção das vesículas unilamelares.

A influência do processo de esterilização por filtração em membrana esterilizante (0,22 μm), após homogeneização das formulações em HAP, nas características dos lipossomas encontra-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Tamanho e Pdl das dispersões lipossomais antes e após filtração em membrana esterilizante (0,22 μm).

Formulação	Antes da filtração		Depois da filtração	
	Tamanho médio de partícula (nm)	Pdl	Tamanho médio de partícula (nm)	Pdl
PC:NaC branco	124 \pm 1	0,26 \pm 0,01	117 \pm 5	0,27 \pm 0,01
PC:NaC INS	129 \pm 5	0,30 \pm 0,02	125 \pm 3	0,27 \pm 0,01

Resultados expressos em média \pm desvio padrão, n=3, analisados por teste *t-student*, antes e depois da filtração e com ou sem INS.

Os resultados da Tabela 8 mostram que a filtração em membrana esterilizante (0,22 μm) não afetou significativamente (*t-student*, $p>0,05$) o tamanho médio e a distribuição das partículas lipossomais. Também não há diferença estatística significativa nos lipossomas branco ou contendo INS após a filtração (*t-student*, $p>0,05$).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS E DA INS

Os lipossomas compostos por PC:NaC 4:1 e 0,1% de poloxamer dispersos em PBS, pH 7,4, contendo ou não INS foram selecionados para as etapas de caracterização. Dispersão simples de INS em solução de PBS pH 7,4 contendo 0,1% de poloxamer também foi caracterizada por algumas técnicas para efeito de comparação e compreensão dos resultados.

5.3.1 Caracterização físico-química

A Tabela 9 mostra o tamanho médio, a polidispersão e o potencial zeta das dispersões de lipossomas e de INS em solução de hidratação, todos obtidos por DLS. A Figura 17 mostra a distribuição do tamanho das partículas obtidas por DLS.

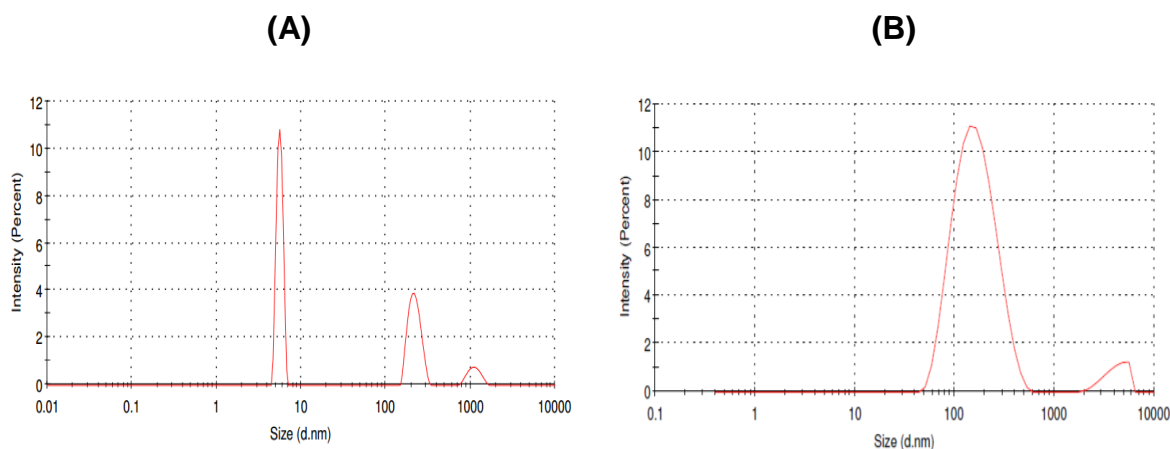
Tabela 9 - Características físico-químicas das dispersões lipossomais e de INS.

Formulação	Z-average (nm)	Tamanho de cada pico (nm) e Intensidade (%)	Pdl	Potencial zeta (mV)
PC:NaC branco	117 ± 5 ¹	Pico 1: 179 ± 87 (98%)	0,27 ±	-12 ± 0,7 ¹
		Pico 2: 5253 ± 440 (2%)	0,01 ¹	
PC:NaC INS	125 ± 3 ¹	Pico 1: 173 ± 82 (94%) Pico 2: 4187 ± 1010 (6%)	0,27 ± 0,01 ¹	-11 ± 1,5 ¹
INS em solução de hidratação*	104 ± 110 ²	Pico 1: 5,6 ± 0,5 (54,6%) Pico 2: 219 ± 35 (37,7%) Pico 3: 1111 ± 183 (7,7%)	0,5 ± 0,03 ²	-3 ± 0,2 ²

¹Resultados expressos em média ± desvio padrão, n=3, analisados por teste *t-student*.

²Resultados expressos em média ± desvio padrão, n = 3.

*PBS contendo 0,1% de poloxamer.

Figura 17. Distribuição do tamanho de partícula da dispersão de INS 0,4 mg/mL e dos lipossomas obtida por DLS.

Distribuição obtida por intensidade (técnica de DLS). (A) Dispersão de INS 0,4 mg/mL, (B) Lipossoma contendo INS (0,4 mg/mL).

Pode-se observar na Tabela 9 e na Figura 17 que a dispersão de INS na solução de hidratação (0,1% de poloxamer em PBS) apresenta-se bastante polidispersa e com mais de uma população. Quando adicionada ao lipossoma, essas partículas pequenas não eram mais observadas por DLS, mas um agregado na faixa de micrômetros, de baixa intensidade, pode ser observado, provavelmente relacionado a excesso de lipídios na formulação ou ao poloxamer. A adição da INS ao lipossoma não alterou significativamente (*t-student*, $p > 0,05$) o tamanho, a

polidispersão do lipossoma branco e nem o potencial zeta, que continuou aniônico. O pH das dispersões, todas em PBS, permaneceu entre 7,1 e 7,4.

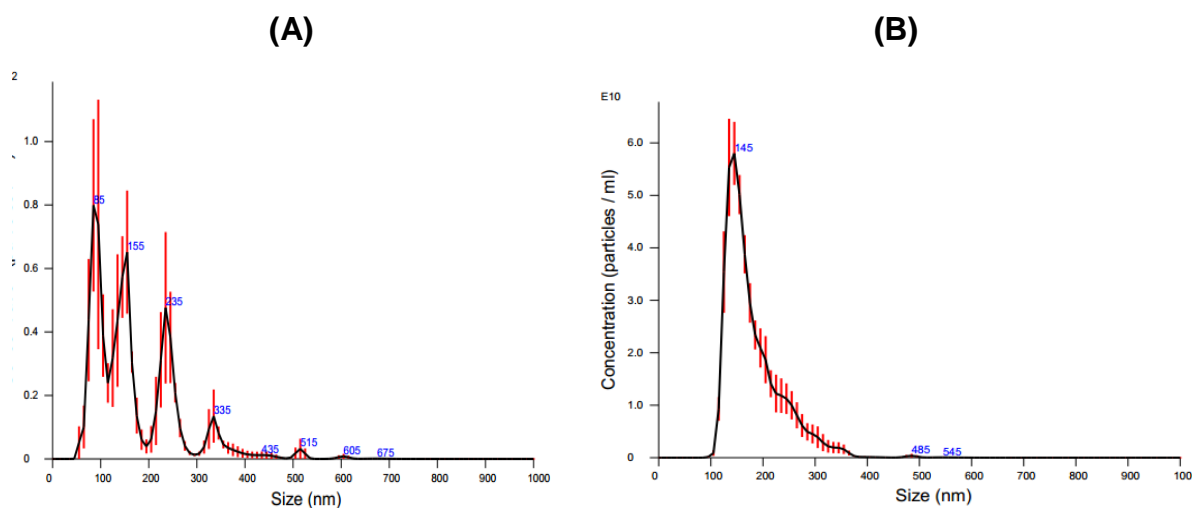
A Tabela 10 mostra os resultados de tamanho médio de partículas, polidispersão e concentração de partículas nas dispersões obtidos por NTA. A Figura 18 mostra a distribuição das partículas de INS em solução de hidratação e nos lipossomas obtida por NTA.

Tabela 10 – Tamanho, medida da dispersão de tamanho (*Span*) e concentração de partículas nas dispersões lipossomais e de INS em solução de hidratação obtidos por NTA.

Dispersão	Tamanho médio (nm)	<i>Span</i>	Concentração partículas / mL
PC:Nac branco	194 ± 5	0,79	4,5.10 ¹¹ ± 3,8.10 ¹⁰
PC:NaC:INS	181 ± 3	0,87	4,4.10 ¹¹ ± 2,3.10 ¹⁰
INS na solução de hidratação	170 ± 7	1,58	7,7.10 ¹² ± 1,1.10 ¹²

Resultados expressos em média ± desvio padrão, n=3, analisados por teste *t-student*.

Figura 18. Distribuição do tamanho de partícula da dispersão de INS 0,4 mg/mL e dos lipossomas obtida por NTA.



Distribuição obtida por intensidade (técnica de NTA). (A) Dispersão de INS 0,4 mg/mL, (B) Lipossoma contendo INS (0,4 mg/mL).

A análise por NTA mostrou que a dispersão de INS está distribuída em quatro populações diferentes, cada uma correspondendo a uma subpopulação de INS com

tamanhos superiores aos encontrados por DLS: 85, 155, 235 e 335 nm, como podem ser visualizados na Figura 18.

Quanto a análise dos lipossomas, ambas as técnicas de análise de tamanho sugeriram a presença de partículas com tamanho médio menor do que 200 nm, embora o NTA tenha fornecido um tamanho médio um pouco superior ao fornecido pela técnica de DLS, aproximadamente 180 e 120 nm, respectivamente.

Não houve diferença no tamanho médio das partículas dos lipossomas quando comparado com o tamanho médio das partículas de INS em solução de hidratação na análise por NTA, apesar da polidispersão da dispersão de INS ser consideravelmente maior do que a apresentada pelas dispersões lipossomais. Os valores referentes aos volumes cumulativos dos diâmetros mostraram que 90% das vesículas PC:NaC e PC:NaC INS apresentaram tamanho médio menor do que 261 ± 11 nm e 253 ± 11 nm, respectivamente. Já a análise das dispersões de INS sem lipossoma mostraram que 90% das partículas apresentaram tamanho menor do que 289 ± 27 nm.

Não houve diferença significativa entre a concentração de partículas presentes nos lipossomas. A concentração de partículas presentes na dispersão de INS, que continha a mesma concentração de INS que os lipossomas, no entanto, foi uma ordem de grandeza maior do que a apresentada pelos lipossomas.

5.3.2 Eficiência de encapsulação (EE,%) e recuperação do fármaco (RF,%)

A Tabela 11 mostra a *EE, % corrigida* da INS no lipossoma PC:NaC assim como a %RF usando a técnica de separação em filtro AMICON e quantificação por CLAE.

Tabela 11 – Recuperação do fármaco (RF,%) e eficiência de encapsulação (EE,% corrigida) obtida pela técnica de filtração e centrifugação em membrana AMICON.

Formulação	EE (% , corrigida)*	RF (%)
PC:NaC 4:1 INS	32 ± 2	82 ± 12

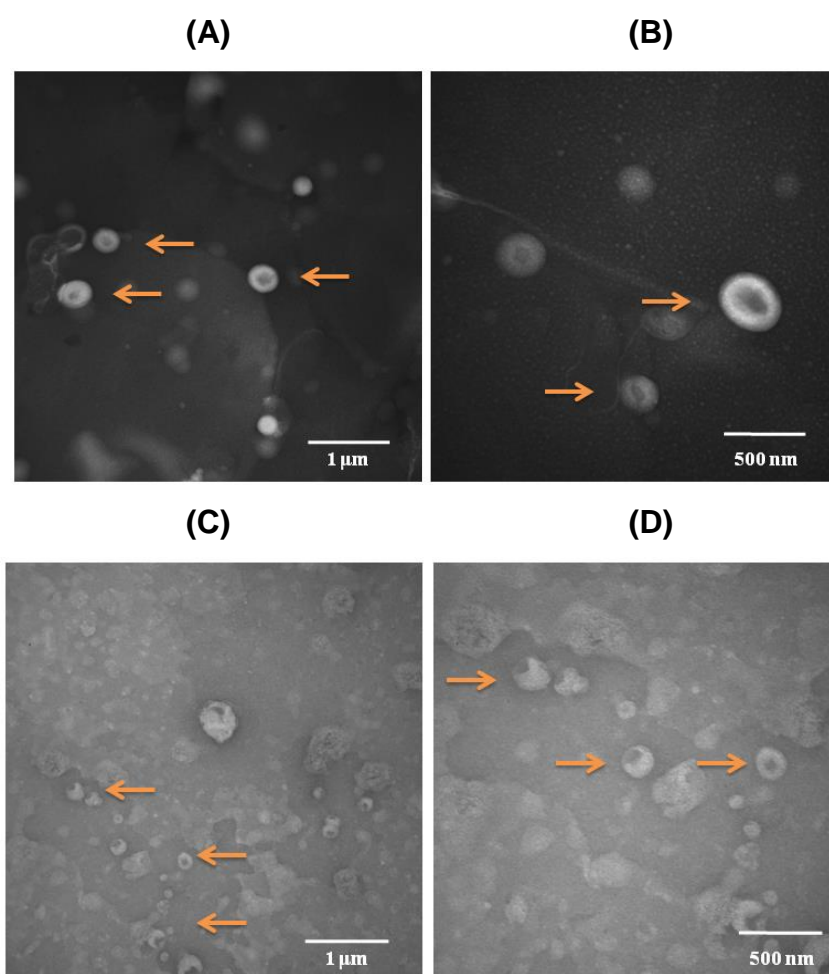
*Após cálculo com fator de correção obtido após filtração de uma dispersão de INS em solução de hidratação. Resultados expressos em média \pm desvio padrão, n=3.

A eficiência de encapsulação (EE,%) para INS obtida pela técnica de filtração em membrana Amicon foi de $90 \pm 5\%$, obtida através da Equação VIII. Entretanto, o percentual de recuperação do controle de INS em solução de hidratação de mesma concentração dos lipossomas (0,4 mg/mL) foi de $36 \pm 1\%$, o que nos dá um fator de correção de 0,36 (Equação IX). Dessa forma, o valor da EE(%) foi corrigido através da Equação X, sendo o valor final de $32 \pm 2\%$.

5.3.3 Análises morfológicas (MET e MFA)

A Figura 19 mostra as fotomicrografias dos lipossomas contendo ou não INS obtidas por MET.

Figura 19. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos lipossomas (PC:NaC branco e PC:NaC INS).

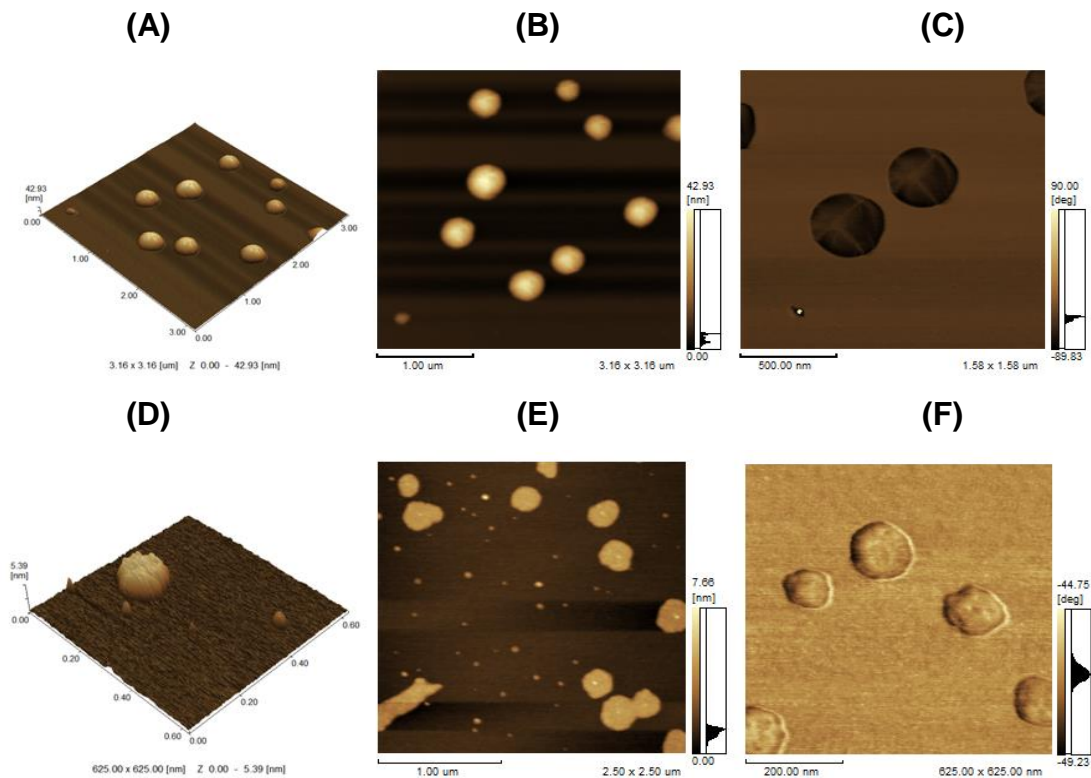


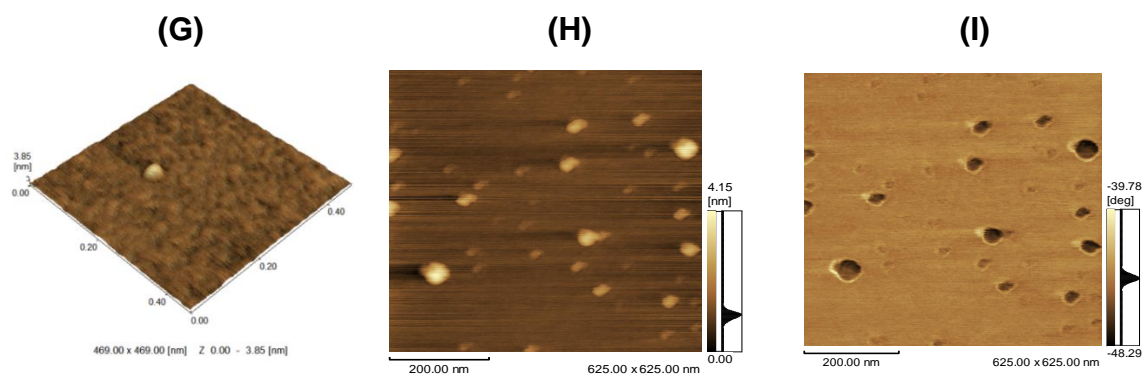
Lipossoma branco (PC:NaC branco) obtidas após aumento de 50 000 vezes (A) e 100.000 vezes (B); Lipossoma INS (PC:NaC INS) obtidas após aumento de 50 000 vezes (C) e 100.000 vezes (D). As setas laranja indicam a presença de vesículas lipossomais.

É possível observar na Figura 19 vesículas unilamelares com bordas não coradas, referentes às bicamadas lipídicas (indicadas pelas setas laranja). Nas amostras contendo INS (PC:NaC INS) (Figura 19-C e 19-D), observam-se ainda bordas irregulares, em comparação com as Figuras 19-A e 19-B referentes aos lipossomas brancos com morfologia mais homogênea. As imagens mostram partículas de diâmetro médio aproximado entre 120-150 nm.

Na Figura 20 é possível visualizar as fotomicrografias dos lipossomas (PC:NaC branco e PC:NaC INS) e da INS em solução de hidratação.

Figura 20. Fotomicrografias obtidas por microscopia de força atômica (MFA) modo contato-intermitente dos lipossomas (PC:NaC branco e PC:NaC INS) e da INS em solução de hidratação.





Lipossomas branco (PC:NaC branco) (A, B, C); lipossoma INS (PC:NaC INS) (D, E, F) e dispersão de INS (G, H, I) adsorvidos na superfície de mica. Representação topográfica tridimensional (A, D, G), topográfica bidimensional (B, E, H) e modo fase (C, F, I).

A análise de MFA também forneceu resultados de diâmetro máximo médio (nm), raio médio (nm) e volume médio (nm) (Tabela 12). A fim de comparação, os valores de tamanho médio (*Z-average*) obtidos por DLS para o mesmo lote de partículas também estão expressos abaixo.

Tabela 12 – Resultados obtidos de tamanho de partícula por MFA.

Formulação	Diâmetro máximo médio (nm)	Raio médio (nm)	Volume médio (nm ³)	<i>Z-average</i> DLS (nm)/Pdl
PC:NaC branco*	200 ± 0,05	86 ± 0,02	154213 ± 127501	155 ± 1,4
PC:NaC INS**	116 ± 0,03	51 ± 0,01	30534 ± 16140	159 ± 2
INS	27 ± 0,01	11 ± 0,01	657 ± 886	104 ± 111

Resultados expressos em média ± desvio padrão, *n=20; **n=15, analisados por teste *t-student*.

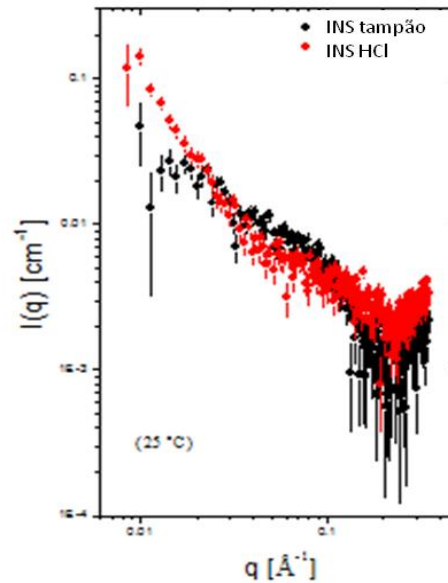
Pode-se observar na Tabela 12 que o tamanho das partículas obtidos por MFA são condizentes com os obtidos pelo DLS; menores do que 200 nm para os lipossomas e próximos a 30 nm para a INS. Por MFA, pode-se observar que tanto o diâmetro como o volume dos lipossomas que contem INS são menores do que os que não contém o fármaco.

A análise da polidispersão de INS sem lipossoma por MFA mostra mais uma vez a heterogeneidade da dispersão aquosa desta macromolécula.

5.3.4 Estudo de difração de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

A Figura 21 apresenta os dados para a INS medida a temperaturas de 25°C dispersa em solução de hidratação e em meio ácido (HCl 0,01 M).

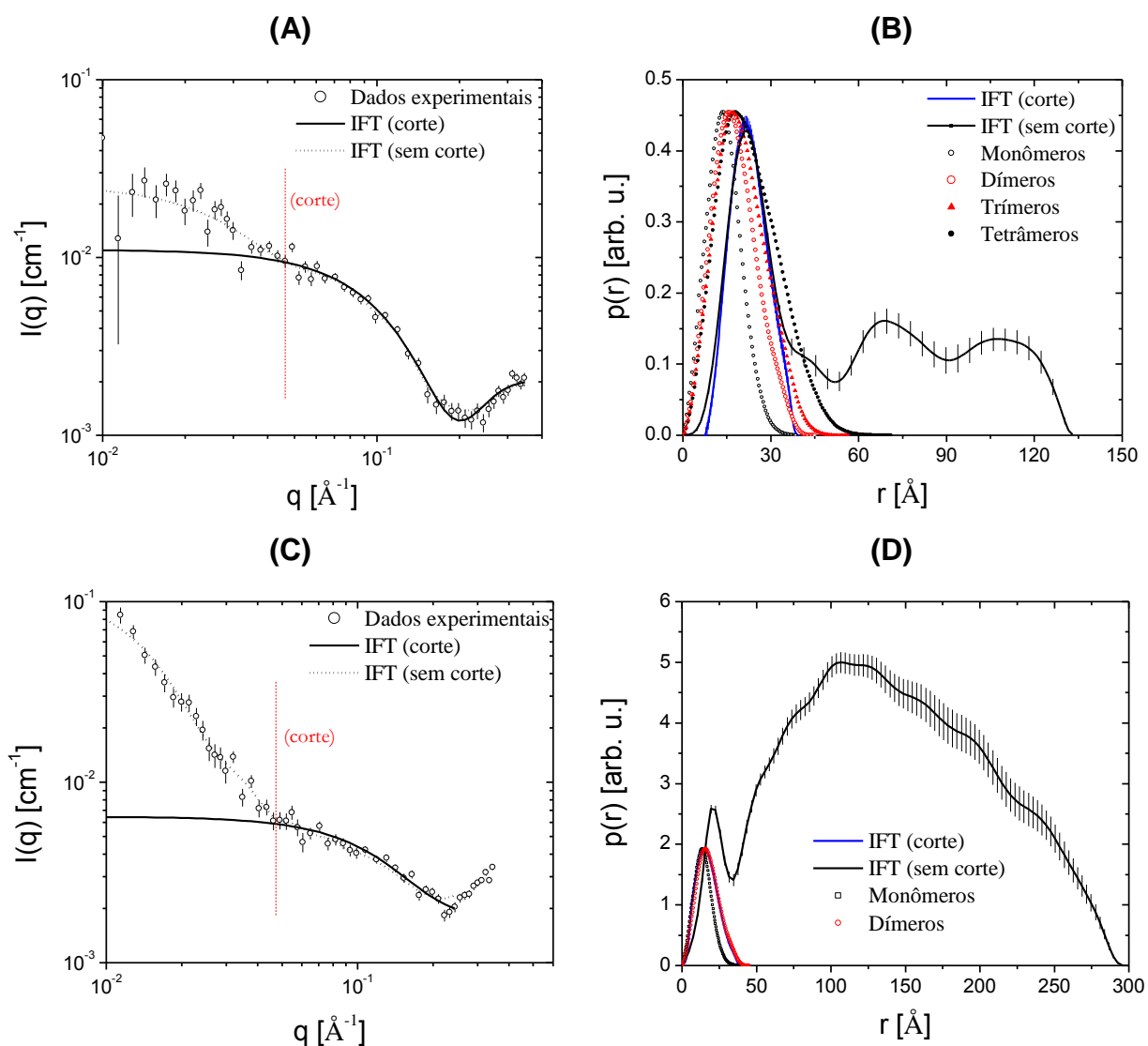
Figura 21. Perfil de espalhamento SAXS para INS a 25°C.



Espectro de SAXS para INS em solução de hidratação (PBS contendo 0,1% de poloxamer, pH 7,4) (em preto) e em meio ácido (HCl 0,1M) (em vermelho). Intensidade de radiação espalhada $I(q)$ em função do vetor de onda (q).

A Figura 22 mostra as curvas tratadas por IFT para posterior cálculo da função $\rho(r)$.

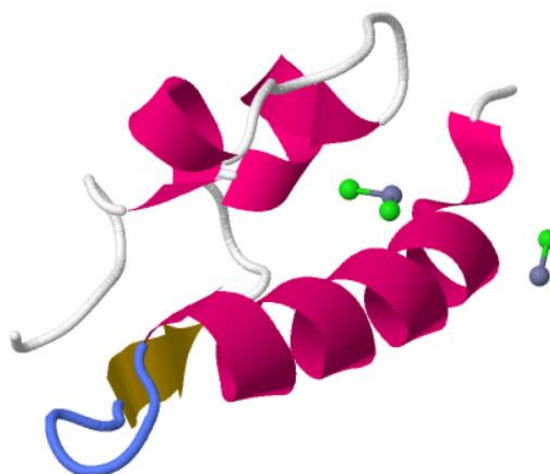
Figura 22. Ajuste das curvas experimentais de SAXS da INS (em PBS e meio ácido) usando o procedimento Transformada Indireta de Fourier (IFT).



Ajuste IFT dos dados experimentais de INS em PBS (solução de hidratação) (A) e em meio ácido (HCl) (C). Funções $p(r)$ obtidas a partir dos ajustes IFT dos dados experimentais em meio PBS (B) e ácido (D). Para comparação, estão mostradas também as curvas $p(r)$ para monômeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros da proteína INS as quais foram obtidas a partir da modelo *Protein Data Bank* (PDB) da INS (Figura 23).

A Figura 23 mostra o modelo tridimensional da INS usado para determinar as funções $p(r)$ de monômeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros.

Figura 23. Modelo tridimensional da proteína INS.



Fonte: *Protein Data Bank* (PDB), 1997.

Na Figura 22-A e 22-C estão mostrados os ajustes IFT e as curvas $p(r)$ obtidas para os sistemas INS em PBS (10 mM pH 7,4) e INS em HCl 0,1M. Nos dois casos, a curva experimental apresenta uma taxa maior de crescimento dos valores de intensidade para $q < 0,045 \text{ \AA}^{-1}$, indicando a presença de grandes agregados. Com isso em mente, é possível que populações monoméricas de INS coexistam com populações diméricas, triméricas, etc. Por esse motivo foi feito, para cada sistema, dois ajustes IFT: Um considerando toda a curva, nomeado “IFT (sem corte)”, e o outro considerando apenas a parte da curva correspondente à $q > 0,045 \text{ \AA}^{-1}$, nomeado de “IFT (corte)” (Figura 22-B e 22-D).

A Tabela 13 apresenta os valores de $I(0)$ (intensidade extrapolada para $q = 0$) oriundos dos ajustes IFT bem como as MM para cada caso, calculados conforme descrito no item 4.4.6.

Tabela 13 - Resultados dos valores de intensidade extrapolada para $q = I(0)$, obtidos a partir do procedimento IFT (Figura 22-A e 22-C) bem como as massas moleculares (MM) calculadas para cada caso usando-se a Equação XV.

Amostra	$I(0) [cm^{-1}]$	$C [\frac{mg}{mL}]$	MM [kDa]	$\frac{MM}{MM_{1monômero}}$
INS em PBS (IFT corte)	$9,05 \cdot 10^{-3}$	0,4	34,04	~6
INS em PBS(IFT sem corte)	$2,36 \cdot 10^{-2}$	0,4	88,92	~15
INS meio ácido (IFT corte)	$4,63 \cdot 10^{-3}$	0,4	17,43	~3
INS meio ácido (IFT sem corte)	$1,15 \cdot 10^{-1}$	0,4	433,60	~75

C: concentração da proteína em mg/mL. MM: massa molecular

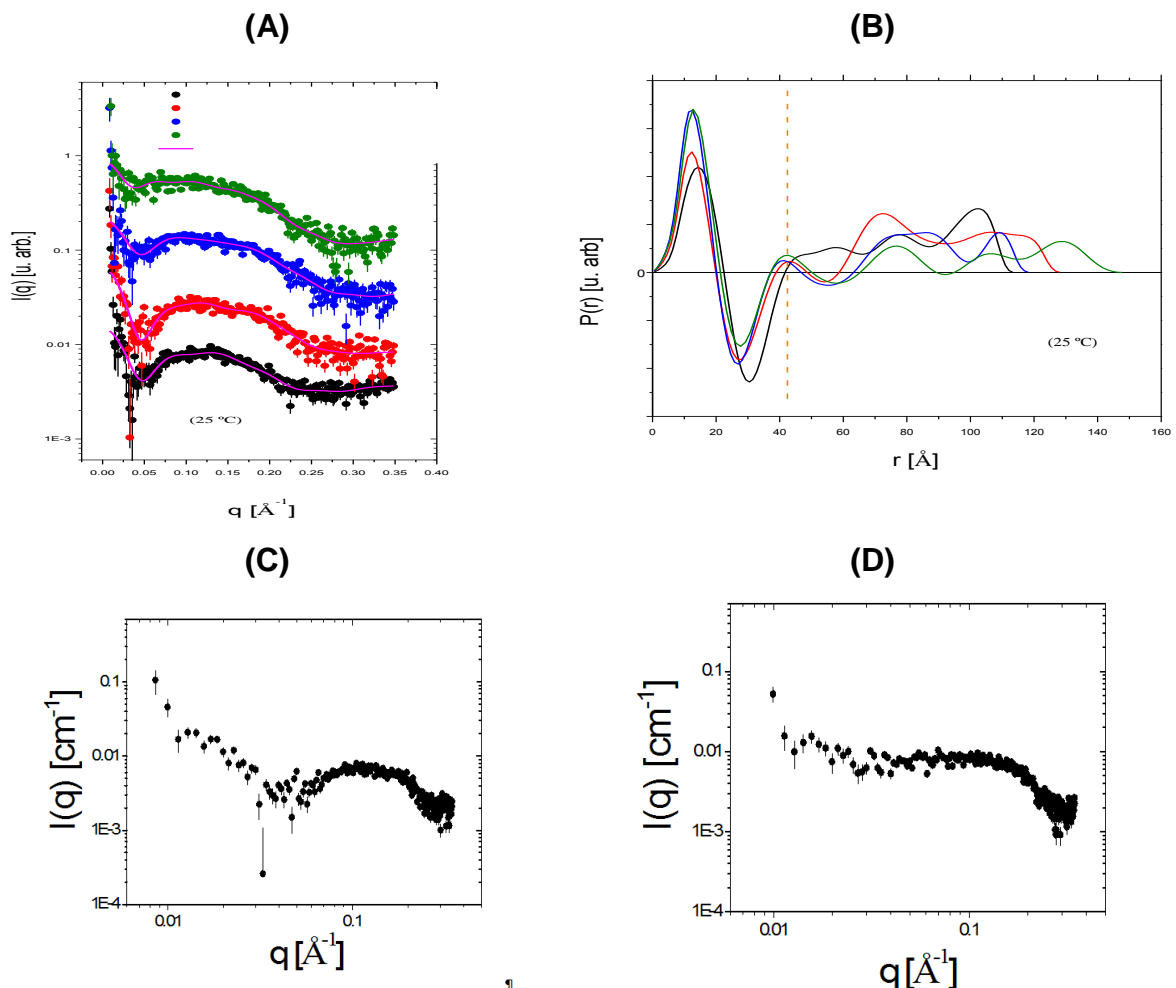
Para o sistema INS em PBS (10 mM pH 7,4), o ajuste IFT de toda a curva gerou uma função $p(r)$ que apresentou um pico inicial em torno de $r = 20 \text{ \AA}$ seguido de picos menores (Figura 22-B). A abcissa $r = D$ para a qual $p(D) = 0$ informa o tamanho máximo das partículas espalhadoras. Nesse caso, é possível concluir que as partículas possuem tamanho médio máximo de aproximadamente $D \approx 130 \text{ \AA}$. Já se considerarmos o ajuste IFT apenas de parte da curva (desconsiderando os pontos no intervalo $q < 0,045 \text{ \AA}^{-1}$), a função $p(r)$ possui o formato semelhante ao do pico inicial da função $p(r)$ anterior (com $D \approx 40 \text{ \AA}$), o qual é bastante semelhante às curvas $p(r)$ simuladas para monômeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros a partir do modelo *Protein Data Bank* (PDB) da INS mostrado na Figura 23. Os outros picos correspondem a outras formas agregadas da INS, que são maiores. Contudo, pela intensidade da $p(r)$, elas não são tão predominantes quanto às formas anteriores.

Para o sistema INS em meio ácido a função $p(r)$ obtida do ajuste IFT de toda a curva experimental possui também um pico inicial seguido de outro maior e largo (Figura 22-D). Por meio dessa curva, é possível concluir que as partículas apresentam tamanho médio máximo de aproximadamente $D \approx 300 \text{ \AA}$. Se, entretanto, considerarmos apenas parte da curva experimental no ajuste IFT, a função $p(r)$

obtida é a de um pico simples (com $D \approx 45 \text{ \AA}$), o qual coincide exatamente com a função $p(r)$ simulada para dímeros (Figura 22-D). Portanto, para esse caso, sabe-se que uma das populações é certamente formada por dímeros, diferentemente do sistema anterior, em PBS, que aparentemente apresenta uma mistura mais heterogênea de populações constituídas por diferentes estados de agregação da INS.

As curvas dos lipossomas obtidas após análise SAXS a 25°C , tratadas por IFT, estão representadas na Figura 24.

Figura 24. Ajuste das curvas experimentais de lipossomas usando o procedimento IFT, medidos na temperatura de 25°C .



(A e B) Linhas preto e vermelha: lipossoma branco (PC:NaC branco); linhas azul e verde: lipossoma INS (PC:NaC INS). Ajuste das curvas experimentais após procedimento IFT (A). Funções $p(r)$ obtidas a partir dos ajustes (B). (C e D) Comparação entre as curvas para o lipossoma branco (C) e lipossoma INS(D).

A Figura 24-A representa os dados dos sistemas lipossomais estudados à temperatura de 25°C, enquanto que a Figura 24-B traz as funções $p(r)$ após modelagem indireta dos dados (IFT).

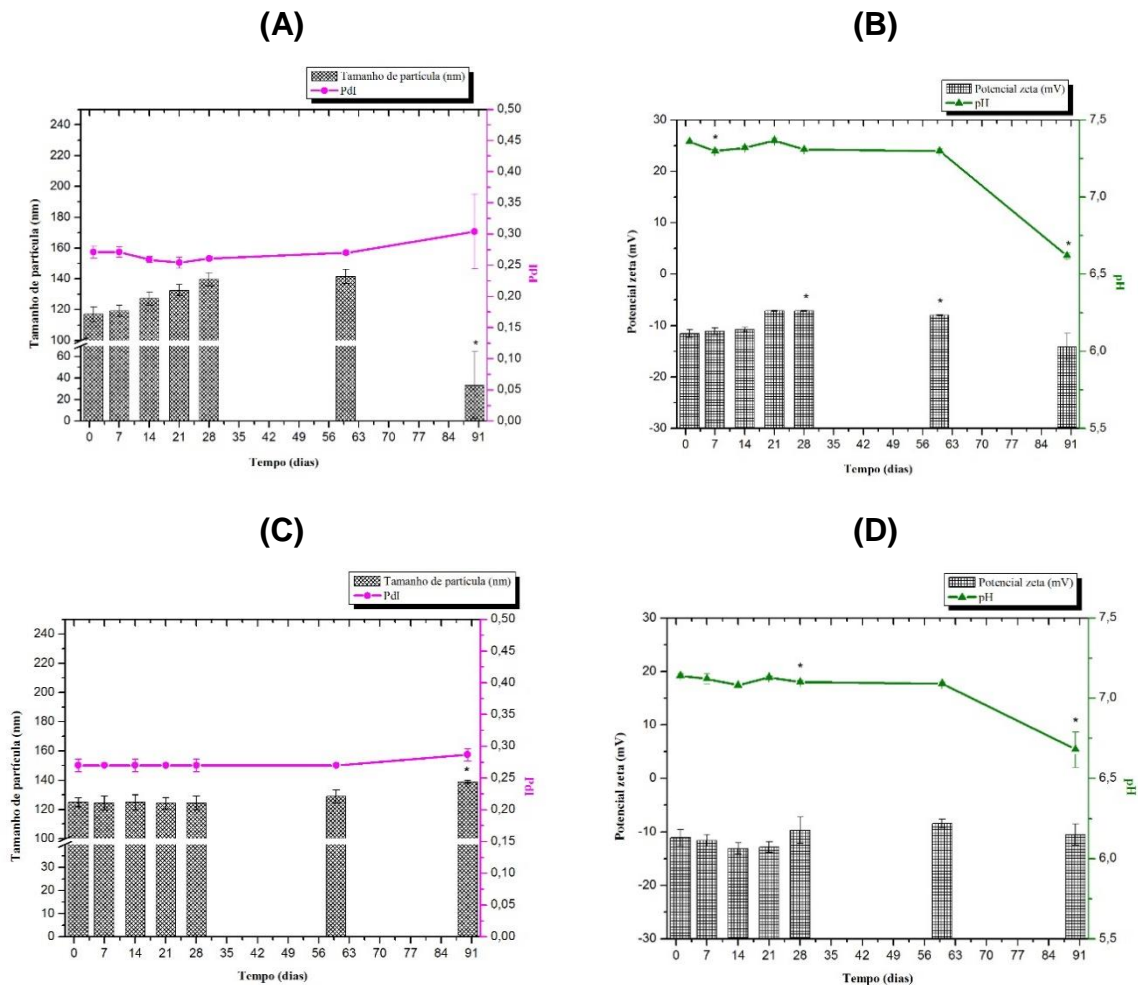
De acordo com o perfil das curvas, é possível afirmar que são lipossomos unilamelares (formados por apenas uma bicamada lipídica), e que apresentam simetria em sua bicamada (OLIVEIRA, 2005; OSELIERO-FILHO, 2013). Para corroborar com essa afirmação, as curvas foram ajustadas por IFT e a função $p(r)$ visualizada. Observando a Figura 24-B pode-se afirmar que as curvas apresentam semelhanças, principalmente nas suas porções iniciais. A linha tracejada na figura indica, de maneira aproximada, a espessura da bicamada lipídica, que no caso ficou em torno de 42 Å para todas as curvas (Figura 24-B).

As Figuras 24-C e 24-D apresentam uma comparação entre curvas para lipossomos em diferentes composições, branco e contendo INS, respectivamente. Pela análise das figuras, percebe-se que a curva SAXS para o sistema PC:NaC sofre alterações em $q > 0,2 \text{ \AA}^{-1}$. Por outro lado, ao se adicionar INS ao sistema, observam-se alterações na curva de SAXS para $q < 0,2 \text{ \AA}^{-1}$ (Figura 24-D).

5.4 ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS E DA INS

A Figura 25 mostra os resultados de estabilidade física (tamanho de partícula, Pdl, potencial zeta e pH) em função do tempo dos lipossomos PC:NaC branco e PC:NaC INS armazenados a 4°C por até 90 dias.

Figura 25. Estabilidade física em função do tempo para os lipossomas PC:NaC branco e PC:NaC INS.



Lipossoma branco (A e B); lipossoma INS (C, D). Os gráficos (A, C) mostram tamanho de partícula (nm) e PDI; enquanto (B, D) potencial zeta (mV) e pH.

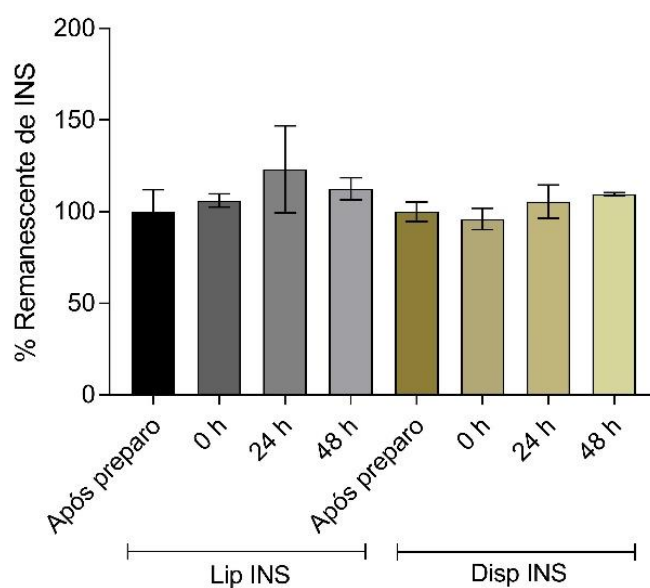
*Valor significativamente diferente em relação ao tempo inicial de experimento ($p < 0,05$). Resultados expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$, analisados por *One-Way ANOVA*, seguido de teste de comparação múltipla de Tukey.

Os lipossomas apresentaram-se estáveis em relação ao tamanho de partícula por até 60 dias ao serem armazenados a 4°C. No tempo de 90 dias, os lipossomas brancos apresentaram queda do tamanho médio de partícula para 33 ± 30 nm ($p < 0,05$), enquanto os lipossomas contendo INS apresentaram aumento significativo de tamanho médio das partículas ($p < 0,05$) (tamanho inicial de 124 ± 3 nm e final de 138 ± 1 nm). O índice de polidispersão não variou significativamente para ambos os lipossomas, enquanto que o potencial zeta apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) para o tempo de 28 e 60 dias para o lipossoma branco. Por sua vez, o lipossoma contendo INS não apresentou variação estatística significativa de seu

potencial zeta. Já o pH das formulações variou nos tempos 7 e 90 dias para o lipossoma branco e 28 e 90 para o lipossoma contendo INS ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos para estabilidade química da INS por 48 h estão expressos na Figura 26.

Figura 26. Porcentagem remanescente de INS em função do tempo de armazenamento do lipossoma PC:NaC INS e da dispersão de INS em PBS, a temperatura ambiente (25 °C).



Lip: lipossoma. Disp: dispersão.

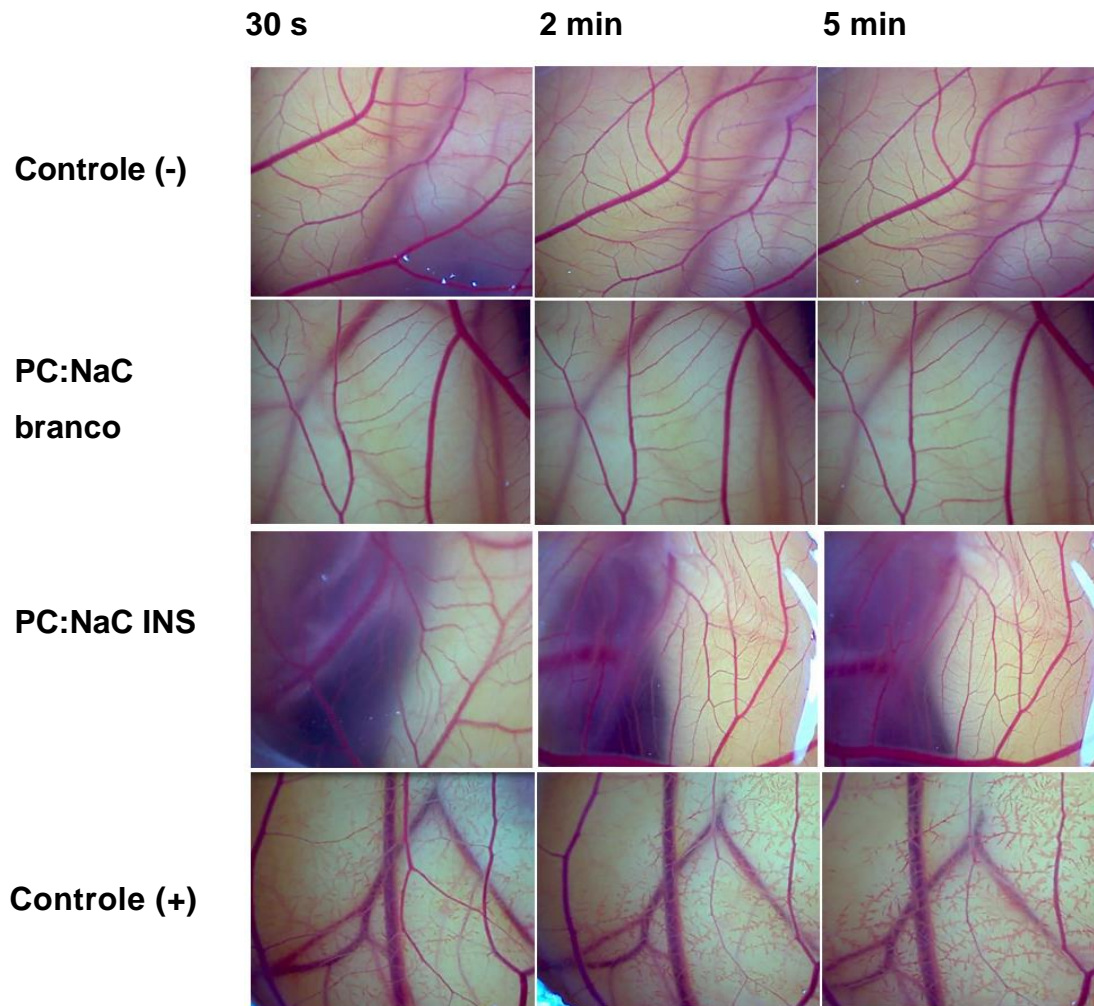
Resultados expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$, analisados por *One-Way ANOVA*, seguido de teste de comparação múltipla de Tukey.

Não houve variação estatística significativa para nenhum tempo de armazenamento, nem para a dispersão de INS nem para a formulação PC:NaC INS, indicativo de estabilidade química da INS para até 48 h à temperatura ambiente.

5.5 ENSAIO DE IRRITAÇÃO OCULAR *IN VITRO* – HET-CAM

As imagens obtidas durante a avaliação da CAM pelos tempos de 30 s, 2 min e 5 min após aplicação das amostras estão expostas na Figura 27.

Figura 27. Avaliação da irritação da membrana corioalantóide com ovos embrionados após contato com as dispersões lipossomais testadas.



Controle negativo corresponde a solução salina pH fisiológico e controle positivo à solução 10% dodecil sulfato de sódio (SDS).

O P atribuído por cada um dos pesquisadores que avaliou os fenômenos de hiperemia, hemorragia e coagulação na CAM após adição de cada uma das formulações encontra-se na Tabela 14.

Tabela 14 - Pontuação média (P) atribuída para as formulações testadas quanto aos fenômenos de hiperemia, hemorragia e coagulação observados na CAM por dois pesquisadores diferentes.

Formulação	Pesquisador 1	Pesquisador 2
PC:NaC branco	0,33 ± 0,58	0
PC:NaC INS	1,25 ± 1,26	2,25 ± 1,5
Controle NaCl 0,9%	0	0
Controle SDS 10%	12	12

Resultados expressos em média ± desvio padrão, n=3

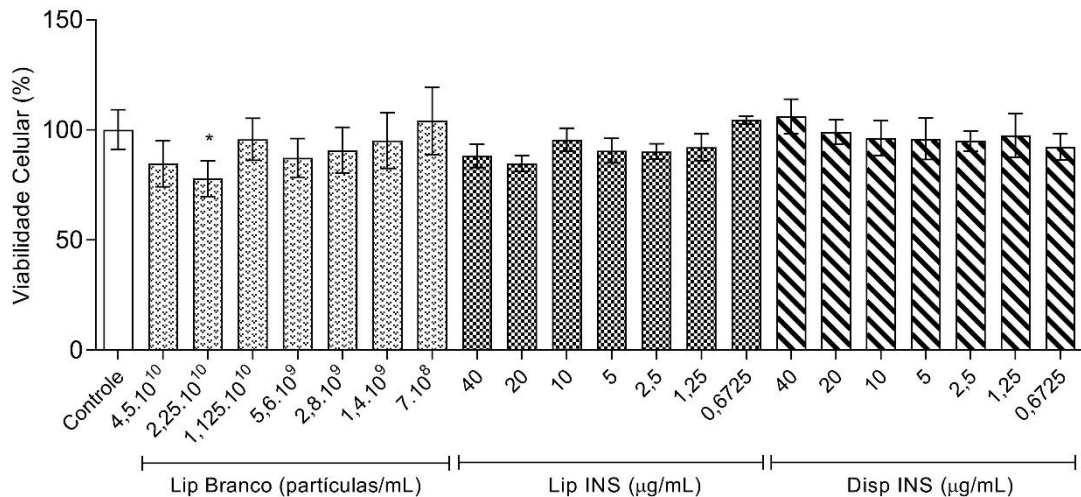
Desta forma, de acordo com Luepke e Kemper (1986) e Luepke (1986), conforme indicado no Quadro 4, o lipossoma branco pode ser classificado como praticamente não irritante, enquanto que o PC:NaC INS pode ser classificado como ligeiramente irritante.

5.6 ESTUDOS *IN VITRO* EM CULTURA DE CÉLULAS EPITELIAIS DA CÓRNEA HUMANA

5.6.1 Citotoxicidade das formulações

A Figura 28 representa a viabilidade celular (%) das células HCE-SV40 após incubação por 24 h com diferentes concentrações de partículas (lipossoma branco) e INS (lipossoma INS e dispersão simples de INS).

Figura 28. Citotoxicidade do lipossoma Branco, na faixa de concentração de $4,5 \cdot 10^{10}$ a $7 \cdot 10^8$ partículas por mL, do lipossoma com INS, na faixa de concentração de $4,4 \cdot 10^{10}$ a $6,5 \cdot 10^8$ partículas por mL (correspondentes às concentrações de INS de 40 a $0,672 \mu\text{g/mL}$), e da dispersão de INS, na faixa de concentração de 40 a $0,672 \mu\text{g/mL}$, nas células da linhagem HCE-SV40.



Lip: lipossoma; Disp: dispersão.

*Valor $p < 0,05$. Resultados expressos em média \pm desvio padrão, $n=4$, analisados por One-Way ANOVA, seguido de teste de comparação múltipla de Tukey, comparado ao controle somente células, comparado ao controle somente células.

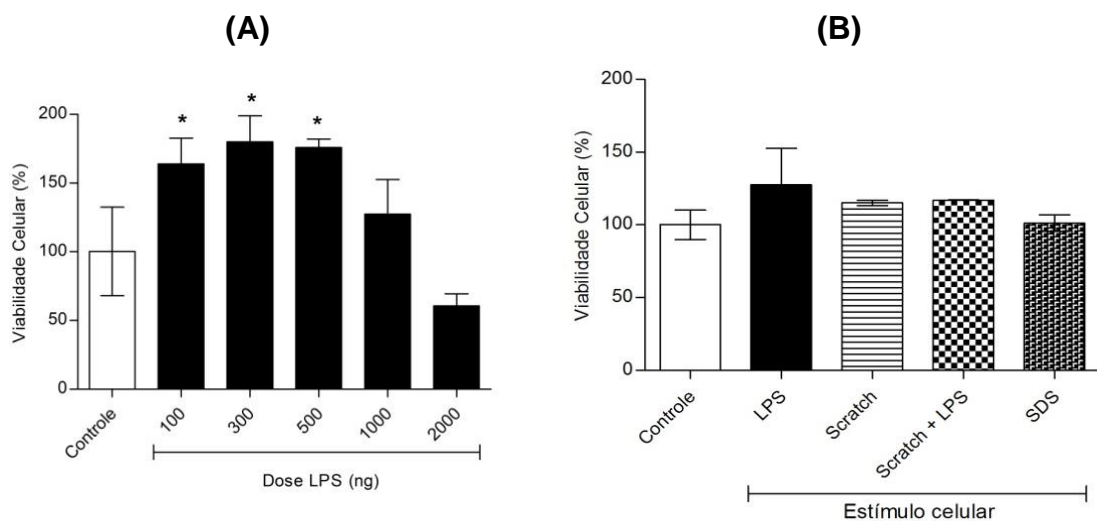
A Figura 28 mostra que o lipossoma branco na concentração de $2,25 \cdot 10^{10}$ foi o que mais afetou a viabilidade celular ($78 \pm 8\%$), sendo a única concentração testada a diminuir com diferença estatística significativa o número de células viáveis em relação ao controle ($p < 0,05$). Já a maior morte celular observada para o tratamento com o lipossoma INS foi de $15 \pm 4\%$ para a concentração de INS de $20 \mu\text{g/mL}$, porém sem diferença estatística significativa em relação ao controle. A dispersão de INS manteve a viabilidade celular próxima a 100% (variando entre 92 a 106%).

5.6.2 Estímulo das células para produção de mediadores do processo inflamatório

As células foram estimuladas com diferentes protocolos com o intuito de verificar a produção de diferentes mediadores do processo inflamatório. A Figura 29

mostra a viabilidade das células HCE-SV40 em relação ao estímulo com LPS, *scratch* com ponteira e SDS.

Figura 29. Estudo de viabilidade celular da cultura de células HCE-SV40 avaliada pelo método de vermelho neutro após estímulo inflamatório com diferentes concentrações de LPS (A) e com 1000 ng de LPS, seguido ou não de *scratch* com ponteira, ou com SDS 0,5% (B).



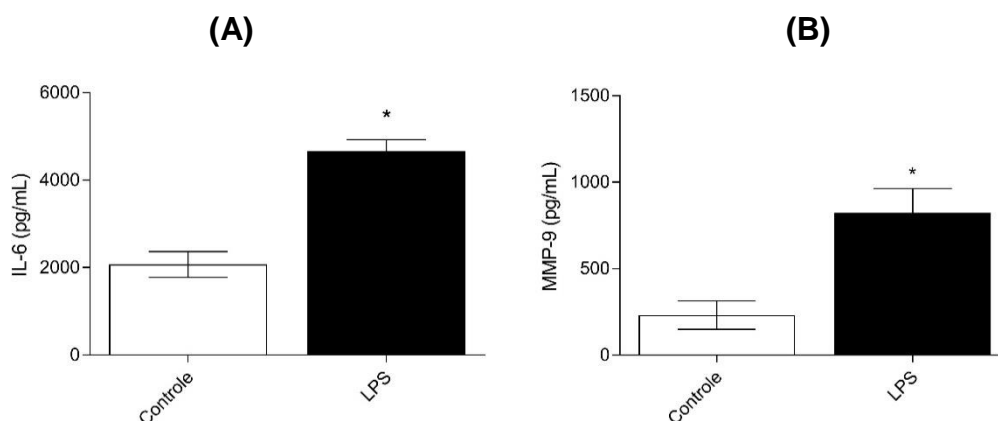
*Valor $p < 0,05$. Resultados expressos em média \pm desvio padrão, $n=4$, analisados por *One-Way ANOVA*, seguido de teste de comparação múltipla de Tukey, comparado ao controle somente células.

O estímulo das células HCE-SV40 com as diferentes doses de LPS não resultou em morte celular, com exceção da dose de 2000 ng (concentração final no poço de 4000 ng/mL), que matou $60 \pm 9\%$ das células. O estímulo com a dose de 1000 ng (concentração final no poço de 2000 ng/mL) não apresentou diferença estatística significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle e, portanto, foi a escolhida para ser comparada ou associada ao estímulo de *scratch*. Estes estímulos e o estímulo com SDS na concentração de 0,5% não foram citotóxicos para as células quando avaliados pelo método do vermelho neutro (Figura 29-B).

Todos os protocolos de estímulo, com exceção daquele com LPS que provocou citotoxicidade celular (4000 ng/mL de LPS), foram aplicados as células para monitorar a expressão de IL-1 β e TNF- α . Nenhum deles, no entanto, foi suficiente para permitir a quantificação dos mediadores IL-1 β e TNF- α dentro do limite de detecção dos kits ELISA usados.

A Figura 30 mostra a expressão de IL-6 e metaloproteinase de matriz MMP-9 após estímulo com 2000 ng/mL de LPS.

Figura 30. Expressão de marcadores inflamatórios na cultura de células HCE-SV40 estimulada com 2000 ng/mL de LPS por 24 h.



A) IL-6 e B) MMP-9.

*Valor $p < 0,05$. Resultados expressos em média \pm desvio padrão, $n=4$, analisados por *One-Way ANOVA*, seguido de teste de comparação múltipla de Tukey, comparado ao controle somente células.

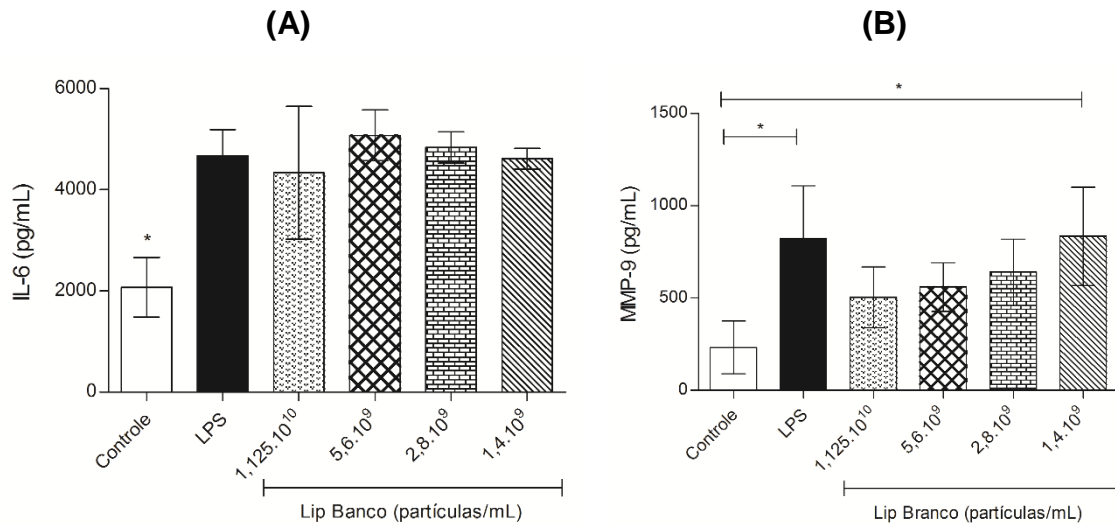
Pode-se observar na Figura 30 que após o tratamento com 2000 ng/mL de LPS e incubação por 24 h, as células HCE-SV40 apresentaram aumento aproximado de 2,25 vezes na concentração de IL-6 basal (em comparação com o controle) ($p < 0,05$). Já para a MMP-9, houve aumento de cerca de 3,5 vezes na concentração do mediador em relação ao controle, também com diferença estatística ($p < 0,5$).

Como o tratamento com 2000 ng/mL de LPS por 24 h foi suficiente para as células da linhagem HCE-SV40 expressarem IL-6 e MMP-9 em quantidades detectáveis, este estímulo foi o utilizado para a avaliação das células submetidas ao contato com as formulações.

5.6.3 Tratamento das células com as formulações desenvolvidas

A Figura 31 mostra os resultados obtidos com o protocolo A de tratamento, onde se avaliou a influência de diferentes concentrações do lipossoma branco na expressão de IL-6 e MMP-9 pelas células HCE-SV40 estimuladas com LPS.

Figura 31. Expressão de mediadores inflamatórios na cultura de células HCE-SV40 após estímulo com LPS e tratamento com diferentes concentrações de lipossoma branco por 24 h.

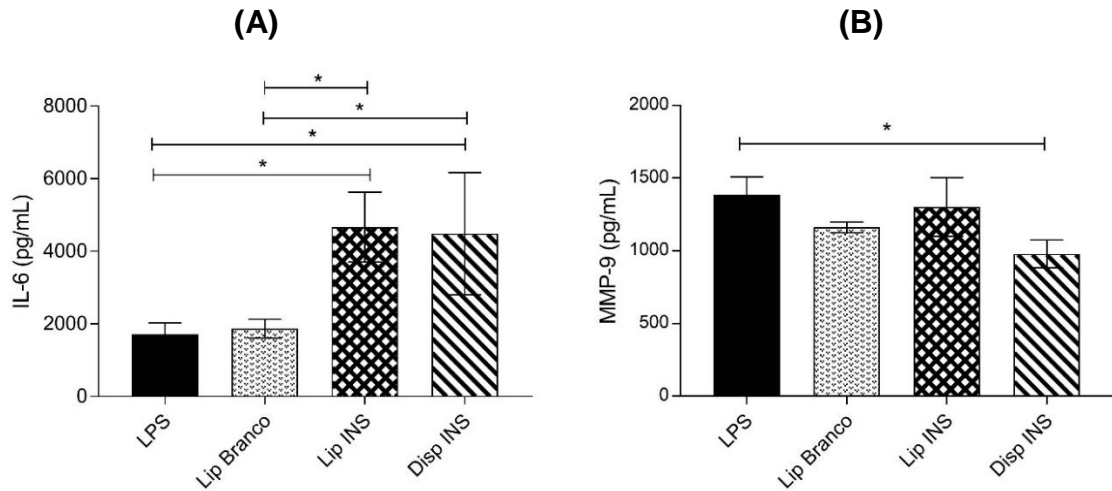


A) IL-6 e B) MMP-9. Mediadores quantificados após protocolo A. Lip: lipossoma.
*Valor $p < 0,05$. Resultados expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$, analisados por *One-Way ANOVA*, seguido de teste de comparação múltipla de *Tukey*, comparado ao controle somente células.

Comparado com o grupo controle (células HCE sem estímulo pró-inflamatório), a expressão de IL-6 e MMP-9 aumentou nas células tratadas com LPS. O tratamento das células estimuladas com LPS com o lipossoma branco não alterou a expressão da IL-6, mas resultou em aparente diminuição (*downregulation*) da MMP-9 em função da concentração do lipossoma. A maior concentração de partículas (1.10^{10} partículas/mL) foi capaz, por exemplo, de diminuir 1,63 vezes o nível de MMP-9 em relação ao controle LPS, mas sem variação estatística significativa ($P > 0,05$).

A Figura 32 mostra a expressão de IL-6 e MMP-9 pelas células HCE-SV40 após estímulo com LPS e tratamento com 4.10^9 partículas/mL de lipossoma branco e lipossoma contendo INS por 24 h.

Figura 32. Expressão de mediadores inflamatórios na cultura de células HCE-SV40 após estímulo com LPS e tratamento com $4 \cdot 10^9$ partículas/mL de lipossoma branco e lipossoma contendo INS por 24 h.



A) IL-6 e B) MMP-9. Mediadores quantificados após protocolo B. Lip: lipossoma; Disp: dispersão.

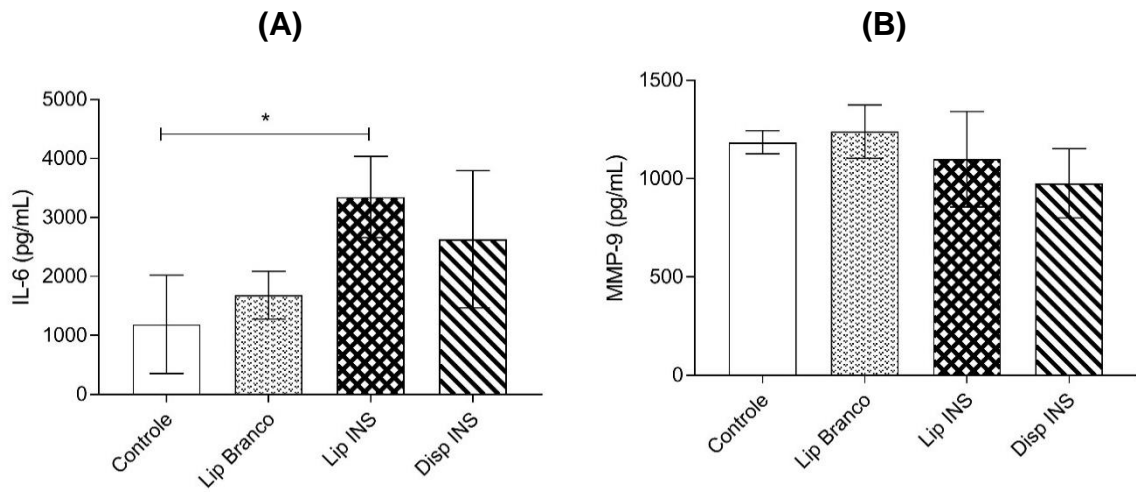
*Valor $p < 0,05$. Resultados expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$, analisados por *One-Way ANOVA*, seguido de teste de comparação múltipla de *Tukey*.

Comparado com o grupo controle de inflamação (células tratadas apenas com LPS), a expressão de IL-6 não sofreu aumento (*upregulation*) estatisticamente significativo. Para essa interleucina, a expressão de IL-6 foi significativamente maior ($p > 0,05$) para o lipossoma INS e dispersão INS, em relação ao controle tratado LPS e lipossoma branco.

Já para os resultados de MMP-9, os grupos tratados com os lipossomas não apresentaram diferença estatística em relação ao controle LPS, porém a dispersão de INS mostrou diminuir a concentração de MMP-9 em relação ao controle tratado somente com LPS em cerca de 1,5 vezes ($p < 0,05$).

A Figura 33 mostra os resultados obtidos com o protocolo C, após o tratamento com as formulações desenvolvidas nas células HCE-SV40 sem estímulo concomitante com LPS.

Figura 33. Expressão de mediadores inflamatórios na cultura de células HCE-SV40 após tratamento com formulações por 24 h.



A) IL-6 e B) MMP-9. Mediadores quantificados após protocolo C. Lip: lipossoma; Disp: dispersão.

*Valor $p < 0,05$. Resultados expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$, analisados por *One-Way ANOVA*, seguido de teste de comparação múltipla de *Tukey*.

O lipossoma branco não alterou a expressão de IL-6 e MMP-9 em relação ao controle basal (grupo sem tratamento). Já o lipossoma INS aumentou cerca de 3 vezes a expressão de IL-6 em relação ao controle ($p < 0,05$), enquanto que a solução de INS aumentou cerca de 2,2 vezes, sem diferença estatística ($p > 0,05$). Não houve alteração significativamente da expressão de MMP-9, em relação ao controle, na presença das formulações.

6 DISCUSSÃO

O olho seco é uma disfunção que atinge hoje milhares de pacientes, diagnosticados ou não com DOS. Independente da idade, o uso de computadores com alta frequência ou outros aparelhos eletrônicos, longos períodos de leituras, exposição a locais com clima seco, e uso de lentes de contato, são fatores simples que podem resultar no olho seco em adultos ou jovens. Nesses e em outros casos o indivíduo precisa aplicar colírios paliativos ao menos três vezes ao dia para evitar que complicações mais graves, como feridas na córnea, acometam sua visão.

Neste sentido, o uso de colírios a base de lipossomas pode aliviar os sintomas do olho seco, devido, principalmente, a sua composição lipídica e biocompatibilidade. Além disso, esse sistema pode carrear fármacos, como uma macromolécula, que podem auxiliar no tratamento da DOS e na cicatrização de feridas dela originada.

Desta forma, as formulações lipossomais desenvolvidas neste trabalho foram delineadas pensando-se na sua capacidade em incorporar a INS, mas também nos benefícios que os lipídeos poderiam trazer para a melhora dos sintomas do olho seco.

6.1 QUANTIFICAÇÃO DA INS

A quantificação da INS incorporada nos lipossomas desenvolvidos é uma etapa imprescindível para caracterização de sistemas de liberação nanoparticulados. Diversas metodologias já foram reportadas para a determinação da INS humana, incluindo ensaios imunes, como ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbert Assay*), e não imunes, como radioimunoensaio e técnicas cromatográficas (SAJEESH e SHARMA, 2006a; SAJEESH e SHARMA, 2006b). No presente estudo, a metodologia escolhida para quantificação da INS nas formulações foi CLAE.

Para a análise por CLAE, um método recentemente desenvolvido em nosso laboratório para quantificação da INS foi validado. Empregou-se para tanto uma coluna Gemini[®] C18, de fase reversa. A CLAE de fase reversa é uma técnica usada com bastante frequência para separação de peptídeos e proteínas baseado no caráter hidrofóbico das substâncias, já tendo sido descrita para quantificar a INS tanto em preparações farmacêuticas quanto em meios biológicos (SARMENTO et al., 2006; ANDREANI et al., 2014). A coluna escolhida para a análise da INS é estável em faixa extrema de pH e apresenta moderada hidrofobicidade, tornando-a ideal para a análise

das amostras de INS em pH ácido. As amostras de INS foram sempre manipuladas em pH ácido para garantir a ausência de agregados de alta massa molecular (BRANGE e LANGKJØER, 1993; SARMENTO et al., 2006). Isto porque embora a CLAE seja uma técnica relativamente rápida e simples, a análise de fármacos proteicos são particularmente desafiadores, uma vez que podem sofrer reações hidrolíticas ou ainda se agregar por meio de ligações covalentes intermoleculares, formando produtos com alta massa molecular difíceis de serem avaliados com reprodutibilidade por CLAE. Associado a isso, a INS é instável e passível à degradação, mesmo durante o armazenamento ou em associação a formulações farmacêuticas (BRANGE e LANGKJØER, 1993; SARMENTO et al., 2006).

Sendo assim, uma vez que um método analítico é desenvolvido para a finalidade de quantificação, estudos de validação são imprescindíveis para assegurar que os resultados obtidos sejam confiáveis e reprodutíveis para a finalidade proposta. Dessa forma, baseado nos estudos já descritos em literatura (SARMENTO et al., 2006; ANDREANI et al., 2014) o método para quantificação da INS nos lipossomas foi validado.

Com tempo de retenção reduzido, boa resolução do pico, e rápido tempo de corrida (Tabela 2), a adequabilidade do sistema foi assegurada para a análise requerida da INS, permitindo que outros parâmetros do método fossem avaliados, como a seletividade, linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade do método.

A seletividade foi testada com a finalidade de avaliar a presença de outros interferentes na amostra, como os lipídeos da formulação ou o tampão utilizado, confirmando a ausência de picos nos cromatogramas dessas amostras (Figura 15) no tempo de retenção atribuído à INS, de 13,3 min (Figura 14).

Os valores de precisão e exatidão obtidos nos estudos intra-dia (Tabela 3) foram satisfatórios para a faixa de linearidade estudada (100 – 3 µg/mL) (Figura 16), já que os valores de CV e de ER obtidos estão de acordo com o recomendado pela RE nº 899 de 2003 (ANVISA, 2003). A exatidão de um método analítico (ER) mostra o quão próximo o valor encontrado é de seu valor real. Já a precisão (expressa pelo CV inter e intraensaio) mostra a concordância entre os resultados obtidos em diferentes análises, sob as mesmas condições, sendo analisada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A partir dos resultados obtidos para esses dois parâmetros, é possível inferir que os valores de concentração encontrados para INS são muito próximos do valor real, apresentando baixas

percentagens de erro (abaixo de 5%), em concordância com o preconizado pela legislação (ANVISA, 2003).

Já para o ensaio de sensibilidade do método, o limite de quantificação de 3 µg/mL (Tabela 4) foi adequado para quantificação da INS nas formulações e nos estudos de estabilidade.

6.2. PREPARO DOS LIPOSSOMAS

Na etapa inicial do desenvolvimento dos lipossomas, foi realizado um levantamento em literatura com a finalidade de nortear a composição da formulação nos testes preliminares. O fosfolípídeo escolhido para formação dos lipossomas foi a PC de soja com alto percentual de pureza (aproximadamente 100%), um fosfolípídeo de baixa temperatura de transição de fase (T_c) (-20 a -30°C) (LIPOID GmbH, 2011; LI et al 2015a) e muito empregado no preparo de lipossomas estáveis (BENSON, 2010). Como já discutido anteriormente, alguns lipídeos são componentes essenciais da camada externa do filme lacrimal, sendo que qualquer defeito em sua camada lipídica aumenta a evaporação do filme, levando ao olho seco. Para o tratamento da DOS, a escolha de um fosfolípídeo natural, como a PC, apresenta como vantagens além de seu baixo custo e toxicidade praticamente nula, a biocompatibilidade com os lipídeos presentes nas membranas celulares e camada lipídica do filme lacrimal. Entre os lipídeos polares, a PC é o principal componente dessa camada (60 mol%) (RANTAMAKI et al., 2011), sendo que seu emprego na formulação promove uma interação entre as vesículas do lipossoma com o filme lacrimal e epitélio da superfície ocular. Estudos mostraram que lipossomas formados por PC foram capazes de aumentar o chamado tempo de ruptura do filme lacrimal (TBUT) (em inglês *tear film break-up time*), um parâmetro utilizado na clínica para se avaliar a qualidade da lágrima e a ausência de alterações nas células epiteliais decorrentes do olho seco (LEE et al., 2004; FONSECA, ARRUDA e ROCHA, 2010; LIM; WENK; TONG, 2015).

Para auxiliar na estabilidade das vesículas e flexibilidade da bicamada lipídica, dois componentes distintos foram avaliados como coadjuvantes na formação da vesícula lipídica: o CH e o NaC. O CH é um álcool policíclico de cadeia longa comumente adicionado à PC para diminuir a permeabilidade e aumentar a rigidez da bicamada lipídica. Ele age restringindo o movimento das cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolípídeos (CASTILE et al., 1999; MOZAFARI, 2010; PIRES DE SÁ et al., 2015).

Desta forma, espera-se que os lipossomas formados sejam mais estáveis e restrinjam a liberação do fármaco encapsulado. Já o NaC é um tensoativo aniônico tri-hidroxilado capaz de diminuir a interação entre as cadeias carbônicas dos fosfolípidos, aumentando desta forma a fluidez da bicamada lipídica e lhe conferindo maior flexibilidade e deformabilidade (CEVC et al., 1998; MOZAFARI, 2010; HU et al., 2013; NIU et al., 2014). Esta flexibilidade pode facilitar a encapsulação de fármacos de maior massa molecular, como a INS.

Para as formulações contendo CH, duas proporções molares de PC:CH foram testadas: 1:1 (IWANAGA et al., 1997; DEGIM et al., 2004; MOZAFARI, 2010) e 3:1 (CUI et al., 2015). Já para a vesícula contendo NaC em sua composição, apenas a proporção molar PC:NaC 4:1 (CHEN et al., 2009; BENSON, 2010; NIU et al., 2011; HU et al., 2013) foi testada. Esta proporção de PC:NaC selecionada é a mais comumente utilizada para formação de lipossomas flexíveis com sais biliares, como o NaC.

Também foi decidido avaliar a influência na formulação da adição de poloxamer à solução de hidratação nas concentrações de 0,03% (JAMSHAIID et al., 1988; CHANDAROY et al., 2002) e 0,1% (CASTILE et al., 1999; PEMBOUNGONG et al., 2011), de modo a comparar com formulações sem o copolímero. O poloxamer é um copolímero tribloco formado por duas moléculas de polioxietileno (PEO) e uma de polioxipropileno (PPO), sendo adicionado à formulação com o intuito inicial de aumentar a estabilidade e diminuir o Pdl da nanodispersão. Foi demonstrado que a presença de concentrações de poloxamer abaixo de sua concentração micelar crítica em dispersões lipossomais inibe a agregação e fusão das vesículas (CASTILE et al., 1999). Estudos sugerem que ele aumenta a estabilidade física dos lipossomas uma vez que é incorporado na bicamada lipídica (KOSTARELOS et al., 1999; PEMBOUNGONG et al., 2011) ou fica adsorvido em sua superfície, dificultando, por impedimento estérico, a aproximação de outra nanopartícula (KOSTARELOS et al., 1999; WOOD et al., 2016).

Para os lipossomas formados com CH, a adição de poloxamer à fase dispersora parece não ter afetado positivamente o tamanho e a distribuição das partículas, enquanto que para as formulações contendo o NaC, ocorreu uma diminuição do Pdl das amostras e do tamanho da vesícula, principalmente para a concentração de 0,1% (Tabela 5). Resultados semelhantes foram encontrados por Johnsson et al. (1999) que também observaram pouca alteração no tamanho e Pdl de

lipossomas formados por um fosfolípido associado ao CH na presença do polímero (JOHNSSON et al., 1999). Estima-se que a rigidez conferida a bicamada lipídica pela adição do CH tenha dificultado a incorporação do poloxamer a ela, resultando em nanopartículas maiores e mais polidispersas. A adição de NaC, por sua vez, que deixa a bicamada lipídica mais flexível, parece ter facilitado as interações com o poloxamer, diminuindo o tamanho das vesículas e aumentando sua estabilidade.

Diversos estudos descrevem o preparo de lipossomas com sais biliares semelhantes ao NaC para incorporação de peptídeos e proteínas, já que estes compostos trazem um efeito secundário de estabilização da membrana, aumentando a estabilidade das moléculas, permeação, integridade e biodisponibilidade de proteínas e peptídeos (NIU et al., 2011; NIU et al., 2012; HU et al., 2013; NIU et al., 2014; CUI et al., 2015). Hu e colaboradores (2013) também desenvolveram lipossomas para encapsular INS formados por PC e CH ou por PC e glicolato de sódio. Partículas de tamanho de 192 nm e 178 nm, com Pdl de 0,355 e 0,346, foram obtidas respectivamente para o lipossoma convencional e com glicolato de sódio. Os lipossomas obtidos por eles foram, portanto, maiores do que os nossos, mais polidispersos e não apresentaram diferenças significativas de tamanho quando comparados os lipossomas convencionais aos flexíveis. No entanto, esses autores prepararam seus lipossomas pelo método de evaporação de fase reversa, sugerindo que, além da composição escolhida, o método de preparo dos lipossomas com INS influencia suas características físico-químicas finais.

O método de hidratação do filme lipídico consiste no modo clássico de preparo das vesículas multilamelares. Ao se incorporar um excesso de água ou tampão ao filme fosfolipídico formado na parede do balão, ocorre a formação espontânea de vesículas sob agitação constante, as quais apresentam tamanho de partícula de alguns micrômetros e distribuição de tamanho bastante heterogênea (vesículas multilamelares, MLV) (MOZAFARI, 2010; PATIL e JDHAV, 2014). As vesículas são formadas pelas interações hidrofóbicas entre as caudas apolares dos fosfolídeos que as compõe e pelas interações hidrofílicas entre as cabeças polares dos mesmos com o solvente hidrofílico. Ao se fornecer grande quantidade de energia ao sistema, como por exemplo utilizando técnicas como a sonicação e homogeneização a alta pressão, pode-se obter partículas de menor tamanho e com faixa de distribuição de tamanho estreita.

Sendo assim, no presente trabalho optou-se por utilizar a homogeneização em HAP, por ser este um método escalonável, capaz de diminuir consideravelmente o tamanho das partículas a ordem de nanômetros. Para tanto, a técnica consiste na passagem das vesículas em um sistema de microfluidização, onde as partículas colidem entre si sob altas pressões, causando a ruptura das maiores que se reorganizam em vesículas menores e mais homogêneas (vesículas unilamelares, SUV e LUV) (MOZAFARI, 2010; PATIL e JDHAV, 2014). De fato, a homogeneização das vesículas em HAP resultou em partículas com tamanho nanométrico e distribuição de tamanho estreita (Tabela 7), adequadas a finalidade pretendida neste trabalho.

Após a obtenção da dispersão lipossomal pretendida, avaliou-se a filtração em membrana esterilizante (0,22 μm) como forma simples e segura para esterilização física final das formulações. Por se tratar de uma formulação contendo um fármaco termolábil para administração via ocular, é imprescindível que a mesma esteja livre de grandes partículas (que podem irritar o olho) e de microrganismos, de modo que a proteína permaneça estável e bioativa (WEISSIG, 2010; JANAGAM; WU; LOWE, 2017). Os resultados obtidos na etapa final do desenvolvimento mostraram que a filtração em membrana esterilizante não afetou as características físico-químicas das vesículas (Tabela 9), podendo este ser um método de escolha para esterilização da formulação lipossomal.

6.3 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS E DA INS

Características físico-químicas, como tamanho de partículas, carga da superfície, assim como grau de agregação e estabilidade do fármaco, estão intimamente relacionadas com o comportamento biológico do fármaco a partir do sistema carreador, podendo prover informações confiáveis sobre aspectos relacionados à segurança e eficácia terapêutica (LIN et al., 2014). Sendo assim, os estudos de caracterização de nanocarreadores são imprescindíveis para se desenvolver sistemas de liberação nanoparticulados estáveis e funcionais.

No entanto, a caracterização do sistema de liberação nanoparticulado torna-se bastante complexa quando a ele são incorporadas macromoléculas, como as proteínas, que podem se atuagregar em meio aquoso, aumentando sua massa molecular.

A INS humana é uma proteína de 51 aminoácidos distribuídos em duas cadeias peptídicas (A e B, com 21 e 20 aminoácidos, respectivamente) que apresenta massa molecular total de 5,807 kDa (HRYNYK; NEUFELD, 2014). Assim como outras proteínas e peptídeos, tanto em soluções ácidas quanto alcalinas, a molécula de INS pode estar presente na forma de monômero, dímero e hexâmero (NETTLETON et al., 2000; HUUS et al., 2006; GUSAROV et al., 2008; FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010; SHARMA et al., 2010). A presença de agregados proteicos em formulações farmacêuticas pode comprometer sua estabilidade e a qualidade final, podendo levar a complicações mais sérias como imunogenicidade ou perda da atividade biológica (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010). Desta forma, é importante conhecer as formas em que a INS possa estar dispersa no meio para melhor compreender as características finais do sistema de liberação.

Já em 1947, estudos conduzidos por Gutfreund (GUTFREUND, 1947) demonstraram que há um aumento na massa molecular da INS à medida que se aumenta sua concentração ou o pH da dispersão aproxima-se do fisiológico. Em concentrações baixas, como a sanguínea, a INS está predominantemente em sua forma monomérica, a qual é a única capaz de interagir com o receptor (NETTLETON et al., 2000; HUUS et al., 2006, GUSAROV et al., 2008; SHARMA et al., 2010). Porém, após sua produção no organismo, a INS é armazenada em sua forma hexamérica pelo pâncreas, por ser a mais estável (SHARMA et al., 2010), atingindo um equilíbrio com a forma monomérica presente na circulação plasmática. Em formulações, esse equilíbrio é afetado por diversos fatores, como pH e força iônica do meio (SHARMA et al., 2010), o que pode favorecer sua auto associação deslocando o equilíbrio para uma forma oligomérica específica. A INS tende então a formar dímeros ou oligômeros, principalmente como resultado de uma ligação hidrogênico entre o C terminal de duas cadeias B (SHARMA et al., 2010; RAWAT et al., 2015).

Os ensaios realizados para determinar a EE da INS no lipossoma (Tabela 11) mostraram que a INS se encontrava agregada na solução de hidratação do filme lipídico. Esta agregação foi notada porque para a obtenção da EE foi necessário, primeiramente, separar de forma eficiente a INS livre do lipossoma total, ou seja, toda a INS que não está encapsulada nas vesículas lipossomais. A técnica utilizada para esta separação foi a centrifugação utilizando dispositivo AMICON ultra, com membrana com tamanho de poro de 50 kDa, através da qual moléculas de INS não encapsuladas nos lipossomas e não agregadas atravessariam facilmente. Desta

forma, como controle experimental, foi primeiramente filtrada uma dispersão de INS na solução de hidratação. Entretanto, apenas $36 \pm 1\%$ da concentração inicial foi recuperada, mostrando que 64% de INS não conseguia atravessar a membrana mesmo não estando interagindo com o sistema de liberação, sugerindo que a INS poderia estar auto associada na solução de PBS pH 7,4, formando aglomerados com tamanho molecular maior do que o poro da membrana.

Desta forma, considerando que parte da INS que fica aglomerada na solução de hidratação pode se organizar não somente em monômeros, mas também em dímeros e oligômeros de alta massa molecular na presença dos lipídeos durante o preparo dos lipossomas e ser encapsulada, alguns ensaios foram realizados na tentativa de caracterizar o tamanho hidrodinâmico e a massa molecular da proteína livre em solução.

Sabe-se que muitos são os fatores responsáveis pela indução de agregação em proteínas, como temperatura, concentração, força iônica do meio, pH, agitação, sendo que o emprego de quaisquer técnicas de separação e caracterização desses agregados causa uma perturbação no equilíbrio entre as formas associadas, sendo que a própria diluição para realização de leituras pode perturbar esse equilíbrio (PHILO e ARAKAWA, 2009). Dessa forma, a separação da INS livre do lipossoma foi um desafio para o presente trabalho, uma vez que se tratava de um sistema bastante complexo, onde existam formas lipídicas associadas à proteína livre e à proteína encapsulada. E ainda, considerando que esta última se auto associa em outras formas oligoméricas de diferentes tamanhos moleculares, o desafio fica ainda maior para quantificação e caracterização do sistema lipídico a nível molecular.

Para se ter uma ideia do estado de agregação da INS, utilizaram-se algumas técnicas de espalhamento de luz para avaliação do diâmetro da molécula de INS na solução de hidratação, além da técnica de MFA que avalia a morfologia e tamanho das partículas com alta resolução e sensibilidade (Figura 20-G à I), e por último uma análise de SAXS (Figura 22), onde é possível através da modelagem indireta por IFT, avaliar as curvas de intensidade de espalhamento que podem predizer sobre a massa molecular e o número de oligômeros presentes em cada amostra. Para não interferir nos resultados, a dispersão de INS foi analisada pelas quatro técnicas na mesma concentração (0,4 mg/mL) que a presente nos lipossomas.

A avaliação do tamanho das partículas de INS por DLS mostrou a presença de três picos, sendo um desses com tamanho aproximado de 5,6 nm (intensidade maior

que 50%) (Figura 17). A análise por NTA, no entanto, mostrou que a menor população de partículas visíveis na dispersão apresentava tamanho médio de 80 nm (Figura 18). Esta diferença entre os resultados pode ser explicada pela maior sensibilidade do DLS, que é capaz de detectar partículas menores do que 30 nm (BHATTACHARJEE, 2016) enquanto o NTA só permite a visualização de partículas maiores do que 30 nm (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010). Outra diferença entre as duas técnicas é que os dados de tamanho fornecidos pelo DLS neste trabalho foram coletados no modo intensidade, enquanto que o NTA os forneceu por número.

A INS em sua forma monomérica e hexamérica apresenta tamanho aproximado de 2,6 nm e 5,6 nm, respectivamente, enquanto que os dímeros são elipsoides e apresentam dimensões aproximadas de 2,5 x 3,5 x 4,5 nm (CHIEN, 1996; SILVA et al., 2003). Um diâmetro de partícula variando entre 26 e 80 nm dá indícios de que pode haver maior grau de aglomeração na dispersão.

Dessa forma, a análise realizada por SAXS forneceu informações adicionais a respeito do grau de aglomeração da INS. Nesse caso, comparou-se a dispersão de INS em PBS pH 7,4 (solução de hidratação do lipossoma), com uma em meio ácido, onde a INS apresenta maior estabilidade (GUALANDI-SIGNORINI e GIORGI, 2001; HUUS et al., 2006).

Os resultados após ajustes por IFT mostraram que ambas as dispersões de INS se apresentavam heterogêneas, indicando a coexistência de diferentes populações, conforme já havia sido verificado por DLS e NTA. Por esse motivo, realizou-se dois ajustes IFT para cada curva: um “sem corte” e outro “com corte”. Considerando que a massa molecular da proteína INS monomérica é aproximadamente 5,8 *kDa*, foi possível calcular o parâmetro que informa o número médio de monômeros responsáveis por aquela massa molecular. Contudo, esse parâmetro depende do intervalo q escolhido para o ajuste. Assim, por exemplo, considerando o sistema INS em meio ácido, determinou-se a massa molecular de 17,4 *kDa* (em torno de 3 monômeros) quando o ajuste com corte foi considerado (Figura 22-D). Usando o ajuste IFT de toda a curva experimental, a massa molecular obtida aumentou para 433,60 *kDa* (aproximadamente 75 monômeros) (Figura 22-C). Já para o sistema INS em PBS, aproximadamente 6 monômeros são responsáveis pelo peso molecular total de 34,04 *kDa* quando o trecho da curva de intensidade correspondente à $q > 0,045 \text{ \AA}^{-1}$ é usado (Figura 22-B). Esse valor se correlaciona com

o tamanho de 5 nm obtido por DLS e corresponde ao diâmetro hidrodinâmico de um hexâmero. Se considerarmos o ajuste de toda a região q , a massa molecular total aumenta para 88,92 *kDa* (equivalente a aproximadamente 15 monômeros).

Essa grande variação da massa molecular em função do tipo de ajuste acontece porque, como já discutido, provavelmente existem populações da proteína em diferentes estados de agregação, resultados que corroboram com os de DLS e NTA, os quais mostram diferentes populações de partícula (Figuras 17 e 18).

Desta forma, ambas as dispersões de INS em PBS e em meio ácido HCl são formadas por uma mistura de populações de INS em diferentes graus de agregação. Agregados maiores fazem com que o começo das curvas $I(q) \times q$ aumente mais rapidamente, e isso interfere na determinação experimental da massa molecular e, portanto, na avaliação do estado de agregação da INS. Mesmo assim, pela análise das funções $q(r)$ (Figuras 22), é possível se ter uma impressão qualitativa da coexistência das populações em cada sistema. Com o objetivo de se ter informação quantitativa (por exemplo, porcentagens de cada população), novas medidas de SAXS poderão ser repetidas em estudos futuros.

Em conclusão, estes resultados dão ideia do grau de aglomeração da INS no meio de hidratação. É claro que em um sistema lipídico complexo existem outras substâncias, tensoativos e partículas que também influenciam o estado de agregação da proteína. Porém, como já discutido, devido a dificuldade em separá-la ou analisá-la em um sistema tão complexo sem que haja alteração de seu equilíbrio, estes experimentos não puderam ser realizados, estando as evidências de agregação restritas à solução de hidratação.

Quanto a caracterização das dispersões lipossomais, contendo ou não INS, para aplicação de sistemas de liberação pela via de administração tópica ocular, e em se tratando da terapia da DOS, é muito importante que a formulação não piore o quadro de instabilidade do filme ocular, dano celular e irritação ocular. Para tanto, além dos componentes da formulação serem aprovados pelo FDA para uso ocular, o ideal é que a mesma apresente pH fisiológico (~7,2 – 7,4) (FANGUEIRO et al., 2016) e seja hipo ou isosmótica (150 – 320 mOsm/Kg) (ALI e LEHMUSSAARI, 2006; AMMAR et al., 2009). Além disso, é desejável que o tamanho médio das partículas seja menor do que 200 nm, de modo a se evitar a irritação ocular, melhorar o transporte do fármaco e facilitar o *uptake* celular pelas células da córnea (FANGUEIRO et al., 2016).

Levando em consideração esses requerimentos especiais para administração tópica ocular, os lipossomas obtidos no presente estudo apresentaram características adequadas para a via de administração proposta (Tabela 8), com tamanho médio de partículas inferior a 200 nm (Tabela 9), pH próximo ao fisiológico e osmolaridade dentro da faixa recomendada.

O potencial zeta próximo a -10 mV para ambas as formulações (branco e com INS) (Tabela 9) pode ser atribuído às características neutras da PC. Sabe-se que cargas positivas na superfície da partícula, conferidas por lipídeos catiônicos, são interessantes por conferirem maior mucoadesão à superfície ocular (GRATIERI et al., 2010; LIM; WENK; TONG, 2015). Entretanto, optou-se por evitar usar lipídeos catiônicos na composição dos lipossomas, uma vez que estes são potencialmente irritantes para o uso ocular e poderiam agravar o quadro da DOS (ROMOREN et al., 2004; HE et al., 2013; KNUDSEN et al., 2015).

Atualmente, a técnica de DLS, também conhecida como espectroscopia de correlação de fótons (PCS) é a mais utilizada para se determinar de forma rápida e confiável o tamanho médio de lipossomas devido a sua simplicidade, robustez e facilidade de execução (BHATTACHARJEE, 2016). Embora o DLS seja adequado para determinação de tamanho em amostras monodispersas (com Pdl até 0,1), ele perde exatidão ao se tratar de amostras polidispersas. Com o emprego desta técnica, não é possível visualizar e avaliar todas as populações que podem estar presentes na amostra, sendo a distribuição significativamente afetada pela presença de populações maiores (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010). Sendo a INS uma proteína passível de aglomeração e por se tratar de um sistema lipídico, decidiu-se analisar o tamanho de partícula dos lipossomas também pela técnica de NTA, pois ela permite que a presença de outras populações nos lipossomas, ou ainda, de agregados de proteína nas dispersões lipossomais sejam visualizadas. Com a técnica de NTA é possível distinguir duas populações com diferentes tamanhos de partícula, uma vez que sua análise é por rastreamento individual de partículas.

Ambas as técnicas de DLS e NTA permitem que o tamanho das partículas presentes em um meio líquido seja determinado através do espalhamento da luz incidida na amostra, porém há diferenças no processamento e obtenção do tamanho da partícula. Na técnica de DLS, o equipamento detecta as flutuações na intensidade da luz espalhada em função do tempo, criando uma função de auto-correlação. A partir dessa função matemática, são obtidos o diâmetro médio (*Z-average*) e o valor de

distribuição estatística do tamanho das partículas (Pdl ou índice de polidispersão) (MALVERN INSTRUMENTS, 2013; BHATTACHARJEE, 2016). Já a técnica de NTA, combina as propriedades do espalhamento de luz e do movimento Browniano das partículas, sendo estas rastreadas com auxílio de um microscópio acoplado a uma câmera, a qual produz vídeos das distintas populações de partículas, enquanto estas são iluminadas por um laser (ORIEKHOVA; STOLL, 2014).

A análise dos lipossomas pela técnica de NTA (Tabela 10) forneceu resultados semelhantes aos obtidos por DLS (Tabela 9), com diâmetro médio ligeiramente superior ao obtido por DLS e indicativo de população unimodal (apenas um pico). Semelhante ao índice de polidispersividade (Pdl), o SPAN é a medida da largura da distribuição estatística de tamanho das partículas. Ambos são constantes que fornecem informações sobre a heterogeneidade das amostras. Quanto mais próximo a 0 for o valor da distribuição, mais homogênea em relação ao tamanho é a formulação. Dispersões com valores de Pdl menores do que 0,1 são consideradas altamente monodispersas, enquanto aquelas com valores entre 0,1-0,4 são moderadamente polidispersas. Dispersões com Pdl acima de 0,4 já demonstram alta polidispersão das partículas, que pode ser indicativo de agregação ou aglomeração das vesículas (BHATTACHARJEE, 2016). Da mesma forma, valores baixos de SPAN (menores do que 1) são indicativos de uma dispersão com distribuição de partículas de tamanho estreito, baixa polidispersividade e uniformidade (MONDAL et al., 2007; FONTANA et al., 2014). Por ambas as técnicas é possível constatar que os lipossomas obtidos pelo método escolhido no presente trabalho são moderadamente polidispersos com tamanho médio inferior a 200 nm.

Para se obter informações a respeito da morfologia, lamelaridade dos lipossomas, além das características de formato, tamanho e presença de agregados, análises de MET e MFA também foram realizadas.

A MET é uma técnica muito utilizada para avaliação morfológica de estruturas nanoparticuladas de origem lipídica, provendo imagens com precisão e alta resolução para amostras com tamanho entre 50 nm a 100 μ m (GAUMET et al., 2008). As imagens são geradas a partir da transmissão de um feixe de elétrons através de uma amostra previamente seca sobre uma superfície de grades de carbono. Para melhor visualização das estruturas, nossas amostras foram previamente tratadas com uma solução aquosa de acetato de uranila (contraste negativo). Como visualizado na Figura 19, o contraste negativo cora o fundo da placa em vez de contrastar as

vesículas, fornecendo imagens onde a região exterior à vesícula é preta, enquanto a área interna é branca (BIBI et al., 2011; KUNTSCHKE; HORST; BUNJES, 2011).

Além da visualização das estruturas e sua morfologia, a MET pode ser empregada para estimar o tamanho de partícula aproximado através da área de superfície projetada, o que foi posteriormente melhor avaliado por MFA. Além de fornecer dados aproximados sobre o tamanho, a técnica é capaz de mostrar informações sobre a lamelaridade dos lipossomas (PATIL e JADHAV, 2014). Pode-se observar claramente na Figura 19 que as amostras de lipossomas, contendo ou não INS, são unilamelares e não há presença de agregados de lipossomas nas amostras.

As amostras contendo INS (Figura 19-C e D) possuem bordas irregulares em comparação ao lipossoma branco (Figura 19-A e B) sugerindo formato assimétrico das vesículas na presença da proteína. Os resultados estimados de tamanho estão próximos ao obtido pela técnica de DLS (Tabela 9). Ainda, nas imagens 19-C e 19-D é possível perceber a presença de artefatos, possivelmente devido ao uso da uranila, metal pesado, como contraste, uma vez que proteínas também são coradas em presença desse composto (BOOTH; AVILA-SAKAR; CHENG, 2011).

A análise por MFA forneceu informações importantes sobre as características morfológicas e de distribuição dos lipossomas. A microscopia por MFA é uma ferramenta preciosa para avaliação precisa do tamanho e da forma das amostras sem a necessidade de utilizar contrastes, gerando imagens tridimensionais de varredura topográfica em um curto período de tempo. A técnica pode ser classificada em diferentes tipos, mas a mais utilizada para nanocarreadores farmacêuticos é o modo contato-intermitente (RUOZI et al., 2005), que foi a utilizada neste trabalho. Em relação ao MET, a MFA apresenta algumas vantagens, como a habilidade de produzir imagens de alta resolução sob condições fisiológicas e não destrutivas, fornecendo detalhes estruturais das amostras (ANABOUSI et al., 2005). O equipamento consiste em um nano sensor de silício conectado a um eixo flexível, denominado *cantilever*, que se move tridimensionalmente com alta precisão (aproximadamente 1 nm) pelos três eixos: x, y e z. Um raio laser incide sobre a parte traseira do *cantilever* enquanto ele varre a superfície topográfica da amostra. Em seguida, uma imagem é captada por um detector sensível à luz (SITTERBERG et al., 2010). A superfície da mica, onde é depositado as amostras de nanopartículas, fornece uma superfície com plano basal de clivagem baixo, por ser um mineral anatomicamente plano (SITTERBERG et al., 2010).

As imagens obtidas por essa técnica forneceram informações adicionais a respeito da forma e tamanho das partículas, que corrobora com as informações obtidas por MET e DLS. Os resultados mostraram vesículas de formato esférico, porém com leve assimetria na presença de INS, enquanto que os lipossomas brancos apresentaram uma superfície esférica, lisa e regular (Figura 20-A, B, C). Nas imagens da Figura 20-D e 20-E é possível visualizar ainda a presença de pequenas estruturas, provavelmente correspondente à INS livre presente nas amostras do lipossoma INS.

Além de fornecer informações a respeito da morfologia e topografia da partícula, a MFA forneceu informações precisas a respeito de seu diâmetro máximo médio. Para a determinação do tamanho, cada partícula com área de superfície representativa foi avaliada individualmente para obter os resultados da Tabela 12, apresentando tamanho inferior a 200 nm, resultados que corroboram com os obtidos pelas técnicas de espalhamento de luz (Tabelas 9 e 10). Os lipossomas contendo INS apresentaram diâmetro máximo médio inferior ao determinado por DLS e menores do que o apresentado pelo lipossoma branco. Isso provavelmente ocorreu devido à presença de INS livre, uma vez que as análises obtidas por MFA são realizadas por número, as quais forneceram partículas com diâmetro variando entre 50 – 70 nm. Como já discutido anteriormente, as análises realizadas por SAXS da dispersão de INS na solução de hidratação (Figura 22-A e 22-B) mostram que as moléculas de INS podem se auto associar em PBS, formando agregados com tamanhos próximos a 80 nm (Tabela 13). Desta forma, a presença desses agregados de INS livre, menores do que os lipossomas, pode deslocar o tamanho médio geral das partículas das dispersões lipossomais para uma média menor de tamanho.

SAXS é o método de escolha para caracterização estrutural de materiais a nível atômico e molecular, sendo muitas vezes utilizado para caracterização de lipossomas, fornecendo informações diretas sobre a conformação e espessura da bicamada lipídica da vesícula (PABST et al., 2010; VARGA et al., 2012). O objetivo principal do estudo dos lipossomas por SAXS foi obter informações preliminares e exploratórias a respeito das características estruturais dos lipossomas. As análises forneceram três informações a respeito das características estruturais dos lipossomas desenvolvidos: a) espessura da vesícula lipídica; b) grau de lamelaridade das vesículas; c) influência da adição de INS na bicamada lipídica.

A partir das curvas obtidas pelas análises de espalhamento (Figura 24-A) e modelagem IFT de cada uma das curvas foi possível obter a função $p(r)$ a qual

assumiu um comportamento típico conhecido para lipossomas (OLIVEIRA, 2005; OSELIERO-FILHO, 2013). A espessura da bicamada lipídica foi de 42 Å, valor este característico de bicamadas formadas por uma grande variedade de lipídios (AMENITSCH et al., 2011; VARGA et al., 2012; OSELIERO FILHO, 2013).

Modificações na curva de SAXS foram introduzidas com a adição da INS ao sistema PC:NaC (Figuras 24-D), sendo possível correlacionar essas mudanças a alterações na bicamada lipídica. Diversos estudos têm utilizado o SAXS para obter informações estruturais sobre lamelaridade (RISTORI et al., 2009), espessura (AMENITSCH et al., 2011) e simetria da bicamada lipídica de lipossomas, além de usarem a técnica para determinar modificações estruturais na bicamada lipídica após a adição de compostos com alta massa molecular, como polímeros (MERTINS, 2008; AMENITSCH et al., 2011; VARGA et al., 2012). Porém, para melhor investigação sobre essas alterações, é necessária uma modelagem direta dos dados, a qual poderá ser feita em ensaios futuros. As alterações causadas na bicamada lipídica pela adição da INS sugerem, no entanto, que ao menos parte da INS está encapsulada nesta região do lipossoma.

6.4 ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS E DA INS

No desenvolvimento de sistemas de liberação nanoparticulados de fármacos, além da estabilidade química, é importante garantir a estabilidade física das nanopartículas. Particularmente para os lipossomas, a estabilidade físico-química influencia diretamente em suas propriedades biológicas, estando relacionada à eficácia e segurança dos produtos farmacêuticos.

Entre as técnicas mais comuns para se avaliar a estabilidade de lipossomas pode-se citar a análise do tamanho de partícula e distribuição de tamanho, morfologia, sedimentação, grau de cristalinidade, carga da superfície da partícula, além da estabilidade química do fármaco (WU et al, 2011).

As vesículas lipídicas tendem a aglomerar ou degradar conforme o tempo, o que pode levar à fuga do fármaco encapsulado (MOZAFARI, 2010, LIM et al., 2015). Desta forma, para se avaliar sobre a melhor forma de armazenamento dos lipossomas, o tamanho de partícula, o índice de polidispersão (Pdl), o potencial zeta e o pH das dispersões lipossomais foram avaliadas no decorrer de 90 dias. As amostras foram armazenadas a 4°C para se evitar influência da degradação da INS

neste estudo. Isto porque é sabido que proteínas como a INS tem sua estabilidade prejudicada por longos períodos a temperatura ambiente (GUALANDI-SIGNORINI, GIORNI, 2001).

As dispersões lipossomais mantiveram-se estáveis por até 60 dias. Em 90 dias, no entanto, os lipossomas brancos tiveram uma diminuição significativa de tamanho (Figura 25-A), que pode ser explicado pelo aumento da permeabilidade dos lipossomas e solubilização das vesículas (BATISTA et al., 2007). Isto acontece devido a hidrólise do grupamento éster presente no fosfolípido, levando a formação de um produto intermediário, a liso-fosfatidilcolina. A presença desse composto intermediário altera a organização dos lipídeos, que passam da fase lamelar para um sistema micelar, o qual é composto por micelas simples ou mistas (ZUIDAM et al., 1995; LOPEZ et al., 1998; ALMGREN, 2000). Entretanto, o mesmo não ocorreu para as dispersões lipossomais que continham INS, as quais apresentaram um aumento em seu tamanho estatisticamente significativo (Figura 25-C), que pode ter sido resultado da agregação das vesículas no decorrer do tempo de armazenamento. Sendo assim, a presença do fármaco no sistema demonstrou evitar, de alguma maneira, a hidrólise do fosfolípido.

Em relação ao pH, ambos os lipossomas branco e contendo INS apresentaram uma queda significativa em seu valor após 90 dias de armazenamento (Figura 25-D), sugerindo oxidação dos compostos lipídicos, que assim como as reações de hidrólise, é um processo muito comum de decomposição dos lipossomas. A oxidação das ligações insaturadas da PC, contribuem para o aroma rançoso da formulação, e ainda contribui para a instabilidade físico-química das vesículas.

Já em relação ao Pdl, tanto o lipossoma sem ou com INS não demonstraram variação significativa da distribuição de tamanho, mantendo a característica de população polidispersa. Também os lipossomas contendo INS não apresentaram variação de potencial zeta no decorrer dos 90 dias de estudo. Ambas dispersões, lipossomais ou contendo apenas INS, apresentam potencial zeta ligeiramente negativo (Tabela 9). A provável fuga da INS dos lipossomas após 90 dias de armazenamento, como discutido anteriormente, não resulta, portanto, em variação do potencial zeta da dispersão.

A estabilidade química da proteína foi verificada a temperatura ambiente por 72 h. Durante este período, não foi verificada variação da porcentagem remanescente do fármaco em relação a dispersão de INS que não continha lipossomas (Figura 26).

Esses resultados sugerem que, pelo menos durante este período de análise, os lipossomas não alteram as características químicas da INS, importantes para que ela mantenha sua atividade biológica (RAWAT et al., 2015).

Uma alternativa para aumentar o tempo de prateleira dos lipossomas seria submeter a formulação, com adição de um crioprotetor, ao processo de liofilização, aumentando assim sua estabilidade física. Por retirar toda a água do sistema, a liofilização prolonga o tempo de prateleira, evitando processos químicos como oxidação e hidrólise, diminuindo ainda a possibilidade de agregação das partículas (LIM et al., 2015; PIRES DE SÁ et al., 2015). A adição de um agente antioxidante e a conservação das formulações em uma atmosfera inerte, também contribuiriam para aumentar a estabilidade física dos lipossomas (BATISTA et al., 2007).

É importante destacar que todos os testes em cultura de células foram realizados após 24 h do preparo dos lipossomas, para assegurar sua estabilidade física e química, principalmente do fármaco.

6.5 ENSAIO DE IRRITAÇÃO OCULAR *IN VITRO* – HET-CAM

O teste de HET-CAM, aplicado sobre a membrana corioalantóide (CAM) de ovos de galinha embrionados, é um ensaio de irritação ocular alternativo ao teste de Draize, realizado em coelhos (LUEPKE, 1985). Embora ainda sobre processo de validação internacional, o teste HET-CAM é aceito pela ANVISA para avaliar o potencial irritante ocular de produtos farmacêuticos e cosméticos. A CAM é uma membrana fina e vascularizada e não inervada, que protege o embrião do contato com o ar (GILLERON et al., 1996). Por ser altamente vascularizada e possuir tecido estratificado, a CAM responde ao trauma com uma reação inflamatória semelhante àquela produzida pela conjuntiva (ALANY et al., 2006).

Os resultados demonstraram que a formulação desenvolvida contendo INS (PC:NaC INS) apresentou-se como ligeiramente irritante por ambos os pesquisadores, apresentando sinais de hiperemia entre 30 s e 2 min (Figura 27 e Tabela 14). Acredita-se, porém, que essa hiperemia de grau leve não comprometa seu uso tópico ocular conforme proposto no presente trabalho, uma vez que as formulações foram aplicadas sem diluição. Sabe-se também, que o simples contato da formulação com a CAM pode gerar um resultado falso-positivo de hiperemia na membrana CAM, sendo esta uma limitação do teste (STEILING et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2012). Associado a isso,

sinais mais severos de irritação ocular como hemorragia ou coagulação não foram detectadas em nenhuma das formulações testadas.

Embora seja um teste qualitativo, o ensaio do HET-CAM, em associação com outros ensaios *in vitro* complementares, é útil para avaliar a segurança de um produto direcionado para a aplicação ocular, sendo muito utilizado para identificar irritantes oculares severos. Ensaio de citotoxicidade pelo método de vermelho neutro e ensaio de MTT ou XTT, são complementares para garantir a segurança das formulações desenvolvidas (ANVISA, 2012). Sabe-se que no mercado, atualmente, alguns produtos farmacêuticos possuem em sua composição a associação de sais biliares e PC para administração intravenosa (VALIUM[®] MM e KANAKION[®] MM, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Suíça). Esses medicamentos possuem em sua composição proporções molares de sal biliar:PC ainda maiores do que as utilizadas neste presente trabalho, o que corrobora com os dados de segurança do composto para tratamento tópico ocular (FREE; COLLIER; DUNDEE, 1986; GUENTERT et al., 1987; DANGI; VYAS; VIXIT, 1998).

6.6 ESTUDOS *IN VITRO* EM CULTURA DE CÉLULAS EPITELIAIS DA CÓRNEA HUMANA

Um dos aspectos mais relevantes relacionados à severidade e cronicidade da DOS é a presença da resposta imune crônica mediada pela inflamação. A exposição das células epiteliais da córnea e da conjuntiva ao ambiente hiperosmolar induz a liberação via receptor de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e o aumento da expressão de moléculas de adesão e do número dos linfócitos T (DE PAIVA et al., 2006; BARABINO et al., 2012; BAUDOUIN et al., 2013). Mediadores inflamatórios como interleucinas 1 β (IL-1 β), 6 (IL-6), 8 (IL-8), 17 (IL-17), interferon- γ , fator de necrose tumoral α (TNF- α), e metaloproteinase de matriz 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) estão relacionadas com a DOS e à inflamação na superfície ocular. Esses mediadores por sua vez, estão associados ao aumento de leucócitos e células T, resultando em dano epitelial progressivo (BARABINO et al., 2012; STEVENSON; CHAUHAN; DANA, 2012). Em contrapartida, nos casos mais severos da DOS, após dano epitelial é comum o surgimento de feridas de córnea, as quais são, no geral, de difícil cicatrização.

Tendo em vista a fisiopatologia da DOS e as complicações decorrentes dessa desordem, como as feridas na superfície ocular, deve-se avaliar minuciosamente o comportamento de nanopartículas na administração tópica ocular, para avaliar seus benefícios em cada estágio da doença. Sendo assim, para o desenvolvimento de lipossomas biocompatíveis contendo PC e sal biliar para encapsulação de fármacos é de suma importância que o sistema de liberação não cause dano celular ou apresente citotoxicidade perpetuando desta forma o processo inflamatório crônico. Espera-se que o sistema possa ter um efeito protetor na superfície ocular, e que seja estável para encapsulação da INS, a qual pode exercer sua ação farmacológica.

Os estudos em cultura de células epiteliais da córnea tiveram como finalidade, portanto, avaliar o comportamento das células epiteliais de córnea frente ao tratamento com as formulações aqui desenvolvidas, aplicando um modelo *in vitro* que se aproximasse da DOS. Nesse sentido, o emprego de cultura de células epiteliais de córnea humana (HCE) estimuladas com LPS utilizado em nosso trabalho simula a irritação e a inflamação ocular causada pela exposição ambiental (CAO et al., 2015; ZHENG et al., 2015; TSENG et al., 2016). Entretanto, vale ter em mente que por se tratar de um ensaio bidimensional *in vitro*, o modelo de estímulo inflamatório em cultura de células não reflete o que de fato acontece *in vivo*, sendo esta uma limitação da metodologia empregada neste trabalho.

Para avaliar qualquer resposta celular *in vitro*, foi necessário primeiramente garantir que a aplicação das formulações na faixa de concentração avaliada na cultura de células não causaria morte celular. O ensaio de viabilidade celular (Figura 28) foi então realizado pelo método do vermelho neutro. Este método é baseado na habilidade das células viáveis em realizarem o *uptake* do corante em seus lisossomos, através da produção de ATP e manutenção de gradientes de pH (REPETTO et al., 2008). Os resultados demonstraram que a faixa de concentração testada, entre 40 a 0,67 µg/mL de INS, correspondente a concentração de lipossomas entre $4,5 \cdot 10^{10}$ a $7,10^8$ partículas/mL, não foram citotóxicas para as células HCE-SV40, apresentando o mesmo percentual de viabilidade que o grupo controle (Figura 28). De forma semelhante, estudo realizado por Vicario-de-la-Torre e colaboradores (2014) mostrou que lipossomas convencionais produzidos com PC, α -tocoferol e hialuronato de sódio apresentaram 80% de viabilidade celular em células de epitélio de córnea e conjuntiva e boa tolerabilidade em ensaios de tolerância *in vivo*.

Lipossomas são formulações baseadas em lipídeos biocompatíveis, como a PC, componente da membrana plasmática das células (TORCHILIN, 2005; ALLEN; CULLIS, 2013) e, no geral, não apresentam citotoxicidade. No entanto, a adição de sais biliares a sua composição pode resultar em influência negativa na tolerabilidade dos lipossomas pelas células, uma vez que estes são tensoativos e podem causar irritação ou morte celular (DIAL et al., 2008; TAN et al., 2013). A citotoxicidade de lipossomas formados por diferentes tipos de sais biliares foi avaliada em células HCE por Dai e colaboradores (DAI et al., 2013). O deoxicolato de sódio mostrou ser o único sal biliar tóxico às células HCE quando associados aos lipossomas, sendo seu efeito correlacionado à concentração de lipídeo utilizada (DAI et al., 2013). Os lipossomas de PC:NaC aqui desenvolvidos também não apresentaram citotoxicidade para as células HCE (Figura 28), corroborando com os resultados obtidos no ensaio do HET-CAM (Figura 27), demonstrando que a formulação desenvolvida é segura para células de epitélio de córnea humana.

Comprovada a viabilidade das células HCE na presença das formulações, avaliou-se a capacidade dessas células em produzirem mediadores pró-inflamatórios, perante um estímulo exógeno para simular a DOS. Diversos estudos descrevem diferentes estímulos para produção de citocinas e quimiocinas em células HCE. Radiação UV-B (PAULOIN et al., 2009), incubação de células com soluções hiperosmolares (de 500 to 700 mOsm/kg) (LIU et al., 2009; ZHENG et al., 2015), soluções de SDS com diferentes concentrações (KIM et al., 2016) e *scratches* associado a incubação com LPS (ESLANI et al., 2014) são todas estratégias que já foram estudadas como estímulo para produção de interleucinas. O tratamento com LPS, entretanto, é o mais frequentemente empregado nos estudos conduzidos em culturas celulares, e principalmente de HCE (SLADOWSKI et al., 2005; NARUMI et al., 2014), justificando a escolha deste como primeiro estímulo para a expressão de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e MMP-9 neste trabalho.

O LPS é um componente da membrana celular de bactérias Gram-negativas, sendo considerado um composto modelo para estudo da irritação e inflamação ocular. Ele age induzindo a inflamação ao estimular a resposta imune inata do hospedeiro, uma vez que se liga ao receptor de complemento CD14, e a outros receptores transmembrana, denominados *toll like* (TLRs), e induz a liberação de citocinas pró inflamatórias, incluindo IL-6, IL-8, TNF- α (ERDINEST et al., 2012). TLRs já foram descritos na GL, córnea humana, conjuntiva e na retina (KUMAR et al., 2004;

PEARLMAN et al., 2008; ERDNEST et al., 2014). Sabe-se que o LPS é capaz de estimular o receptor TLR4. Após o estímulo do receptor TLR, uma cascata de sinalização é iniciada, ativando a via NF- κ B e a secreção de citocinas, quimiocinas e moléculas coestimuladoras (ERDNEST et al., 2014). A ativação de mediadores específicos depende, no entanto, do tipo de receptor transmembrana ao qual o LPS se liga. Ueta e colaboradores (UETA et al., 2014), por exemplo, reportou que células HCE falharam em responder ao estímulo com LPS e peptidoglicana, talvez por falta de receptor TLR4 e TLR2 em sua superfície celular, embora os mesmos estivessem presentes no citoplasma. Em 2005, o mesmo grupo demonstrou a expressão de TLR3 na superfície de células HCE responsivo ao RNA viral, seguido do aumento da expressão gênica e quantificação de mediadores como IFN- γ ; IL-6 e IL-8 (UETA et al., 2005). O mesmo efeito não foi observado, no entanto, com LPS.

Embora existam alguns trabalhos que demonstrem a expressão de IL-1 β e TNF- α em culturas HCE após estímulo com LPS (SLADOWSKI et al. 2005), a ausência da expressão desses mediadores, como ocorrido neste trabalho, foi observada por vários outros autores (UETA et al., 2004; UETA et al., 2005; ERDNEST et al., 2012; NARUMI et al., 2014, CAO et al., 2015). Pode-se entender a discrepância entre os dados encontrados na literatura com base nas diferenças nos padrões de expressão e responsividade de linhagens de células diferentes (KIM et al., 2016). Linhagens celulares imortalizadas, como a utilizada neste trabalho, são geneticamente manipuladas e não propriamente representam linhagens primárias, podendo sofrer alterações no fenótipo, funções nativas e responsividade a determinados estímulos (KAUR e DUFOUR, 2012).

Desta forma, outros protocolos além do estímulo com LPS foram utilizados com o intuito de estimular as células HCE a produzirem IL-1 β e TNF- α , como o *scratch* (na presença e ausência de LPS) (ESLANI et al., 2014) e a incubação com SDS (KIM et al., 2016), conhecido agente irritante. A associação de feridas (*scratches*) com LPS é descrita como estratégia capaz de resultar na expressão dos receptores TLR4 (ESLANI et al., 2014), enquanto que o SDS foi selecionado como padrão de irritação ocular, estimulando a liberação de citocinas (KIM et al., 2016). Entretanto, nenhum deles resultou em expressão detectável de IL-1 β e TNF- α pela técnica empregada em nosso trabalho. Além das diferenças entre as linhagens celulares, Narumi e colaboradores (NARUMI et al., 2014) só conseguiram estimular a liberação de TNF- α por células HCE após estímulo com LPS em associação a células dendríticas (DC)

imaturas, evidenciando que a liberação desse mediador depende da presença do sistema complemento. Erdinest e colaboradores (ERDINEST et al., 2012) também demonstraram a expressão de IL-1 β e TNF- α após estímulo com LPS quando este estava complexado ao CD14, confirmando novamente a importância do sistema complemento para expressão desses mediadores.

Assim, em nosso trabalho, o estímulo das células com LPS resultou na expressão de IL-6 e MMP-9 (Figura 30), mas as células não expressaram IL-1 β e TNF- α em quantidades detectáveis. Desta forma, IL-6 e MMP-9 foram as substâncias escolhidas para serem monitoradas após o tratamento das células com as formulações lipossomais e com a dispersão de INS. É importante ressaltar que os ensaios de viabilidade celular foram realizados após o uso de LPS, *scratch* e SDS de forma a garantir que a concentração e o tempo de estímulo não causassem morte celular (Figura 29), assegurando a viabilidade das células para secreção de citocinas inflamatórias.

Outro ponto a ser observado nos estudos de citotoxicidade é o estímulo proliferativo nas células HCE após incubação com LPS (Figura 29). Em relação ao controle, o número de células viáveis nos grupos tratados com a substância foi maior, fato este que pode ser explicado pelo efeito na migração e proliferação celular causado pelo LPS. Esse efeito causado pela incubação com LPS está bastante relacionado ao processo inflamatório resultante e ao fechamento de feridas. Eslani e colaboradores (ESLANI et al., 2014) mostraram que 100 ng/mL de LPS ultrapuro foi capaz de acelerar o fechamento de uma ferida de *scratch* em culturas de células HCE, demonstrando um aumento na migração e proliferação celular quando incubado com LPS. Para evitar o efeito de proliferação na cultura celular, a concentração de LPS escolhida para os ensaios com as formulações foi de 2000 ng/mL, uma vez que não foi observada diferença significativa no número de células do grupo tratado com LPS em relação ao controle somente células (Figura 29).

Após padronização do protocolo de estímulo das células para produção de mediadores inflamatórios, o estudo objetivou avaliar o tratamento das células HCE com os lipossomas e com a dispersão de INS verificando a influência dessas formulações na expressão de IL-6 e MMP-9. Para tanto, esta avaliação foi feita em um ambiente normal (células sem estímulo pró-inflamatório) e em um ambiente estimulado com LPS, para simular o quadro de inflamação presente na DOS.

Em um primeiro momento, na presença de LPS, os níveis de IL-6 e MMP-9 em HCE foram quantificados e diferentes concentrações do sistema de liberação sem o fármaco (lipossoma branco em concentrações variando de $1,125 \cdot 10^{10}$ a $1,4 \cdot 10^9$ partículas/mL) foram aplicadas às células. Os resultados demonstraram que não houve aumento ou diminuição significativa na produção dos marcadores inflamatórios quando as células foram expostas à concentração de partículas usadas para se ter 1UI de INS ($4 \cdot 10^9$ partículas/mL) (Figura 31). Ou seja, o sistema de liberação sem o fármaco, nas concentrações testadas, não possui efeito pró ou antiinflamatório em células HCE, excluindo-se a hipótese de dano celular causado pela adesão das vesículas às membranas celulares do epitélio de córnea.

Já quando as células estimuladas com LPS foram submetidas ao tratamento com as formulações que continham INS houve um aumento significativo nos níveis de IL-6 (Figura 32A). Este aumento também foi verificado na ausência do estímulo inflamatório (Figura 33A). O aumento dos níveis de IL-6 nas células tratadas com o fármaco com e sem estímulo LPS, sugerem que esse efeito na expressão da interleucina está relacionada à INS e não aos lipossomas. Embora este resultado demonstre aumento da expressão de uma citocina pró-inflamatória pelas células HCE na presença da INS, acredita-se que este seria um cenário favorável para a cicatrização de feridas na superfície ocular, uma vez que a DOS resulta muitas vezes em feridas de córnea de difícil cicatrização.

No processo de cicatrização de feridas de córnea, a resposta inflamatória ocorre em benefício da regeneração celular, onde vários fatores de crescimento e citocinas estão envolvidos, como a IL-6 (ARRANZ-VALSERO et al., 2014). Esse mediador pró-inflamatório possui importância no papel de sinalização intracelular após dano celular, agindo como fator inicial na etapa de reorganização e migração celular, sendo interessante para uma resposta aguda a favor da cicatrização (LJUBIMOV; SAGHIZADEH, 2015). No processo de cicatrização, a ativação mitogênica, proliferação e migração celular estão intimamente relacionadas ao processo inflamatório para o fechamento das feridas, que poderia ser favorecido com um aumento agudo na expressão de IL-6.

A MMP-9, por outro lado, exerce um papel mais complexo, tanto na cicatrização de feridas como na DOS. O ambiente inflamado que perpetua na DOS atrai macrófagos que contribuem para a síntese da matriz extracelular (MEC). A MEC está em constante processo de remodelação e sua síntese e degradação acompanha os

processos de regeneração, cura de feridas, processos de fibrose crônicos, morfogênese, invasão e metástase de tumores. Ela regula o crescimento, a proliferação e a diferenciação das células que estão presentes em seu interior (LUO et al., 2004; DE PAIVA et al., 2006). A MMP-9, por ser uma enzima degradadora de MEC produzida pelo epitélio de córnea (SOBRIN et al., 2000), está envolvida no desarranjo da função barreira do epitélio através da lise de proteínas responsáveis por manter as *tight junctions* (DE PAIVA et al., 2006), trazendo danos à superfície ocular quando em excesso, como na DOS.

Pode-se observar na Figura 32B que após o tratamento das células estimuladas com LPS com o lipossoma INS não houve alteração significativa na produção de MMP9, embora a dispersão simples INS tenha diminuído significativamente os níveis do marcador. Essa diferença observada, pode estar relacionada a quantidade de INS livre nos lipossomas. A encapsulação da INS nos lipossomas diminuiu a quantidade de INS livre no meio, em comparação à dispersão de INS, no início do tratamento das células. Assim, a quantidade de INS livre nos lipossomas não foi suficiente para que a mesma impedisse a expressão de MMP-9 como a dispersão de INS quando administrada juntamente ao estímulo inflamatório. Já na ausência de estímulo inflamatório (LPS), o tratamento com a INS, presente no lipossoma ou na dispersão não levou a alterações significativas na expressão de MMP-9, que permaneceu semelhante ao controle.

Como vários estudos têm mostrado os efeitos benéficos da INS na homeostase ocular, o aumento da expressão de IL-6 verificado neste trabalho pode ter um papel benéfico, principalmente em relação ao processo de cicatrização de feridas de córnea. Por outro lado, a INS demonstra, concomitante ao estímulo com LPS, desestimular a expressão de MMP-9 pelas células HCE. Como esta situação não simula um tratamento real da DOS, iniciado quando o quadro inflamatório já está presente, estudos *in vivo* são necessários para verificar se a administração do lipossoma INS afetará a expressão de MMP-9 e IL-6 de forma semelhante ao observado com o tratamento em cultura HCE e se poderá trazer possíveis benefícios clínicos ao tratamento da DOS, como o aumento do volume lacrimal.

Ainda assim, nenhum estudo anterior avaliou a efetividade de um sistema de liberação lipídico em combinação com a INS para tratar células HCE sob estímulo inflamatório causada por LPS. O LPS pode ser considerado um estímulo agressivo às células, e o tratamento concomitante das formulações pode mascarar algum efeito

tardio das formulações. Assim, ressalta-se mais uma vez a importância de estudos complementares para melhor avaliação do sistema de liberação em um organismo como um todo.

Na contramão da terapia convencional, a INS surge como um potente secretagogo e hormônio relevante para a homeostase da superfície ocular e GL. Aliado a isso, temos uma dispersão lipídica que não causa danos complementares às células epiteliares, podendo ser um sistema de liberação promissor para encapsulação da INS na superfície ocular.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos e discutidos no presente trabalho, pode-se concluir que os lipossomas desenvolvidos para encapsulação da INS, obtidos a partir da associação de PC e NaC, são sistemas promissores para o tratamento da DOS, uma vez que apresentaram características físico-químicas e estabilidade física adequadas para a administração ocular. Os estudos de segurança, citotoxicidade, irritação ocular e potencial inflamatório em cultura de células de epitélio de córnea humana também se mostraram promissores, à medida que os lipossomas apresentaram baixo potencial irritante em membrana CAM, não causaram morte celular e nem potencializaram o processo inflamatório instalado em um modelo *in vitro* de inflamação da superfície ocular mediada por LPS. A INS demonstrou não estimular a expressão de MMP-9 neste modelo, sugerindo um papel importante no tratamento da DOS, enquanto que o aumento na IL-6 pode trazer benefícios para o processo de cicatrização de feridas de córnea. Os estudos sugerem que esses lipossomas podem vir a ser testados *in vivo* para avaliação de seu potencial clínico para tratamento da DOS e auxílio no tratamento de feridas de córnea, sendo uma alternativa promissora às terapias existentes hoje.

REFERÊNCIAS

AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v 8, 2013.

AKSUNGUR, P. et al. Development and characterization of Cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular drug delivery: Cellular toxicity, uptake, and kinetic studies. **Journal of controlled release**, v. 151, n. 3, p. 286-294, 2011.

ALANY, R.G. et al. W/O microemulsions for ocular delivery: Evaluation of ocular irritation and precorneal retention. **Journal of Controlled Release**, v.111, p. 145–152, 2006.

ALBIETZ, J. M.; BRUCE, A. S. The conjunctival epithelium in dry eye subtypes: effect of preserved and non-preserved topical treatments. **Current Eye Research**, v. 22, n. 1, p. 8-18, 2001.

ALI, Y.; LEHMUSSAARI, K. Industrial perspective in ocular drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 11, p. 1258-1268, 2006.

ALLEN, T.M.; CULLIS, P.R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p.36- (2013) 36–48, 2013.

ALMGREN, M. Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes**, v. 1508, n. 1, p. 146-163, 2000.

ALVES, M. C. et al. Tear film and ocular surface changes in diabetes mellitus. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 71, n. 6, p. 96-103, 2008.

ALVES, M. et al. Dry Eye Disease Treatment: A Systematic Review of Published Trials and a Critical Appraisal of Therapeutic Strategies. **The Ocular Surface**, v. 11, n.3, p.29-50, 2010.

AMENITSCH, H. et al. Existence of hybrid structures in cationic liposome/DNA complexes revealed by their interaction with plasma proteins. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 1, p. 141-146, 2011.

AMIDI, M. et al. Preparation and physicochemical characterization of supercritically dried insulin-loaded microparticles for pulmonary delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 2, p. 191-200, 2008.

AMMAR, H. O. et al. Nanoemulsion as a potential ophthalmic delivery system for dorzolamide hydrochloride. **AAPS Pharmscitech**, v. 10, n. 3, p. 808, 2009.

ANABOUSHI, S. et al. Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 60, n. 2, p. 295-303, 2005.

ANDREANI, T. et al. Preparation and characterization of PEG-coated silica nanoparticles for oral insulin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, n. 1, p. 627-635, 2014.

ANGLADE, E. et al. Next-generation calcineurin inhibitors for ophthalmic indications. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 16, n. 10, p. 1525-1540, 2007.

ANVISA. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**, 2ed., 2012.

ANVISA. **Resolução RE nº899**, de 29 de maio de 2003.

ARAMAKI, Y. et al. Stability of liposomes in vitro and their uptake by rat Peyer's patches following oral administration. **Pharmaceutical research**, v. 10, n. 8, p. 1228-1231, 1993.

ARRANZ-VALSERO, I. et al. IL-6 as a corneal wound healing mediator in an in vitro scratch assay. **Experimental Eye Research**, v. 125, p. 183-192, 2014.

ATCHISON, D.A.; SMITH, G.; SMITH, G. **Optics of the human eye**. Butterworth-Heinemann, Oxford, Reino Unido, 2000.

AZIZI, S. et al. Evaluation of the Corneal Layers in Meibomian Gland-Dysfunction-Related Dry Eye by In Vivo Slit Scanning Confocal Microscopy. **Seminars in Ophthalmology**, p.1-7, 2016.

BAEYENS, V.; GURNY, R. Chemical and physical parameters of tears relevant for the design of ocular drug delivery formulations. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 72, n. 4, p. 191-202, 1997.

BANGHAM, A. D. A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids. **Nature**, v.192, n.480, p.1197-1198, 1961.

BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.M.; WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v.13, p. 238-252, 1965.

BARABINO, S. et al. Ocular surface immunity: homeostatic mechanisms and their disruption in dry eye disease. **Progress in Retinal And Eye Research**, v.31; n.3, p.271-285, 2012.

BARABINO, S. et al. Understanding symptoms and quality of life in patients with dry eye syndrome. **The Ocular Surface**, v. 14, n. 3, p. 365-376, 2016.

BARTLETT, J.D. et al. Insulin administration to the eyes of normoglycemic human volunteers. **Journal of Ocular Pharmacology**, v. 10, n.4, p.683-690, 1994.

BASKIN, R.; FROST, L. D. Bile salt–phospholipid aggregation at submicellar concentrations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 62, n. 2, p. 238-242, 2008.

BASTION, M.L.; LING, K.P. Topical insulin for healing of diabetic epithelial defects: a retrospective review of corneal debridement during vitreoretinal surgery in Malaysian patients. **The Medical Journal of Malaysian**, v.68, n.3, p.208-216, 2013.

BATISTA, C.M.; DE CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BAUDOUIIN, C. et al. Role of Hyperosmolarity in the Pathogenesis and Management of Dry Eye Disease: Proceedings of the OCEAN Group Meeting. **The Ocular Surface**, v.11, n.4, p. 246-258, 2013.

BAUDOUIIN, C. The pathology of dry eye. **Survey of Ophthalmology**, v. 45, p. S211-S220, 2001.

BENEDETTI, M. S. et al. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics. Drug Metabolism Reviews**, v. 41, n. 3, p. 344-390, 2009.

BENÍTEZ-DEL-CASTILLO, J. et al. Visual acuity and quality of life in dry eye disease: Proceedings of the OCEAN group meeting. **The Ocular Surface**, v. 15, n. 2, p. 169-178, 2017.

BENSON, H. A.E. Elastic Liposomes for Topical and Transdermal Drug Delivery: Methods and Protocols. **Pharmaceutical Nanocarriers**, v.1, p. 29-50, 2010.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential–What they are and what they are not?. **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

BIBI, S. et al. Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM. **International journal of pharmaceutics**, v. 417, n. 1, p. 138-150, 2011.

BILKHU, P. S. et al. Management of dry eye in UK pharmacies. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 37, n. 5, p. 382-387, 2014.

BLLENKE, E.O.; MASTROBASTTI, E.; SCHIFFERLERS, R.M. Strategies for triggered drug release from tumor targeted liposomes. **Expert Opinion. Drug Delivery**, v. 10, p.1399-1410, 2013.

BLISS, M. **The Discovery of Insulin**. University of Chicago Press, 2013.

BOEHM, N. et al. Proinflammatory cytokine profiling of tears from dry eye patients by means of antibody microarrays. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 10, p. 7725-7730, 2011.

BONNETÉ, F. Macromolecular crystallization controlled by colloidal interactions: the case of urate oxidase. **Crystallization - Science and Technology**. 2012.

BOOTH, D. S.; AVILA-SAKAR, A.; CHENG, Y. Visualizing proteins and macromolecular complexes by negative stain EM: from grid preparation to image acquisition. **Journal of Visualized Experiments**, n. 58, p. e3227-e3227, 2011.

BOWLING, E.; RUSSELL, G. E. Topical Steroids and the treatment of dry eye. **Review of Cornea and Contact Lenses**, v. 3, 2011.

BRANGE, Jens; LANGKJØER, Lotte. Insulin structure and stability. In: **Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs**. Springer US, 1993. p. 315-350.

BRON, A. J. et al. **Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit**. 1997.

CAO, Y.; BINDSLEV, D. A.; KJÆRGAARD, S. K. Estimation of the in vitro eye irritating and inflammatory potential of lipopolysaccharide (LPS) and dust by using reconstituted human corneal epithelium tissue cultures. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 25, n. 5, p. 402-409, 2015.

CASTILE, J.D.; TAYLOR, K. M.G. Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze–thaw extrusion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 188, n. 1, p. 87-95, 1999.

CEVC, G. et al. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1368, p.201–215, 1998.

CHANDAROY, P. et al. Utilizing temperature-sensitive association of Pluronic F-127 with lipid bilayers to control liposome cell adhesion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1559, p.32-42, 2002.

CHEN, H. et al. Histochemical study on rat tear film and ocular surface epithelial cells. **Current Eye Research**, v. 17, n. 6, p. 642-649, 1998.

CHEN, Y., et al. Enhanced bioavailability of the poorly water-soluble drug fenofibrate by using liposomes containing a bile salt. **International Journal of Pharmaceutics**, v.376, n.1, p.153-160, 2009.

- CHETONI, P. et al. Liposomes as a potential ocular delivery system of distamycin A. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 492, n. 1, p. 120-126, 2015.
- CHIANG, Y. et al. Initial steps in the anoxic metabolism of cholesterol by the denitrifying Sterolibacterium denitrificans. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 18, p. 13240-13249, 2007.
- CHIEN, Y.W. Human insulin: basic sciences to therapeutic uses. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 22, n. 8, p. 753-789, 1996.
- CHOLKAR, Kishore et al. Novel strategies for anterior segment ocular drug delivery. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 2, p. 106-123, 2013.
- COLLIGRIS, B.; ALKOZI, H.A.; PINTOR, J. Recent developments on dry eye disease treatment compounds. **Saudi Journal of Ophthalmology**, v. 28, p. 19-30, 2014.
- COLLINS, M. L. Z.; TRABOULSI, E. I.; MAUMENEE, I. H. Optic Nerve Head Swelling and Optic Atrophy in the Systemic Mucopolysaccharides. **Ophthalmology**, v. 97, n. 11, p. 1445-1449, 1990.
- CONRADY, C. D.; JOOS, Z. P.; PATEL, B. CK. Review: The Lacrimal Gland and Its Role in Dry Eye. **Journal of Ophthalmology**, v. 2016, 2016.
- CONWAY-JACOBS, A.; LEWIN, L.M. Isoelectric focusing in acrylamide gels: use of amphoteric dyes as internal markers for determination of isoelectric points. **Analytical Biochemistry**, v. 43, 394-400.
- COSTA, V.P. et al. The prevalence of ocular surface complaints in Brazilian patients with glaucoma or ocular hypertension. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 76, n. 4, p. 221-225, 2013.
- COURSEY, T.G. et al. Dexamethasone nanowafer as an effective therapy for dry eye disease. **Journal of Controlled Release**, v.213, p.168-174, 2015.
- CRAIG, J. P. et al. Effect of a liposomal spray on the pre-ocular tear film. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 33, n. 2, p. 83-87, 2010.
- CRUZ, E.L.C.M. **Evaluation of topical formulations based insulin disorder of lacrimal glands and in the regeneration of the córnea in diabetic rats.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

CUI, M. et al. Liposomes containing cholesterol analogues of botanical origin as drug delivery systems to enhance the oral absorption of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.489, p.277-284, 2015.

CUNHA, D. A et al. Insulin secretion by rat lachrymal glands: effects of systemic and local variables. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 289, n. 5, p. 768-75, 2005.

CWIKLIK, L. Tear film lipid layer: A molecular level view. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1858, n. 10, p. 2421-2430, 2016.

DAI, Y. et al. Liposomes containing bile salts as novel ocular delivery systems for tacrolimus (FK506): in vitro characterization and improved corneal permeation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 1921-1933, 2013.

DANGI, J.S., VYAS, S.P., VIXIT, V.K. Effect of various lipid bile salt mixed micelles in the intestinal absorption of Amphotericin B in rat. **Drug Development Industrial Pharmacy**, v.24, p.631-635, 1998.

DARTT, D. A. Tear lipocalin: structure and function. **The Ocular Surface**, v. 9, n. 3, p. 126-138, 2011.

DAVIDSON, H.J.; KUONEN, V.J. The tear film and ocular mucins (Review). **Veterinary Ophthalmology**, v.7, n. 2, p. 71-7, 2004.

DAVIDSON, Harriet J.; KUONEN, Vanessa J. The tear film and ocular mucins. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 2, p. 71-77, 2004.

DE OLIVEIRA, A. G. L. et al. Ensaios da membrana cório-alantoide (HET-CAM e CAM-TBS): alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 153-159, 2012.

DE PAIVA, C. S. et al. Corticosteroid and doxycycline suppress MMP-9 and inflammatory cytokine expression, MAPK activation in the corneal epithelium in experimental dry eye. **Experimental Eye Research**, v. 83, n. 3, p. 526-535, 2006.

DEGIM, Z. et al. The effect of various liposome formulations on insulin penetration across Caco-2 cell monolayer. **Life Sciences**, v.75, n.23, p.2819-2827, 2004.

DELPLACE, V.; PAYNE, S.; SHOICHET, M.. Delivery strategies for treatment of age-related ocular diseases: From a biological understanding to biomaterial solutions. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 652-668, 2015.

DIAL, E. J. et al. Role of phosphatidylcholine saturation in preventing bile salt toxicity to gastrointestinal epithelia and membranes. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, n. 3, p. 430-436, 2008.

DING, J.; SULLIVAN, D.A. Aging and dry eye disease. **Experimental Gerontology**, v.47, p. 483-490, 2012.

DONNENFELD, E.; PFLUGFELDER, S. C. Topical ophthalmic cyclosporine: pharmacology and clinical uses. **Survey of Ophthalmology**, v. 54, n. 3, p. 321-338, 2009.

DRY EYE WORKSHOP (DEWS). The epidemiology of dry eye disease: report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop Committee. **Ocular Surface**, v.5, n.2, p.65-204, 2007.

DUEHRKOP, C. et al. Development and characterization of an innovative heparin coating to stabilize and protect liposomes against adverse immune reactions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.141, p.576-583, 2016.

EBRAHIM, S.; PEYMAN, G. A.; LEE, P. J. Applications of liposomes in ophthalmology. **Survey of Ophthalmology**, v. 50, n. 2, p. 167-182, 2005.

EL BAYOUMI, T.A.; TORCHILIN, V.P. Current Trends in Liposome Research: Methods and Protocols. **Pharmaceutical Nanocarriers**, v.1, p. 29-50, 2010.

EL SANHARAWI, M. et al. Protein delivery for retinal diseases: from basic considerations to clinical applications. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 29, n. 6, p. 443-465, 2010.

EL SANHARAWI, M. et al. Protein delivery for retinal diseases: from basic considerations to clinical applications. **Progress in retinal and eye research**, v. 29, n. 6, p. 443-465, 2010.

ELNAGGAR, Y.S.R. Multifaceted applications of bile salts in pharmacy: an emphasis on nanomedicine. **International Journal of Nanomedicine**, v.10, p. 3955–3971, 2015.

ERDINEST, N. et al. Anti-Inflammatory Effects of Alpha Linolenic Acid on Human Corneal Epithelial Cells Effects of PUFAs on HCE Cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 53, n. 8, p. 4396-4406, 2012.

ERDINEST, N. et al. Expression and activation of toll-like receptor 3 and toll-like receptor 4 on human corneal epithelial and conjunctival fibroblasts. **Journal of Inflammation**, v. 11, n. 1, p. 3, 2014.

ERICKSON, H. P. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. **Biological Procedures Online**, v. 11, n. 1, p. 32, 2009.

ESLANI, M. et al. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Corneal Epithelial Wound Healing TLR4 in Corneal Epithelial Wound Healing. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 55, n. 9, p. 6108-6115, 2014.

FAN, Y.; ZHANG, Q. Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p.81-87, 2013.

FANGUEIRO, J. et al. Ocular Drug Delivery-New Strategies for targeting anterior and posterior segments of the eye. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 9, p. 1135-1146, 2016.

FANGUEIRO, J. F. et al. Design of cationic lipid nanoparticles for ocular delivery: Development, characterization and cytotoxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461, p.64-73, 2014.

FANGUEIRO, Joana F. et al. Current nanotechnology approaches for the treatment and management of diabetic retinopathy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 95, p. 307-322, 2015.

FARRIS, R. L. Tear osmolarity—a new gold standard?. In: **Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes**. Springer US, 1994. p. 495-503.

FDA Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods. **Center for Drug Evaluation and Research**, US Food and Drug Administration, 1994.

FILIPE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796-810, 2010.

FONSECA, E. C.; ARRUDA, V.G.; ROCHA, E.M. Olho seco: etiopatogenia e tratamento. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 73, n. 2, p. 197-203, 2010.

FONTANA, M.C. et al. Controlled release of raloxifene by nanoencapsulation: effect on in vitro antiproliferative activity of human breast cancer cells. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 2979, 2014.

FOULKES, G. N. The correlation between the tear film lipid layer and dry eye disease. **Survey of Ophthalmology**, v. 52, n. 4, p. 369-374, 2007.

FREE, J.P.H.; COLLIER, P.S.; DUNDEE, J.W. Bioavailability of three formulations of intravenous diazepam. **Acta Anaesthesiology**, v.30, p.337-340, 1986.

FUJIHARA, T. et al. INS365 suppresses loss of corneal epithelial integrity by secretion of mucin-like glycoprotein in a rabbit short-term dry eye model. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 18, n. 4, p. 363-370, 2002.

FUJII, A. et al. Lacritin-Induced Secretion of Tear Proteins From Cultured Monkey Lacrimal Acinar CellsLacritin-Induced Secretion of Tear Proteins. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.54, n.4, p. 2533-2540, 2013.

GAUDANA, R. et al. Recent perspectives in ocular drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1197, 2009.

GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GAUSE, S. et al. Mechanistic modeling of ophthalmic drug delivery to the anterior chamber by eye drops and contact lenses. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 233, p. 139-154, 2016.

GEORGIEV, D. Photons do collapse in the retina not in the brain cortex: evidence from visual illusions. **Neuro Quantology**, v. 9, n. 2, p. 206-30, 2011.

GILLERON, L. et al. Evaluation of the HET-CAM-TSA method as an alternative to the Draize eye irritation test. **Toxicology in vitro**, v. 11, n. 5, p. 641-644, 1997.

GLATTER, O. T. T. O. A new method for the evaluation of small-angle scattering data. **Journal of Applied Crystallography**, v. 10, n. 5, p. 415-421, 1977.

GÓMEZ-PÉREZ, F. J.; RULL, J. A. Insulin therapy: current alternatives. **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 3, p. 258-272, 2005.

GOYAL, R. et al. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 77-92, 2016.

GREGORIADIS, G.; BACON, A.; CAPARROS-WANDERLEY, W.; MCCORMACK, B. A role for liposomes in genetic vaccination. **Vaccine**, v.20, p.1-9, 2002.

GREGORIADIS, G.; LEATHWOOD, P. D.; RYMAN, B. E. Enzyme entrapment in liposomes. **FEBS Letters**, v. 14, p. 95–99, 1971.

GRIFFITHS, G. W., SCHIESSER, W.E. Analysis of cornea curvature using radial basis functions–Part I: Methodology. **Computers in Biology and Medicine**, v. 77, p. 274-284, 2016.

GUALANDI-SIGNORINI, A. M.; GIORGI, G. Insulin formulations-a review. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 5, p. 73-84, 2001.

GUENTERT; T.W. et al. Interaction of mixed micelles formed from glycocholic acid and lecithin with the protein binding of various drugs. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.23, p.569-577, 1987.

GUSAROV, D. A. et al. Genetically engineered insulin and its pharmaceutical analogues. **Biochemistry Supplement Series B: Biomedical Chemistry**, v.2, n.4, p.356-366, 2008.

GUTFREUND, H. The molecular weight of insulin and its dependence upon pH, concentration and temperature. **Biochemical Journal**, v. 42, n. 4, p. 544, 1948.

HANN, L. E.; KELLEHER, R. S.; SULLIVAN, D. A. Influence of culture conditions on the androgen control of secretory component production by acinar cells from the rat lacrimal gland. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 32, n. 9, p. 2610-2621, 1991.

HARTLEY, C.; WILLIAMS, D.L.; ADAMS, V.J. Effect of age, gender, weight and time of day on tear production In normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 1, p.53-57, 2006

HE, W. et al. In vitro and in vivo studies on ocular vitamin A palmitate cationic liposomal in situ gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 458, n. 2, p. 305-314, 2013.

HENRIKSSON, J. T. et al. IL-13 Stimulates Proliferation and Expression of Mucin and Immunomodulatory Genes in Cultured Conjunctival Goblet CellsThe Effects of IL-13. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 56, n. 8, p. 4186-4197, 2015.

HOFAUER, B. et al. Effekt liposomaler Lokalthherapie auf die Sicca-Symptomatik des primären Sjögren-Syndroms. **Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik**, v.61, n.11, p.921-927, 2013.

HRYNYK, M.; NEUFELD, R.J. Insulin and wound healing. **Burns**, v. 40, p. 1433-1446, 2014.

HU, S. et al. Integrity and stability of oral liposomes containing bile salts studied in simulated and ex vivo gastrointestinal media. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, p. 693– 700, 2013.

HUA, Q. Insulin: a small protein with a long journey. **Protein & Cell**, v. 1, n. 6, p. 537-551, 2010.

HUUS, K. et al. Ligand Binding and Thermostability of Different Allosteric States of the Insulin Zinc-Hexamer. **Biochemistry**, v.45, p.4014-4024, 2006.

HUUS, K. et al. Thermal Dissociation and Unfolding of Insulin. **Biochemistry**, v. 44, p. 11171-11177, 2005.

IM, J.H.; PILLION, D.J.; MEEZAN, E. Comparison of insulin receptors from bovine retinal blood vessels and nonvascular retinal tissue. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.27, p.1681-1690, 1986.

INSTRUMENTS, Malvern. **Zetasizer nano series user manual**. Worcestershire: Malvern Instruments Ltd, 2004.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Guidance for industry Q2B: Validation of Analytical Procedures. Methodology**. 2005.

IWANAGA, K. et al. Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes: improvement of stability of insulin in GI tract. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 157, p.73–80, 1997.

JACOB, D. et al. Synthesis and identification of FITC-insulin conjugates produced using human insulin and insulin analogues for biomedical applications. **Journal of fluorescence**, v. 26, n. 2, p. 617-629, 2016.

JAIN, P. et al. An NGF mimetic, MIM-D3, stimulates conjunctival cell glycoconjugate secretion and demonstrates therapeutic efficacy in a rat model of dry eye. **Experimental Eye Research**, v.93, p.203-512, 2011.

JAMSHAD, M. et al. Poloxamer sorption on liposomes: comparison with polystyrene latex and influence on solute efflux. **International Journal of Pharmaceutics**, v.48, p.125-131, 1988.

JANAGAM, D. R.; WU, L.; LOWE, T. L. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2017. No prelo.

JÄRVINEN, K.; JÄRVINEN, T.; URTTI, A. Ocular absorption following topical delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 1, p. 3-19, 1995.

JENSEN, M.H. et al. Small angle X-ray scattering-based elucidation of the self-association mechanism of human insulin analogue lys(B29)(N(ε)ω-carboxyheptadecanoyl) des(B30). **Biochemistry**, v. 52, n.2, p. 282-294, 2013.

JOHANSSON, M. et al. Effect of PEO–PPO–PEO Triblock Copolymers on Structure and Stability of Phosphatidylcholine Liposomes. **Langmuir**, v.15, n.19, p. 6314-6325, 1999.

KAKIZAKI, H. et al. Punctal and canalicular anatomy: implications for canalicular occlusion in severe dry eye. **American Journal of Ophthalmology**, v. 153, n. 2, p. 229-237. e1, 2012.

KANG, K. et al. Anti-inflammatory effect of coumarins isolated from *Corydalis heterocarpa* in HT-29 human colon carcinoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 2129-2134, 2009.

KAUR, G.; DUFOUR, J. M. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. **Spermatogenesis**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2012.

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

KELLY, S.M.; JESS, T. J. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1751, p. 119 – 139, 2005.

KIJLSTRA, A.; KUIZENGA, A.. Analysis and function of the human tear proteins. In: **Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes**. Springer US, 1994. p. 299-308.

KIM, B.; PEPPAS, N. A. In vitro release behavior and stability of insulin in complexation hydrogels as oral drug delivery carriers. **International journal of pharmaceutics**, v. 266, n. 1, p. 29-37, 2003.

KIM, C. et al. Application of SV40 T-transformed human corneal epithelial cells to evaluate potential irritant chemicals for in vitro alternative eye toxicity. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 80, p. 82-89, 2016.

KIM, H. et al. Phenotypic characterization of human corneal epithelial cells expanded ex vivo from limbal explant and single cell cultures. **Experimental Eye Research**, v. 79, n. 1, p. 41-49, 2004.

KIM, Y. C. et al. Ocular delivery of macromolecules. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 172-181, 2014.

KING-SMITH, E. et al. The thickness of the tear film. **Current Eye Research**, v. 29, n. 4-5, p. 357-368, 2004.

KING-SMITH, P. E. et al. The thickness of the human precorneal tear film: evidence from reflection spectra. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 11, p. 3348-3359, 2000.

KING-SMITH, P. E.; HINEL, E. A.; NICHOLS, J. J. Application of a novel interferometric method to investigate the relation between lipid layer thickness and tear film thinning. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 51, n. 5, p. 2418-2423, 2010.

KLOCEK, M. S. et al. Naltrexone and insulin are independently effective but not additive in accelerating corneal epithelial healing in type I diabetic rats. **Experimental eye research**, v. 89, n. 5, p. 686-692, 2009.

KNUDSEN, K.B.; et al. In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 2, p.467-477, 2015.

KOKKONA, M. et al. Stability of SUV liposomes in the presence of cholate salts and pancreatic lipases: effect of lipid composition. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.9, n.3, p.245-252, 2000.

KOSTARELOS, K.; TADROS, T.F.; LUCKHAM, Physical Conjugation of (Tri-) Block Copolymers to Liposomes toward the Construction of Sterically Stabilized Vesicle Systems. **Langmuir**, v.15, n.2 p.369-376, 1999.

KUMAR M.V. et al. Innate immunity in the retina: toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. **Journal Neuroimmunology**, v.153, p.7-15, 2004.

KUNTSCHKE, J.; HORST, J. C.; BUNJES, H.. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. **International journal of pharmaceuticals**, v. 417, n. 1, p. 120-137, 2011.

LA MAZA, A.; PARRA, J. L. Vesicle to micelle phase transitions involved in the interaction of sodium cholate with phosphatidylcholine liposomes. **Colloids and Surfaces**, v.127, p. 125-134, 1997.

LADNER, D.A. et al. Nanoparticle Rejection by Microfiltration and Ultrafiltration Membranes. **International Conference on the Environmental Implications of Nanotechnology**, Los Angeles, CA, 2010. Disponível em: <http://works.bepress.com/david_ladner/12/>. Acesso em: 22 de maio de 2016.

LAIBOVITZ, R. A. et al. Pilot trial of cyclosporine 1% ophthalmic ointment in the treatment of keratoconjunctivitis sicca. **Cornea**, v. 12, n. 4, p. 315-323, 1993.

LANZA, Nicole L. et al. The matrix metalloproteinase 9 point-of-care test in dry eye. **The Ocular Surface**, v. 14, n. 2, p. 189-195, 2016.

LEE, A. J. et al. Prevalence and risk factors associated with dry eye symptoms: a population based study in Indonesia. **British Journal of Ophthalmology**, v. 86, n. 12, p. 1347-1351, 2002.

LEE, H. K. et al. Insulin-like growth factor-1 induces migration and expression of laminin-5 in cultured human corneal epithelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 3, p. 873-882, 2006.

LEE, S. et al. A new therapy concept for the treatment of dry eye--the usefulness of phospholipid liposomes. **Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde**, v. 221, n. 10, p. 825-836, 2004.

LEE, V. HL; TAKEMOTO, K. A.; IIMOTO, D. S. Precorneal factors influencing the ocular distribution of topically applied liposomal inulin. **Current Eye Research**, v. 3, n. 4, p. 585-591, 1984.

LEITE, S. C. et al. Risk factors and characteristics of ocular complications, and efficacy of autologous serum tears after haematopoietic progenitor cell transplantation. **Bone marrow transplantation**, v. 38, n. 3, p. 223-227, 2006.

LI, J. et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.10, p. 81-98, 2015a.

LI, M. et al. Anxiety and depression in patients with dry eye syndrome. **Current eye research**, v. 36, n. 1, p. 1-7, 2011.

LI, P.; NIELSEN, H. M.; MÜLLERTZ, A. Impact of lipid-based drug delivery systems on the transport and uptake of insulin across Caco-2 cell monolayers. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 105, n. 9, p. 2743-2751, 2016.

LI, Q. et al. Human epidermal growth factor receptor-2 antibodies enhance the specificity and anticancer activity of light-sensitive doxorubicin-labeled liposomes. **Biomaterials**, v.57, p.1-11, 2015b.

LIANG, Q. et al. Ocular Surface Epithelial Thickness Evaluation in Dry Eye Patients: Clinical Correlations. **Journal of Ophthalmology**, v. 2016, 2016.

LIM, A.; WENK, M. R.; TONG, L. Lipid-based therapy for ocular surface inflammation and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 12, p. 736-748, 2015.

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

LIN, P. et al. Prevalence of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan: the Shihpai Eye Study. **Ophthalmology**, v. 110, n. 6, p. 1096-1101, 2003.

LIN, P. et al. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 4, p. 711-726, 2014b.

LINARES-ALBA, M. A. et al. Preformulation Studies of a Liposomal Formulation Containing Sirolimus for the Treatment of Dry Eye Disease. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 32, n. 1, p. 11-22, 2016.

LIPOID GmbH. **Phase Transition Temperatures of LIPOID Lecithins and Phospholipids**.Informe técnico. 2011

LIU, H. et al. A link between tear instability and hyperosmolarity in dry eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, n. 8, p. 3671-3679, 2009.

LIU, J. et al. Oral vaccination with a liposome-encapsulated influenza DNA vaccine protects mice against respiratory challenge infection. **Journal of Medical Virology**, v.86, n.5, 886-894, 2014.

LIU, J. et al. Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, n. 1, p. 333-344, 2008.

LIU, J. et al. Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v.340, n.1, p.153-162, 2007.

LJUBIMOV, A. V.; SAGHIZADEH, M. Progress in corneal wound healing. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 49, p. 17-45, 2015.

LÓPEZ, O. et al. Direct formation of mixed micelles in the solubilization of phospholipid liposomes by Triton X-100. **FEBS letters**, v. 426, n. 3, p. 314-318, 1998.

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

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287-291, 1985.

LUEPKE, N. P.; KEMPER, F. H. The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 6, p. 495-496, 1986.

LUEPKE, N.P. The Hen's egg test (HET). An alternative toxicity test. **British Journal of Dermatology**, v. 115, n.31, p.133-135, 1986.

LUO, L. et al. Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.45, p.12, 4293-4301, 2004.

MACRI, F. J.; CEVARIO, S. J. Ciliary ganglion stimulation. II. Neurogenic, intraocular pathway for excitatory effects on aqueous humor production and outflow. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 14, n. 6, p. 471-475, 1975.

MADNI, A. et al. Liposomal Drug Delivery: A Versatile Platform for Challenging Clinical Applications. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 401-426, 2014

MAKARENKOVA, H. P.; DARTT, D. A. Myoepithelial cells: Their origin and function in lacrimal gland morphogenesis, homeostasis, and repair. **Current Molecular Biology Reports**, v. 1, n. 3, p. 115-123, 2015.

MALHOTRA, A. et al. Ocular anatomy and cross-sectional imaging of the eye. In: **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**. WB Saunders, p. 2-13, 2011.

MALKI, L.R. **Morfologia e função das células acinares em cultura primária de glândula lacrimal**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

MASSINGALE, M. L. et al. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients. **Cornea**, v. 28, n. 9, p. 1023-1027, 2009.

MCCAA, C. S. The eye and visual nervous system: anatomy, physiology and toxicology. **Environmental health perspectives**, v. 44, p. 1, 1982.

MCCARTY, C. A. et al. The epidemiology of dry eye in Melbourne, Australia. **Ophthalmology**, v. 105, n. 6, p. 1114-1119, 1998.

MCCULLEY, J. P.; SHINE, W. A compositional based model for the tear film lipid layer. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 95, p. 79, 1997.

MCGINNIGLE, S.; NAROO, S. A.; EPERJESI, F. Evaluation of Dry Eye. **Survey of Ophthalmology**, v. 57, n.4, 2012.

MERTINS, O. **Estudos físico-químicos e estruturais de lipossomas compostos de fosfatidilcolina e quitosana**. Tese (Doutorado). Instituto de Química - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MILJANOVIĆ, B. et al. Impact of Dry Eye Syndrome on Vision-Related Quality of Life. **American Journal of Ophthalmology**, v. 143, n.3, p.409-415, 2007a.

MILJANOVIC, B. M. et al. Prevalence and risk factors for dry eye syndrome among older men in the United States. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, n. 13, p. 4293-4293, 2007b.

MILLAR, T. J.; SCHUETT, B. S. The real reason for having a meibomian lipid layer covering the outer surface of the tear film—a review. **Experimental Eye Research**, v. 137, p. 125-138, 2015.

MISHIMA, S. et al. Determination of tear volume and tear flow. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 5, n. 3, p. 264-276, 1966.

MIYASHITA, H. et al. Long-term homeostasis and wound healing in an in vitro epithelial stem cell niche model. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

MODULO, C. M. et al. Influence of insulin treatment on the lacrimal gland and ocular surface of diabetic rats. **Endocrine**, v. 36, n. 1, p. 161-8, 2009.

MONDAL, N. et al. Effect of different formulation variables on some particle characteristics of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles. **Yakugaku Zasshi**, v. 128, n. 4, p. 595-601, 2007.

MOZAFARI, M. R. Nanoliposomes: preparation and analysis. *Liposomes: Methods and Protocols*. **Pharmaceutical Nanocarriers**, v.1, p. 29-50, 2010.

NA, K. et al. Correlations between Tear Cytokines, Chemokines, and Soluble Receptors and Clinical Severity of Dry Eye Disease Tear Cytokines, Chemokines, and Soluble Receptors in DED. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 53, n. 9, p. 5443-5450, 2012.

NAGATA, M. et al. JBP485 promotes corneal epithelial wound healing. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

NAKAMURA, M.; NISHIDA, T. Differential effects of epidermal growth factor and interleukin 6 on corneal epithelial cells and vascular endothelial cells. **Cornea**, v. 18, n. 4, p. 452-458, 1999.

NAKAMURA, S. et al. Lacrimal hypofunction as a new mechanism of dry eye in visual display terminal users. **Plos One**, v.5, n.6, p.1-10, 2010.

NAKAMURA, T. et al. JBP485 promotes tear and mucin secretion in ocular surface epithelia. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

NARUMI, M. et al. Contribution of Corneal Neovascularization to Dendritic Cell Migration into the Central Area during Human Corneal Infection. **PloS One**, v. 9, n. 10, p. e109859, 2014.

NETTLETON, E.J. et al. Characterization of the Oligomeric States of Insulin in Self-Assembly and Amyloid Fibril Formation by Mass Spectrometry. **Biophysical Journal**, v. 79, p. 1053-1065, 2000.

NIU, M. et al. Enhanced oral absorption of insulin-loaded liposomes containing bile salts: A mechanistic study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.460, p.119-130, 2014.

NIU, M. et al. Liposomes containing glycocholate as potential oral insulin delivery systems: preparation, in vitro characterization, and improved protection against enzymatic degradation. **International Journal of Nanomedicine**, v.6, p.1155-1166, 2011.

NIU, M. et al. Hypoglycemic activity and oral bioavailability of insulin-loaded liposomes containing bile salts in rats: The effect of cholate type, particle size and administered dose. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, p. 265-272, 2012.

OBATA, H. Anatomy and histopathology of the human lacrimal gland. **Cornea**, v. 25, p. S82-S89, 2006.

ODA, K. et al. Mechanism underlying insulin uptake in alveolar epithelial cell line RLE-6TN. **European journal of pharmacology**, v. 672, n. 1, p. 62-69, 2011.

OGURA, Y. Drug delivery to the posterior segment of eye. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, n. 1, p. 1-3, 2001.

OHNISHI, N. et al. Characterization of insulin-loaded liposome using column-switching HPLC. **International Journal of Pharmaceutics**, v.479, p. 302-305, 2015.

OLIVEIRA, C. L. P. **Estudos de Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos por Sistemas Biológicos: Teoria e Aplicações**. Tese (Doutorado). Universidade de Campinas, Campinas, 2005.

OLIVEIRA, C. L. P.; CHANDRASEKARAN, D. A. **Investigating macromolecular complexes in solution by small angle X-ray scattering**. INTECH Open Access Publisher, p. 367-391, 2011.

OLIVEIRA, C. L. P.; PEDERSEN, J.S. **Program package for data treatment, analysis and modeling**. 2009

ONWUBIKO, S. et al. Dry eye disease: Prevalence, distribution and determinants in a hospital-based population. **Contact Lens & Anterior Eye**, v.37., p. 157-161, 2014.

ORIEKHOVA, O.; STOLL, S. Investigation of FeCl₃ induced coagulation processes using electrophoretic measurement, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering: Importance of pH and colloid surface charge. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 461, p. 212-219, 2014.

OSELIERO FILHO, P. L. **Estudo estrutural e termodinâmico de sistemas auto-organizados: micelas em solução**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

PABST, G. et al. Applications of neutron and X-ray scattering to the study of biologically relevant model membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 163, n. 6, p. 460-479, 2010.

PANDIT, J. C. et al. Physical properties of stimulated and unstimulated tears. **Experimental Eye Research**, v. 68, n. 2, p. 247-253, 1999.

PARK, S.; CHOI, S.G.; PARK, E.D.J. Encapsulation enhancement and stabilization of insulin in cationic liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v.415, p.267-272, 2011.

PATIL, Y. P.; JADHAV, S. Novel methods for liposome preparation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 177, p. 8-18, 2014.

PATTINI, B.S.; CHUPIN, V.V.; TORCHILIN, V.P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. **Chemical Reviews**, v. 115, n.19, p. 10938–10966, 2015.

PAULOIN, T. et al. High molecular weight hyaluronan decreases UVB-induced apoptosis and inflammation in human epithelial corneal cells. **Molecular Vision**, v.15, p.577-583, 2009.

PEARLMAN, E. et al. Toll-like receptors at the ocular surface. **Ocular Surface**, v.6, n.3, p.108-116, 2008.

PELICCI, G. et al. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. **Cell**, v. 70, n. 1, p. 93-104, 1992.

PEMBOUONG, G. et al. comprehensive study in triblock copolymer membrane interaction. **Journal of Controlled Release**, v. 151, p. 57–64, 2011.

PFLUGFELDER, S. C.; CORRALES, R. M.; PAIVA, C. S. T helper cytokines in dry eye disease. **Experimental Eye Research**, v. 117, p.118-125, 2013.

PFLUGFELDER, S.C. Antiinflammatory therapy for dry eye. **American Journal of Ophthalmology**, v.137, p. 337–342, 2004.

PHILO, J. S.; ARAKAWA, T. Mechanisms of protein aggregation. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 348-351, 2009.

PIRES DE SÁ, F.A. et al. Liposomal voriconazole (VOR) formulation for improved ocular delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.133, p.331-338, 2015.

PRYDAL, J. I. et al. Study of human precorneal tear film thickness and structure using laser interferometry. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 33, n. 6, p. 2006-2011, 1992.

RANTAMÄKI, A. H. et al. Human tear fluid lipidome: from composition to function. **PloS One**, v. 6, n. 5, p. e19553, 2011.

RAWAT, S. et al. Molecular mechanism of poly (vinyl alcohol) mediated prevention of aggregation and stabilization of insulin in nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 4, p. 1018-1030, 2015.

REDFERN, R.L. et al. Dry eye modulates the expression of toll-like receptors on the ocular surface. **Experimental Eye Research**, v. 134, p.80-89, 2015.

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

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125-1131, 2008.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RISTORI, S. et al. Structural study of liposomes loaded with a GM3 lactone analogue for the targeting of tumor epitopes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes**, v. 1788, n. 12, p. 2518-2525, 2009.

ROBINSON, J. C. Ocular anatomy and physiology relevant to ocular drug delivery. **Drugs and the Pharmaceutical Sciences**, v. 58, p. 29-57, 1993.

ROCHA, E. M. et al. Characterization of the insulin-signaling pathway in lacrimal and salivary glands of rats. **Current Eye Research**, v. 21, n. 5, p. 833-842, 2000.

ROCHA, E.M. et al. Insulin, insulin receptor and insulin-like growth factor-I receptor on the human ocular surface. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.10, p.506-607, 2002.

RODRIGUEZ-ALLER, M. et al. In vivo characterization of a novel water-soluble Cyclosporine A prodrug for the treatment of dry eye disease. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 3, p. 544-552, 2012.

ROMOREN, K. et al. Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in salmonid cell lines of hepatocyte and macrophage origin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1663, p. 127 – 134, 2004.

SAH, S. P. et al. Animal models of insulin resistance: A review. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 6, p. 1165-1177, 2016.

SAJEESH, S.; SHARMA, C.P. Cyclodextrin-insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, n. 1, p. 147-154, 2006a.

SAJEESH, S.; SHARMA, C.P. Interpolymer complex microparticles based on polymethacrylic acid-chitosan for oral insulin delivery. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 99, n. 2, p. 506-12, 2006b.

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.

SANTANDER-ORTEGA, M. J. et al. Colloidal stability of pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: a variety of stabilisation mechanisms. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 302, n. 2, p. 522-529, 2006.

SARAGAS, S. et al. Reversal of wound strength retardation by addition of insulin to corticosteroid therapy. **Annals of Ophthalmology**, v. 17, n. 7, p. 428-430, 1985.

SARMENTO, B. et al. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of insulin from nanoparticulate systems. **Biomedical Chromatograph**, v. 20, p. 898–903, 2006.

SCHAUMBERG, D. A. et al. Prevalence of dry eye syndrome among US women. **American journal of ophthalmology**, v. 136, n. 2, p. 318-326, 2003.

SCHIFFMAN, R. M. et al. Utility assessment among patients with dry eye disease. **Ophthalmology**, v. 110, n. 7, p. 1412-1419, 2003.

SCHMIDL, D. et al. Tear film thickness after treatment with artificial tears in patients with moderate dry eye disease. **Cornea**, v. 34, n. 4, p. 421-426, 2015.

SERCOMBE, L. et al. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. **Frontiers in Pharmacology**, v.6, 2015.

SEVERINO, P. et al. Solid lipid nanoparticles for hydrophilic biotech drugs: Optimization and cell viability studies (Caco-2 & HEPG-2 cell lines). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 81, p.28-34, 2014.

SHAFFER, C. Nanomedicine transforms drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 23, p. 1581-1582, 2005.

SHANLEY, L. J. et al. Insulin, not leptin, promotes in vitro cell migration to heal monolayer wounds in human corneal epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.45, n.4, p.1088-1094, 2004.

SHARMA, V.K.; BAJAJ, H.; KALONIA, D.S. Reversible Self-Association of Pharmaceutical Proteins: Characterization and Case Studies: Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing **Biopharmaceuticals**, p.444-445, 2010.

SHEN, G.; MA, X. High Levels of 17β -Estradiol Are Associated with Increased Matrix Metalloproteinase-2 and Metalloproteinase-9 Activity in Tears of Postmenopausal Women with Dry Eye. **Journal of Ophthalmology**, v.2016, 2016.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: III. Aplicação à insulina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.39, n.1, p. 21-40, 2003.

SILVA, J. D. F. et al. Microemulsions: components, characteristics, potentialities in food chemistry and other applications. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1196-1206, 2015.

SISTO, M. et al. Sjögren's syndrome pathological neovascularization is regulated by VEGF-A-stimulated TACE-dependent crosstalk between VEGFR2 and NF- κ B. **Genes and Immunity**, v. 13, n. 5, p. 411-420, 2012.

SITTERBERG, J. et al. Utilising atomic force microscopy for the characterization of nanoscale drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, n. 1, p. 2-13, 2010.

ŚLADOWSKI, D. et al. Culture of the primary corneal epithelium as a potential component of test batteries for eye irritancy testing. **Toxicology in vitro**, v. 19, n. 7, p. 875-878, 2005.

SMERDON, D. Anatomy of the eye and orbit. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 11, n. 6, p. 286-292, 2000.

SOBOTTA, J. **Atlas de Anatomia Humana**. 21ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SOBRIN, L. et al. Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid and corneal epithelial culture supernatant. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 7, p. 1703-1709, 2000.

SOLOMON, A. et al. Pro-and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, n. 10, p. 2283-2292, 2001.

SONG, F. et al. Insulin Restores an Altered Corneal Epithelium Circadian Rhythm in Mice with Streptozotocin-induced Type 1 Diabetes. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

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.

SOUZA, J.G. et al. Topical delivery of ocular therapeutics: carrier systems and physical methods. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.66, p. 507–530, 2013.

STEILING, W. et al. The HET–CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. **Toxicology in vitro**, v. 13, n. 2, p. 375-384, 1999.

STERN, M. E. et al. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. **Cornea**, v. 17, n. 6, p. 584-589, 1998.

STEVENSON, W.; CHAUHAN, S. K.; DANA, R. Dry eye disease: an immune-mediated ocular surface disorder. **Archives of Ophthalmology**, v. 130, n. 1, p. 90-100, 2012.

STEVENSON, W.; PUGAZHENDHI, S.; WANG, M. Is the main lacrimal gland indispensable? Contributions of the corneal and conjunctival epithelia. **Survey of Ophthalmology**, v. 61, n. 5, p. 616-627, 2016.

STRATFORD, R. E. et al. Ocular distribution of liposome-encapsulated epinephrine and inulin in the albino rabbit. **Current Eye Research**, v. 2, n. 6, p. 377-386, 1982.

STRAUS, D.S. Effects of insulin on cellular growth and proliferation. **Life Sciences**, v. 29, n.21, p. 2131-2139, 1981.

STRYJEWSKA, A. et al. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. **Pharmacological Reports**, v.65, p.65, 1086-1101, 2013.

SULLIVAN, D. A. Tearful relationships? Sex, hormones, the lacrimal gland, and aqueous-deficient dry eye. **The Ocular Surface**, v. 2, n. 2, p. 92-123, 2004.

TAN, Y. et al. Lecithin in mixed micelles attenuates the cytotoxicity of bile salts in Caco-2 cells. **Toxicology in vitro**, v. 27, n. 2, p. 714-720, 2013.

THOFT, Richard A.; FRIEND, Judith. Biochemical transformation of regenerating ocular surface epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 16, n. 1, p. 14-20, 1977.

TIFFANY, J. M.; DART, J. K. G. Normal and abnormal functions of meibomian secretion. In: **Royal Society of Medicine International Congress and Symposium Series**. 1981. p. 1061-1064.

TOMLINSON, A. et al. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 10, p. 4309-4315, 2006.

TORCHILIN, V.P. Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers. **Nature Reviews**, v.4, 2005.

TSENG, C. et al. Synergistic effect of artificial tears containing epigallocatechin gallate and hyaluronic acid for the treatment of rabbits with dry eye syndrome. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0157982, 2016.

TSUBOTA, K. et al. New Perspectives on Dry Eye Definition and Diagnosis: A Consensus Report by the Asia Dry Eye Society. **The Ocular Surface**, v. 15, n. 1, p. 65-76, 2017.

TURKENBURG, M.G.W. et al. PDB ID: 1 ZNI. **Protein Data Bank**. 1997. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. Acesso em 05 de março de 2017.

UETA, M. et al. Intracellularly expressed TLR2s and TLR4s contribution to an immunosilent environment at the ocular mucosal epithelium. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3337-3347, 2004.

UETA, M. et al. Triggering of TLR3 by polyI: C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 331, n. 1, p. 285-294, 2005.

URBAN, R. C.; COTLIER, E. Corticosteroid-induced cataracts. **Survey of Ophthalmology**, v. 31, n. 2, p. 102-110, 1986.

USP XXX. **United States Pharmacopeia**, 30 ed., United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, 2007.

VAN DER VAART, R. WEAVER, C.L.; DAVIS, R.M. The Association Between Dry Eye Disease and Depression and Anxiety in a Large Population-Based Study. **American Journal Ophthalmology**, v.159, n. 3, p. 470-474, 2015.

VAN SETTEN, Gysbert-B.; SCHULTZ, Gregory S.; MACAULEY, Shawn. Growth factors in human tear fluid and in lacrimal glands. In: **Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes**. Springer US, 1994. p. 315-319.

VARGA, Z. et al. Characterization of the PEG layer of sterically stabilized liposomes: a SAXS study. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 165, n. 4, p. 387-392, 2012.

VEHOF, J.; HYSI, P. G.; HAMMOND, C. J. A Metabolome-Wide Study of Dry Eye Disease Reveals Serum Androgens as Biomarkers. **Ophthalmology**, v. 124, n. 4, p. 505-511, 2017.

VERÉB, Z. et al. Role of human corneal stroma-derived mesenchymal-like stem cells in corneal immunity and wound healing. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

VIAU, S. et al. Time course of ocular surface and lacrimal gland changes in a new scopolamine-induced dry eye model. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 246, n. 6, p. 857-867, 2008.

VICARIO-DE-LA-TORRE, Marta et al. Design and Characterization of an Ocular Topical Liposomal Preparation to Replenish the Lipids of the Tear Film Ocular. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 55, n. 12, p. 7839-7847, 2014.

WAIZUMI, K.; EGUCHI, T. Novel Observation of Nucleation and Growth of Insulin Crystals via Liquid Droplets Generated by Liquid-Liquid Phase Separation. **Chemistry Letters**, v. 34, n. 12, p. 1654-1655, 2005.

WAKUTA, M. et al. Delayed wound closure and phenotypic changes in corneal epithelium of the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rat. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 48, n. 2, p. 590-596, 2007.

WALLCOTT, B. The lacrimal gland and its veil of tears. **News in Physiological Science**, v. 13, p. 97-103, 1998.

WANG, W. et al. A thermo-responsive protein treatment for dry eyes. **Journal of Controlled Release**, v. 199, p. 156–167, 2015.

WEI-LI, C. **Topical autologous insulin application for the treatment of corneal epithelium defect after ocular surgeries**. Disponível em: <<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01031888>>. Acesso em: 14 maio 2016.

WEISS, M.; STEINER, D. F.; PHILIPSON, L. H. **Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships**. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279029/>>. Acesso em 17 de janeiro de 2017.

WHITE, M.F.; KAHN, C.R. The insulin signaling system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 1, p. 1-4, 1994.

WHITTINGHAM, J.L. et al. Insulin at pH 2: structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation. **Journal of Molecular Biology**, v.318, n.2, p.479-490, 2002.

WI, Y.; ASBELL, P. A. The Core Mechanism of Dry Eye Disease Is Inflammation. **Eye & Contact Lens-Science and Clinical Practice**, v. 40, n. 5, p. 311-311, 2014.

WIESNER, J.; VILCINSKAS, A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. **Virulence**, v. 1, n. 5, p. 440-464, 2010.

WILLIS, R.M. et al. The treatment of aqueous-deficient dry eye with removable punctal plugs. A clinical and impression-cytoogic study. **Ophthalmology**, v.94, p.514-551, 1987.

WILLOUGHBY, C. E. et al. Anatomy and physiology of the human eye: effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function—a review. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v. 38, n. s1, p. 2-11, 2010.

WINTERSTEINER, O.; ABRAMSON, H. A. The isoelectric point of insulin electrical properties of adsorbed and crystalline insulin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 741-753, 1933.

WOOD, I. et al. Coarse grained study of pluronic F127: Comparison with shorter copolymers in its interaction with lipid bilayers and self-aggregation in water. **Journal of Molecular Structure**, v.1109, p.106-113, 2016.

WOODLE, M.C.; NEWMAN, M.S.; MARTIN, F.J. Liposome leakage and blood circulation: Comparison of adsorbed block copolymers with covalent attachment of PEG. **International Journal of Pharmaceutics**, v.88, p. 327–334, 1992.

WOOST, P. G. et al. Effect of growth factors with dexamethasone on healing of rabbit corneal stromal incisions. **Experimental Eye Research**, v. 40, n. 1, p. 47-60, 1985.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456-469, 2011.

XU, X. et al. Application of quality by design to formulation and processing of protein liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, p. 349–359, 2012.

YAGUCHI, S. et al. Surgical management of lacrimal punctal cauterization in chronic GVHD-related dry eye with recurrent punctal plug extrusion. **Bone Marrow Transplant**, v. 47, n.11, p.1465-1469, 2012.

YILMAZ, B.; KADIOGLU, Y. Development and validation of HPLC method for determination of human insulin in pharmaceutical preparation. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 2, n. 2, 2010.

YU, F-S. X. et al. Growth factors and corneal epithelial wound healing. **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 2-3, p. 229-235, 2010.

ZAGON, I. S. et al. Use of topical insulin to normalize corneal epithelial healing in Diabetes Mellitus. **Archives of Ophthalmology**, v. 125, n.8, p. 1082-8, 2007.

ZHAO, X. et al. Insulin nanoparticles for transdermal delivery: preparation and physicochemical characterization and in vitro evaluation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.36, n.10, 1177-1185, 2010.

ZHENG, Q. et al. Reactive oxygen species activated NLRP3 inflammasomes initiate inflammation in hyperosmolarity stressed human corneal epithelial cells and environment-induced dry eye patients. **Experimental Eye Research**, v. 134, p. 133-140, 2015.

ZHOU, L.; BEUERMAN, R. W. Tear analysis in ocular surface diseases. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 31, n. 6, p. 527-550, 2012.

ZHU, X.; WALLMAN, J. Opposite effects of glucagon and insulin on compensation for spectacle lenses in chicks. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, n. 1, p. 24-36, 2009.

ZHU, Y. et al. Enhanced oral bioavailability of capsaicin in mixed polymeric micelles: Preparation, in vitro and in vivo evaluation. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 358-366, 2014.

ZOUKHRI, D. Effect of inflammation on lacrimal gland function. **Experimental Eye Research**, v. 82, p. 885-898, 2006.

ZOUKHRI, D.; MACARI, E.; KUBLIN, C. L. A single injection of interleukin-1 induces reversible aqueous-tear deficiency, lacrimal gland inflammation, and acinar and ductal cell proliferation. **Experimental Eye Research**, v. 84, n. 5, p. 894-904, 2007.

ZUIDAM, N. J. et al. Physical (in) stability of liposomes upon chemical hydrolysis: the role of lysophospholipids and fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1240, n. 1, p. 101-110, 1995.