



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

NAYARA GOMES LIMA SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MEMBRANA DE GELATINA CONTENDO
ÁCIDO ÚSNICO CARREADO EM LIPOSSOMA NO PROCESSO DE
CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURA DE Córnea**

ARACAJU-SE

2018

	SANTOS/NAYARA GOMES LIMA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MEMBRANA DE GELATINA CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO CARREADO EM LIPOSSOMA NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURA DE Córnea 2018
--	--

NAYARA GOMES LIMA SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MEMBRANA DE GELATINA CONTENDO
ÁCIDO ÚSNICO CARREADO EM LIPOSSOMA NO PROCESSO DE
CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURA DE Córnea**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador:

Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

ARACAJU-SE

2018

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237a Santos, Nayara Gomes Lima
Avaliação do efeito da membrana de gelatina contendo ácido úsnico carreado em lipossoma no processo de cicatrização de queimadura de córnea / Nayara Gomes Lima Santos ; orientador Adriano Antunes de Souza Araújo. – Aracaju, 2018.
76 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2018.

1. Membrana de gelatina. 2. Ácido úsnico. 3. Cicatrização. 4. Queimadura de córnea. I. Araújo, Adriano Antunes de Souza, oriente. II. Título.

CDU 61

NAYARA GOMES LIMA SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MEMBRANA DE GELATINA CONTENDO
ÁCIDO ÚSNICO CARREADO EM LIPOSSOMA NO PROCESSO DE
CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURA DE Córnea**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

1º Examinador: Profª. Dra. Tatiana Rodrigues de Moura

2º Examinador: Profª. Dra. Flavia Rodrigues da Silva

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a **Deus**, o responsável por me proporcionar força, coragem, sabedoria e acima de tudo fé.

Aos meus pais, **Claudete** e **Newton**, obrigada por todos os ensinamentos, vocês são fonte de inspiração, são a razão de todas as minhas escolhas e decisões, grandes responsáveis por eu estar onde estou hoje. Amo vocês!

A minha irmã, **Nayane**, que sempre me incentivou e ajudou a buscar novos horizontes, essa conquista também é sua. Você é minha fortaleza!

Ao meu noivo, **Rodrigo**, peça fundamental da minha vida, obrigada por toda cumplicidade, companheirismo e amor. Que o Senhor ilumine a sua vida e que nós estejamos sempre juntos.

Ao meu orientador, Profº. Dr. **Adriano Antunes** e minha co-orientadora Profª. Drª **Paula Nunes**, por toda orientação e ensinamento, muito obrigada por todo o aprendizado proporcionado e oportunidades concedidas. Que Deus abençoe a família de vocês.

Gostaria de agradecer imensamente ao Prof. Dr. **Armando da Silva Cunha Junior** da UFMG, por me receber tão cordialmente em seu laboratório. Em especial quero agradecer à Dra. **Flavia Rodrigues, Rummenigge Oliveira** e **Bruna Lopes**, por toda disponibilidade, apoio e ensinamento durante o curso desse projeto. Meu muito obrigada!

Aos professores Dra. **Tatiana Rodrigues de Moura**, Dr. **Enilton Aparecido Camargo** e Dr. **Waldecy de Lucca Junior** pela contribuição a este trabalho.

Aos membros do **grupo de pesquisa em queimados**, por todo companheirismo e ajuda durante todo o meu percurso na pós-graduação, torço muito por cada um de vocês.

Agradeço também aos colegas do LEFT, em especial **Ana Maria, Bruno, Caio, Gabriela, Lee, Saran** e **Yasmin**, muito obrigada por toda parceria.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação.

A todos, MINHA IMENSA GRATIDÃO!

*“A maior recompensa para o trabalho
do homem não é o que ele ganha com
isso, mas o que ele se torna com isso.”*

(John Ruskin)

RESUMO

Avaliação do efeito da membrana de gelatina contendo ácido úsnico no processo de cicatrização de queimadura de córnea. Santos, N.G.L. 2018.

As queimaduras oculares químicas estão entre as causas mais frequentemente relatadas de lesões oculares. Essas lesões podem variar desde dano epitelial unilateral leve conjuntival ou corneano até danos à conjuntiva e córnea com risco de perda da visão. Sabendo da importância de novas propostas de tratamento para tal afecção, objetivou-se investigar o potencial de membranas à base de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas em promover cicatrização de queimaduras da córnea utilizando modelo animal. A análise da atividade biológica das membranas de gelatina contendo ácido úsnico foi realizada por meio do ensaio da membrana corioalantóica (MCA) na qual ovos de galinha da espécie *Gallus domesticus* e da linhagem Ross. Para avaliação de tolerabilidade ocular da membrana de gelatina foi realizado o Teste de Ovos de Galinha - Teste de Membrana Corioalantóica (HET-CAM). Para a realização do estudo em animais, foram utilizadas 13 coelhas da espécie *New Zealand*, com idade de 3 meses e pesando 2 kg. A lesão química na córnea dos animais foi realizada por exposição ao etanol absoluto durante 30 segundos. Os animais foram divididos em dois grupos do estudo: grupo com lesão tratado com membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas (n=7) e grupo com lesão tratado com membrana de gelatina sem ácido úsnico (n=6). Para avaliação da cicatrização a área lesada foi demarcada com 1 (uma) gota de colírio fluoresceína e exposição à luz de cobalto e então realizado o registro. Afim de identificar células mortas na córnea, 1 (uma) gota de colírio Rosa Bengala (1,0%) foi instilada no olho a ser avaliado, após ser anestesiado topicamente, após 1 minuto os animais foram expostos à luz branca e então realizados os registros. Para avaliação histológica foi utilizado coloração hematoxilina-eosina para avaliação histopatológica padrão e corante tricrômico de Gomori para avaliação de fibras de colágeno. Observou-se que a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas promove neovascularização sem causar toxicidade e são biocompatíveis com o sistema ocular pelos métodos da MCA e HET-CAM. Além de não promover irritabilidade ocular, as membranas promoveram melhor cicatrização de queimadura química alcalina corneana, bem como uma redução do número de células mortas e irritabilidade conjuntival no grupo tratado quando comparado ao grupo controle. Além disso, nos animais tratados com membrana de gelatina contendo ácido úsnico foi observado ausência de tecido de granulação, além de feixes de colágeno organizados, resultado diferente do encontrado nos animais tratados com a membrana sem ácido úsnico. Sendo assim este trabalho mostrou que a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossoma promove cicatrização corneana provocada por queimadura química alcalina de maneira eficiente em coelhos, acompanhado de uma redução na presença de células mortas na córnea lesada e da melhora da irritabilidade conjuntival.

Descritores: Membrana de gelatina. Ácido úsnico. Cicatrização. Queimadura de córnea.

ABSTRACT

Evaluation of the effect of gelatin membrane containing usnic acid in the healing process of corneal burn. Santos, N.G.L. 2018.

Chemical eye burns are among the most frequently reported causes of ocular damage. These lesions may range from mild conjunctival or corneal unilateral epithelial damage to damage to the conjunctiva and cornea with risk of vision loss. Knowing the importance of new treatment proposals for this affection, the objective was to investigate the potential of membranes based on gelatin / usnic acid / liposomes to promote the healing of corneal burns using animal model. Analysis of the biological activity of gelatin membranes containing usnic acid/liposomes was performed by means of the chorioallantoic membrane (CAM) assay where *Gallus domesticus* and Ross lineage eggs. For evaluation of ocular tolerance of the gelatin membrane, the Chicken Eggs Test - Corneal Membrane Test (HET-CAM). For the study in animals, 13 female New Zealand rabbits, aged 3 months and weighing 2 kg, were used. The chemical lesion on the corneas of the animals was performed by exposure to absolute ethanol for 30 seconds. The animals were divided into two study groups: group with lesion treated with gelatin membrane containing usnic acid / liposomes (n = 7) and group with lesion treated with gelatin membrane without acidic / liposomes (n = 6). To evaluate the healing, the injured area was demarcated with 1 (one) drop of eye drops fluorescein, later realized the registry. In order to identify dead cells in the cornea, 1 drop of Bengal Rose eye drops (1.0%) was instilled in the eye to be evaluated, after being topically anesthetized, after 1 minute the animals were exposed to white light and then performed the records. Hematoxylin-eosin staining for standard histopathological evaluation and Gomori trichrome stain for evaluation of collagen fibers were used for histological evaluation. It has been observed that the membrane of gelatin containing usnic acid/liposomes promotes neovascularization without promoting toxicity and is biocompatible with the ocular system by CAM and HET-CAM methods. In addition to not promoting ocular irritability, the membranes promoted improved healing of alkaline corneal chemical burn, as well as reduction in the number of dead cells and conjunctival irritability in the treated group when compared to the control group. Moreover, in animals treated with gelatin membrane containing single acid, there was absence of granulation tissue, in addition to organized collagen bundles, a different result from that found in animals treated with the membrane without single acid. Therefore, this work showed that the membrane of gelatin containing usnic acid promotes corneal healing caused by alkaline chemical burn efficiently in rabbits, accompanied by a reduction in the presence of dead cells in the injured cornea and improvement of conjunctival irritability.

Key-words: Gelatin membrane. Usnic acid. Healing. Corneal burn.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema anatômico do bulbo do olho.....	18
Figura 2: Estrutura da córnea.....	18
Figura 3: Estrutura química do ácido úsnico.....	24
Figura 4 - Membrana corioalantóica (MCA) do embrião de galinha..	26
Figura 5 - Uso dos embriões de galinha para a avaliação de sistemas de liberação de fármacos.....	29
Figura 6 – Equipamentos utilizados para a incubação dos ovos.	33
Figura 7 – Obtenção das imagens da MCA.....	34
Figura 8 – Tratamento das imagens obtidas das MCAs..	35
Figura 9 - Membrana de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas promove neovascularização.....	41
Figura 10 – Membrana de gelatina contendo ácido usnico/lipossomas promove a neovascularização na MCA.....	42
Figura 11 – Áreas em capilares de MCA expostas à membrana de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas..	43
Figura 12: Teste de biocompatibilidade na MCA expostas à membrana de gelatina contendo ácido úsnico	43
Figura 13: Áreas em capilares de mca para avaliação da toxicidade.	44
Figura 14 – Avaliação histológica da MCA.....	45
Figura 15 - Marcação com fluoresceína em dois grupos.....	47
Figura 16 - Marcação com Rosa bengala em dois grupos	49
Figura 17 - Avaliação histológica da córnea após 72 horas.....	50
Figura 18 - Metodologia da lesão de queimadura corneana.....	74
Figura 19 - Posição do examinador para registro de imagem obtidas através do microscópio lâmpada de fenda.....	75
Figura 20 - Posição do animal para obtenção da foto através do microscópio de lâmpada de fenda.....	75
Figura 21 - Corte para avaliação histológica do epitélio corneano.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vantagens e desvantagens do uso de embriões de galinha para avaliação de fármacos e sistemas de liberação de fármacos	28
Tabela 2 – Sistemas de liberação de fármacos e formulações avaliadas por meio do ensaio da MCA	29
Tabela 3 - Índice de irritação ocular (OII).....	44
Tabela 4 - Avaliação da irritabilidade ocular de membranas de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas pelo teste de Draize.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AU/lipossomas: Membranas de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas

AU: Ácido Úsnico

CEUA: Comissão de Ética no uso de animais para experimentação

CONCEA: Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal

EGF: Fator de crescimento epidérmico

FDA: *Food and Drug Administration*

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ou *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

HET – CAM: *Hens Egg Test- Chorion Allantoide Membrane*.

IL1- β : Interleucina 1 beta

MCA: Membrana corioalantóica

MEC: Matriz extracelular

NaOH: Hidróxido de sódio

OII: Índice de irritação ocular

PBS: Tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline*

PDGF: Platelet Derived Growth Factors

rt-PCR: Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase ou *Reverse transcription Polymerase chain reaction*

TGF- β : Fator de transformação do crescimento ou *Transforming growth factor-beta*

TNF- α : Fator de necrose tumoral ou *Tumor necrosis factor-alpha*

UV: Ultravioleta

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular ou *Vascular Endothelial Growth Factor*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Estrutura do globo ocular	17
2.2 Queimadura ocular	18
2.3 Cicatrização de queimadura ocular.....	19
2.4 Epidemiologia das lesões oculares.....	20
2.5 Fisiopatologia das lesões oculares.....	21
2.6 Limitações na administração oftálmica de fármacos.....	22
2.7 Sistemas de liberação de fármacos	23
2.8 Ácido único	23
2.9 Membrana de gelatina contendo ácido único	24
2.10 Avaliação da neovascularização na membrana corioalantóica (MCA) de embrião de galinha.....	25
2.11 Modelo de queimadura corneana em coelho	30
3. OBJETIVOS	31
3.1 Geral	31
3.2 Específicos.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Preparo das membranas de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas	32
4.2 Avaliação da atividade biológica da membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas por meio do ensaio da MCA	32
4.3 Avaliação quantitativa dos vasos nas imagens obtidas da MCA.....	34
4.4 Teste de biocompatibilidade e tolerância ocular (HET-CAM)	36
4.5 Aspectos éticos	37
4.6 Teste de irritabilidade ocular “Draize test”	37
4.7 Indução de lesão química em córnea de coelho	38
4.8 Avaliação da cicatrização da queimadura da córnea pelo marcador Fluoresceína... 39	
4.9 Avaliação da presença de células mortas na córnea pelo marcador Rosa Bengala.. 39	
4.10 Avaliação histológica do epitélio corneano.....	40
4.11 Análise estatística	40
5 RESULTADOS	41

5.1 Membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas promove neovascularização no modelo da MCA	41
5.2 Membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas não promove toxicidade e são biocompatíveis com o sistema ocular pelo método HET-CAM.....	42
5.3 Membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas não promovem irritabilidade ocular	45
5.4 Membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas promove cicatrização de queimadura química alcalina corneana.....	46
5.5 Membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas promove redução da presença de células mortas e da irritabilidade conjuntival.....	47
5.6 Membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossoma não promove alteração histológica do epitélio corneano e estimula reparo estromal	49
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÃO.....	57
PERSPECTIVAS.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO I	72
ANEXO II.....	74
ANEXO III	75
ANEXO IV	76

1. INTRODUÇÃO

As queimaduras oculares químicas estão entre as causas mais frequentemente relatadas de lesões oculares (PFISTER, 1983, ZAGELBAUM et al., 1993, ESLANI, 2014, MASHIGE, 2016). Essas queimaduras ocorrem por acidentes de trabalho, em casa ou em atividades de lazer; tendem a ser bilaterais e são mais frequentes em homens jovens (MORGAN, 1987, SUKATI VN, 2013).

As lesões causadas por queimaduras químicas no olho podem variar desde dano epitelial unilateral leve conjuntival ou córnea até danos à conjuntiva e córnea com risco de perda da visão (KUCKELKORN et al., 2002). O comprometimento da visão e a cegueira resultantes, têm implicações importantes tanto para a saúde quanto para qualidade de vida, além de levar a perdas na economia e perda de oportunidades de emprego e educação (FRICK and FOSTER, 2003). Os sintomas de queimaduras oculares químicas incluem fotofobia, lacrimejamento e dor, enquanto hiperemia conjuntival, hemorragia subconjuntival e quemose são alguns dos sintomas oculares (MERLE et al., 2008; HARING et al., 2016).

Sinais típicos de uma queimadura grave são mais de 50% de perda do epitélio e da isquemia perilimbal. Esses sinais são geralmente associados a "uma reação inflamatória da primeira câmara, hipertonia ocular e anestesia da córnea", que resulta em um olho branco e indica que não há suprimento de sangue para transportar os glóbulos brancos necessários para combater uma possível infecção (MERLE et al., 2008). Pacientes com queimaduras faciais mais graves, frequentemente apresentam danos aos tecidos periorbitais (isto é, conjuntiva, gordura periorbital, glândulas e pálpebras). A perda de visão pode ocorrer quando a superfície ocular não é tratada em tempo hábil ou com tratamento ineficaz (MORGAN, 1987, WHITE et al., 2015).

Enquanto membrana amniótica, enxertos de pele bucal e tarsorrafias (sutura parcial das pálpebras) estão disponíveis como terapias, por vezes estes tratamentos falham para pacientes com queimaduras oculares mais graves. Em lesões graves, tratamento tópico, como colírio, corticosteróides ou lentes de contato é utilizado em conjunto do transplante de membrana amniótica, transplante de células-tronco límbicas ou transplante de córnea para resolver qualquer cicatriz ou opacidade da córnea (SHARMA et al., 2018).

Atualmente a distribuição de fármaco no olho tem sido limitada a aplicações tópicas. As formulações tópicas são mais convenientes, mas acabam apresentando biodisponibilidade do fármaco inferior a 5% quando aplicado na região anterior do olho. A administração sistêmica de terapias para tratar distúrbios oculares expõe todo o corpo à potencial toxicidade do fármaco (SULTANA et al., 2006). Além disso, algumas barreiras fisiológicas, tal como a produção lacrimal, levam à diluição da formulação e drenagem pelas vias lacrimais, o que resulta em menor tempo de contato do fármaco com a superfície ocular, gerando uma necessidade de formulações que permitam um aumento de contato e liberação controlada do fármaco (KAUR and KANWAR, 2002).

Alguns estudos têm investigado a eficiência de incorporação de compostos bioativos, tanto fármacos sintéticos quanto produtos naturais, em biomateriais. Um exemplo é a gelatina, especialmente em virtude das vantagens relacionadas à liberação controlada do produto incorporado diretamente no tecido danificado, resultando na aceleração do processo de cicatrização (HELARY et al., 2006, GUPTA et al., 2012).

Dentre os vários compostos de origem natural, o ácido úsnico (AU) é conhecido por possuir diversas propriedades biológicas, (FRANCOLINI et al., 2013), também possui atividade cicatricial (NUNES et al., 2011, NUNES et al., 2016), além de anti-inflamatória (VIJAYAKUMAR et al., 2000) e antimicrobiana (DE CARVALHO et al., 2005, GUPTA et al., 2012, MANOJLOVIC et al., 2012, SEGATORE et al., 2012). Estudos recentes demonstram que o desenvolvimento de membranas contendo um sistema ácido úsnico carregado em lipossomas é uma excelente estratégia para superar a baixa solubilidade do composto em água, aumentar a absorção e promover a sua liberação controlada (NUNES et al., 2011).

Estudos prévios confirmaram a incorporação do ácido úsnico em membranas de colágeno através da caracterização físico-química (NUNES, et al., 2010), validaram um método analítico por espectrofotometria UV para a quantificação de ácido úsnico em membranas de colágeno (NUNES et al., 2015), descreveram a ação cicatrizante de membranas de gelatina contendo ácido úsnico através da melhora da resposta inflamatória, epitelização e formação de colágeno após queimaduras dérmica de segundo grau em roedores (NUNES et al., 2011) e investigaram a eficiência de encapsulação, liberação e permeação dessas membranas, bem como sua atividade cicatricial obtida pela melhora da reação de granulação e colagenização de queimaduras dérmicas em suínos (NUNES et al., 2016). Diante do exposto, tornou-se promissor

avaliar o efeito de membranas à base de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas na aceleração da cicatrização de queimaduras da córnea.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estrutura do globo ocular

O bulbo ocular situa-se em uma cavidade óssea (órbita), cuja principal função é a sua proteção. Ele é formado por estruturas que compõem os segmentos anterior e posterior do olho (Figura 1). Em relação ao segmento anterior, ele é constituído pela íris, cristalino, córnea, humor aquoso e esclera, sendo que esta última circunda todo o bulbo do olho. O segmento posterior compreende o corpo vítreo, a retina, coróide, o nervo óptico e também a esclera. Os anexos do bulbo ocular são constituídos pelas pálpebras, pela conjuntiva, pelo sistema lacrimal, além dos cílios e sobrancelhas, que tem como função a proteção do olho (YASUKAWA et al., 2004, SHAH et al., 2010).

A córnea localiza-se no segmento anterior do olho e é constituída por cinco camadas: o epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio (Figura 2), sendo o epitélio e o estroma os principais responsáveis pela considerável impermeabilidade deste tecido (KOCABA et al., 2018). O epitélio externo estratificado não pavimentoso e não queratinizado permite a passagem de moléculas pequenas e lipofílicas. Já o estroma, tecido intermediário e hidrofílico constituído por lamelas de tecido fibroso e por grande quantidade de água, é seletivo à penetração de moléculas lipofílicas que apresentam certa afinidade pela porção aquosa, expressa pelo coeficiente de partição óleo em água. Dessa forma, apenas moléculas de pequena massa molecular e de caráter parcialmente lipofílico conseguem atravessar os três tecidos da córnea (JARVINEN, 1995, SRINIVAS et al., 2018).

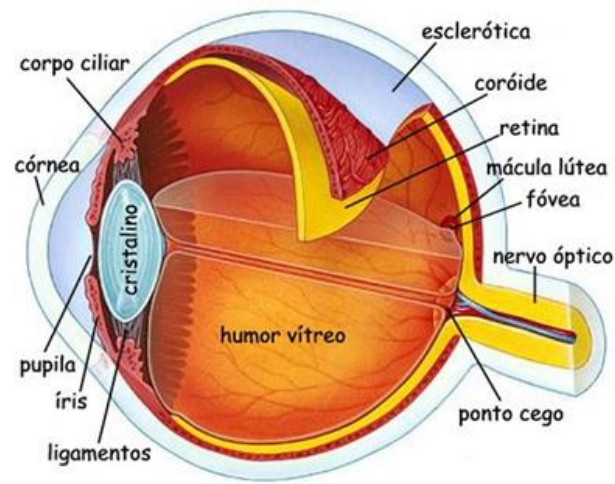


Figura 1: Esquema anatômico do bulbo do olho. Fonte: Disponível em <http://www.anatomiadocorpo.com/visao/olho-humano-globo-ocular/> Acessado em 24/05/2018.

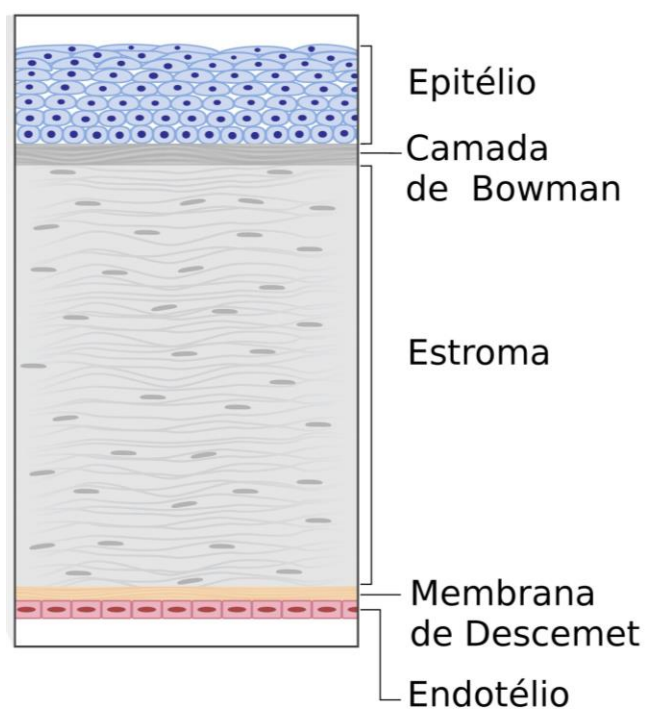


Figura 2: Estrutura da córnea. Fonte: Alila Medical Media / Shutterstock.com

2.2 Queimadura ocular

Aproximadamente 3% das emergências médicas ocorrem devido ao trauma ocular e, as lesões na córnea são responsáveis por uma proporção significativa dessas

apresentações. Lesões na córnea são mais frequentemente causadas por trauma mecânico, mas também podem resultar de queimaduras químicas, térmicas e de radiação. As queimaduras químicas oculares são comuns e consideradas uma emergência oftálmica, podem causar uma série de complicações, desde defeitos no epitélio da córnea até perfuração da mesma e, em alguns casos, cegueira (ESLANI, 2014, MASHIGE, 2016).

Substâncias químicas causam destruição de componentes celulares, desnaturação e degradação de proteínas da córnea e liberação de mediadores inflamatórios. Portanto, um tratamento imediato e intensivo é necessário para restaurar a anatomia e a função visual da superfície ocular sadia (USTAOGLU et al., 2017). A cicatrização de feridas na córnea é que envolve células, matriz, fatores solúveis e enzimas proteolíticas, além de alguns tipos celulares para que haja o reparo da função do tecido danificado. Vários autores têm estudado a aplicação terapêutica de novos fármacos, que podem modular e auxiliar a cicatrização de feridas na córnea após lesão (CHOI, 2013, MENCUCCHI, 2014, USTAOGLU, 2017).

2.3 Cicatrização de queimadura ocular

O epitélio da córnea é um tecido de auto-renovação com nicho de células-tronco que juntos, córnea, esclera e limbo, fornecem suprimento vitalício de células em proliferação para regeneração epitelial. Várias injúrias, seja química, física ou outros agentes patológicos, danificam o epitélio da córnea resultando em rompimento de sua barreira funcional, levando a formação de feridas (WEST et al., 2015).

A cicatrização adequada de feridas é dinâmica, a fim de manter a integridade e saúde da superfície epitelial da córnea para preservar a transparência e a visão da córnea (DI GIROLAMO et al., 2015). A cicatrização de feridas epiteliais da córnea envolve uma série de eventos combinados, que incluem, migração celular, proliferação, adesão e diferenciação com estratificação da camada celular. Isto envolve fator de crescimento/citocina e matriz extracelular objetivando restabelecer a integridade epitelial e restaurar homeostase da córnea (SUN et al., 2012).

Após o trauma do epitélio corneano, a restauração das camadas de células epiteliais é crucial para a manutenção da acuidade visual normal. Estudo experimental sobre o fechamento da ferida epitelial da córnea sugere que o processo inclui duas fases

distintas, uma fase inicial (ou latente) seguida por uma fase de fechamento da ferida. A fase latente é caracterizada por processos de reorganização celular desencadeados por ferimentos, incluindo descamação, perda da aparência colunar das camadas basais das células e quebra dos hemidesmossomas na membrana basal. Durante esta fase, pouco ou nenhum fechamento da ferida é observado. No início da fase de encerramento, o bordo de ataque do epitélio transformado é composto por uma única camada de células (AMBROSONE et al., 2014).

O fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento dos queratinócitos, fator endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) são alguns dos fatores de crescimento conhecidos por estimular a cicatrização de feridas na córnea. Demonstrou-se que estes fatores promovem a migração de células epiteliais da córnea e o fechamento de feridas *in vivo* (DUA et al., 1994, AMBROSONE et al., 2014).

2.4 Epidemiologia das lesões oculares

A lesão ocular é comum e, quando grave, pode levar à cegueira da córnea. Usando dados de codificação de descarga de emergência, foi estimado recentemente que nos EUA a taxa de incidência de lesão ocular química é de 51,1 novos casos por milhão de pessoas por ano. Se essa taxa for expandida para a população mundial, isso representaria mais de 350.000 novos casos de lesões oculares químicas todos os anos (WHITE et al., 2015).

Lesões químicas oculares são comuns em laboratórios químicos industriais, fábricas de máquinas, na agricultura e entre operários e trabalhadores da construção civil. São também frequentemente relatados em fábricas de tecidos, instalações de reparo automotivo e equipes de limpeza e higienização. Importaneamente ocorrem mais frequentemente na faixa etária de 20 a 40 anos, em homens jovens em maior risco (KUCKELKORN et al., 1993, SINGH et al., 2013). Desta forma, usando as taxas de incidência nos EUA para aproximar a carga global de lesão ocular química subestima o número de novos casos, dada a maior frequência de lesões oculares químicas em países menos desenvolvidos economicamente (PECK, 2012).

Uma recente revisão sistemática e meta-análise de estudos populacionais sobre cegueira, indicaram que 36 milhões de pessoas em todo o mundo são cegas

bilateralmente por todas as causas, com outros 216,6 milhões com perda visual moderada a grave (BOURNE et al., 2017). Estima-se que as causas resultantes de lesões na córnea representem cerca de 4% das pessoas com cegueira bilateral (PASCOLINI and MARIOTTI, 2012).

Considera-se que 23-38% dos pacientes afetados por lesão ocular química tem envolvimento bilateral (KUCKELKORN et al., 1993, HONG et al., 2010). Portanto, pode haver pessoas com lesão química ocular bilateral com redução da visão suficiente para afetar as atividades da vida diária. As mesmas são muitas vezes acompanhadas de dano ocular, face e pescoço. Tais ferimentos criam dificuldades significativas na restauração da visão. (HEILBRONN et al., 2015).

Desta maneira, a agressão química, em particular, é um exemplo consideravelmente grave de lesão ocular mais comumente direcionado para o rosto e os olhos, é mais prevalente em países em desenvolvimento econômico (PECK, 2012) e tem uma incidência crescente em todo o mundo (MILTON et al., 2010). Independentemente da causa, as queimaduras oculares químicas têm um impacto significativo na qualidade de vida relacionada à visão (LE et al., 2011), criando assim, despesas para os sistemas de saúde (HARING et al., 2016).

2.5 Fisiopatologia das lesões oculares

As lesões químicas no olho podem produzir dano extensivo à superfície ocular podendo levar a deficiência visual. Queimaduras alcalinas da córnea são mais comuns e graves que queimaduras ácidas. Geralmente, os agentes da queimadura alcalina penetram mais rapidamente nos tecidos e no compartimento interno do olho. Esses agentes irão degradar os ácidos graxos, proteoglicanos e feixes de colágeno que compõem a membrana, podendo levar à cegueira (MEAD MD, 1994, FISH and DAVIDSON, 2010).

Considerando-se a gravidade da lesão, as queimaduras alcalinas da córnea são classificadas em quatro grupos. Entre elas encontram-se a córneas alcalinas que raramente curam corretamente, mostrando redução da transparência da córnea (córnea obscura) e opacidade (IGARASHI et al., 2015). De fato, a cegueira da córnea é uma situação fibrótica em que resulta na perda de transparência corneana. “Neblina da

córnea” é caracterizada por aparência turva da córnea que irá perturbar ou obstruir a visão do paciente (SINGH et al., 2013, KANE C, 2014).

Estudos vêm demonstrando o aumento da expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias, como a IL1- β e TNF- α já nas primeiras 24 horas após a indução da lesão química por álcali na córnea (CADE, et al., 2014). Tais citocinas desempenham papel importante no processo de apoptose celular e posteriores danos à córnea. Além disso, fatores de crescimento como o fator de crescimento transformador (TGF- β) tornam-se de extrema importância no processo de reparo tecidual (RENEKER et al., 2010).

Na lesão por queimadura alcalina da córnea, o TGF- β será regulado positivamente nos tecidos, além de viabilizar a indução da expressão de outras citocinas, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O VEGF é uma proteína marcadora específica de células endoteliais vasculares, que está envolvida na regulação da angiogênese dos vasos capilares (SHAO, et al., 2016). O VEGF pode induzir proliferação, resposta a quimiocinas e permeabilidade de células endoteliais vasculares e participa na formação de novos vasos sanguíneos (IGARASHI et al., 2015).

2.6 Limitações na administração oftálmica de fármacos

As características anatômicas e fisiológicas do bulbo do olho são fatores limitantes ao tratamento farmacológico de doenças oculares. A administração de uma formulação pela via ocular tópica, por meio de colírios, é a mais utilizada em oftalmologia. Essa via apresenta maior facilidade de aplicação e comodidade para o paciente, entretanto, muitas vezes são ineficazes em razão de sua baixa biodisponibilidade local devido a fatores biológicos que protegem o olho limitando a permeação/absorção de fármacos. Tais fatores incluem a impermeabilidade relativa do epitélio corneano, a drenagem nasolacrimal e as características físico-químicas implícitas ao fármaco (FIALHO, 2007, ELJARRAT-BINSTOCK, 2010).

Os mecanismos de renovação do humor aquoso e a existência de vasos sanguíneos são os principais responsáveis pela eliminação precoce dos fármacos, impossibilitando a obtenção de uma dose terapêutica efetiva. Os fármacos são eliminados da câmara anterior pela reciclagem do humor aquoso e pela presença de circulação sanguínea na porção da úvea anterior. Aqueles presentes no humor vítreo são

eliminados pela câmara anterior, pela barreira hematorretiniana e pela própria circulação sanguínea (KOMPELLA et al., 2013).

2.7 Sistemas de liberação de fármacos

A utilização de formas farmacêuticas como sistemas de liberação, requerem administrações menos frequentes se comparadas às convencionais, aumentando a adesão do paciente ao tratamento. Os materiais poliméricos desempenham um papel importante na taxa de liberação e os do tipo biodegradáveis têm sido extensamente investigados para aplicação em sistemas de liberação controlada destinados à via ocular (DA SILVA et al., 2015, FERREIRA et al., 2017, MAIA et al., 2017, CUNHA et al., 2018, DIAS et al., 2018).

Esses materiais podem promover um aumento da biodisponibilidade e uma redução de efeitos adversos, desde que a biocompatibilidade do polímero no olho, que é um importante fator para a aplicação clínica, seja avaliada (FIALHO, 2003). Os polímeros devem ser quimicamente inertes, não-carcinogênicos, hipoalergênicos e não-causadores de resposta inflamatória no local de aplicação (MAHALING and KATTI, 2016).

Devido à complexidade da cicatrização de feridas na córnea vários estudos têm investigado a aplicação de novos fármacos, com sistemas de liberação que requerem administrações menos frequentes, afim de modular e auxiliar a cicatrização de feridas na córnea (CHOI, 2013, MENCUCCHI, 2014, USTAOGU, 2017). Neste sentido, a utilização de membranas de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas torna-se uma excelente opção para a aceleração da cicatrização de queimaduras da córnea.

2.8 Ácido único

O ácido úsnico (Figura 3) é um composto derivado do metabolismo secundário líquênico (associação entre fungos e algas) e desempenha importante papel biológico, conferindo aos líquens proteção contra microrganismos invasores e ressecamento (COCCHIETTO et al., 2002).

É um dos mais conhecidos e estudados compostos liquênicos. Além disso, possui comprovado efeito cicatrizante (NUNES et al., 2011), antimicrobiano (SEGATORE et al., 2012) e antibiótico (HONDA et al., 2010), anti-inflamatória, analgésica (HUANG et al., 2011), antimicrobiana (WECKESSER et al., 2007), gastroprotetora, antioxidante (RABELO et al., 2012) e anticancerígena (EINARSDÓTTIR et al., 2010).

Apesar de grande variedade de atividades biológicas do AU, sua utilização como agente terapêutico ainda é limitada devido às suas propriedades, como baixa solubilidade e alta toxicidade (KRISTMUNDSDÓTTIR et al., 2005; DA SILVA SANTOS et al., 2006). As questões relacionadas à administração do ácido úsnico podem ser superadas através de um sistema de liberação controlada afim de possibilitar a redução da sua toxicidade e aumentar sua eficácia terapêutica (ARAÚJO et al., 2015).

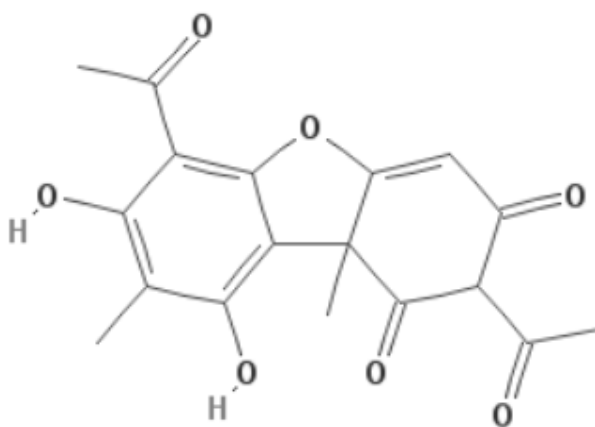


Figura 3: Estrutura química do ácido úsnico (C 18 H 16 O 7). Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5646#section=2D-Structure>>.

2.9 Membrana de gelatina contendo ácido úsnico

A membrana à base de gelatina possui diversas propriedades interessantes entre elas mecânica, permeabilidade, absorção de luz, transparência, atividade antimicrobiana e antioxidante. Essas propriedades podem ser modificadas pela adição de substâncias ativas a esse biomaterial. Assim como o colágeno e outros polímeros naturais (quitosana, alginato) a gelatina apresenta arquitetura celular que atua como ancoragem mecânico (“scarfolds”) para construção de novos tecidos, assim como possibilita a incorporação de substâncias ativas em sua estrutura protéica (FORTI et al., 2006, VERHAEGEN et al., 2009). O colágeno hidrolisado (gelatina) permite incorporar fármacos para liberação controlada (LOSS et al., 2000, NICOLOSI, 2005). Além disso,

as matrizes de colágeno estimulam a proliferação de miofibroblastos sendo este um dos fatores primordiais para o reparo tecidual (HELARY et al., 2006).

Pôde-se observar em estudo de Nunes, 2013, que a aplicação tópica de membrana de gelatina contendo ácido úsnico modulou eventos importantes do processo cicatricial em modelo suíno, como a redução da intensidade da fase inflamatória da cicatrização e consequente antecipação das fases subsequentes. Além de estimular o desenvolvimento e a maturação da reação de granulação e incremento substancial da deposição de colágeno.

Em outro trabalho, de Melo Costa, 2016, observou que com a utilização da membrana de gelatina contendo ácido úsnico, em queimadura de segundo grau em humanos, houve uma maior degradação de fibrina, com deposição de tecido de granulação, aumento da pigmentação, acelerando a re-epitelização das bordas para o centro da ferida nesses pacientes.

2.10 Avaliação da neovascularização na membrana corioalantóica (MCA) de embrião de galinha

O ensaio da membrana corioalantóica de embrião de galinha, do inglês “CAM assay”, foi adaptado por Folkman em 1974 para o estudo da angiogênese tumoral, assim como para o teste de substâncias pró e antiangiogênicas (DIMITRIPULOU, 1998, NORRBY, 2006). Atualmente, esse modelo também é utilizado para a avaliação de sistemas de liberação de fármacos, biomateriais, implantes e reconstituição de tecidos (RIBATTI et al., 2001, VARGAS et al., 2007, RIBATTI, 2010).

Três membranas extraembrionárias são formadas durante o desenvolvimento: a membrana do saco vitelino, o âmnio e a membrana corioalantóica (MCA). A MCA é uma membrana transparente altamente vascularizada formada pela fusão das camadas mesodérmicas do córion e da alantóide durante o quarto e quinto dia do desenvolvimento embrionário (VALDES et al., 2002, RIBATTI, 2010). Essa membrana altamente vascularizada está ligada à circulação embrionária pelas artérias e veias alantóicas, sendo responsável pela troca gasosa do embrião com o ambiente externo através da casca porosa até o 19º dia de incubação (RIBATTI et al., 2001), além de desempenhar um papel no armazenamento de excreções, transporte de eletrólitos e

mobilização do cálcio da casca para iniciar a mineralização óssea (DIMITRIPULOU, 1998, VARGAS et al., 2007).

Até o 10º dia de incubação, a MCA é constituída de células relativamente imaturas e indiferenciadas e com alto potencial mitótico. A angiogênese da MCA passa por três fases de desenvolvimento: a fase inicial (5º ao 7º dia) tem como principal mecanismo de crescimento da rede capilar a germinação; na fase intermediária (8º ao 12º dia) o crescimento da rede microvascular prevalece; na fase final (12º ao 13º dia) a angiogênese endógena e a expansão da MCA se completam sob toda a membrana da casca (NORRBY, 2006).

Entre o 5º e o 12º dia de incubação, pode ser avaliada a estimulação ou a supressão experimentalmente induzida da angiogênese embrionária endógena, que é governada por uma série de fatores de crescimento. A aplicação de uma substância antiangiogênica na MCA entre o 5º e o 10º dia promove uma fácil observação da supressão da angiogênese embrionária em curso. A angiogênese por um fator pró-angiogênico externo que supera os fatores anti-angiogênicos intrínsecos só pode ser realizada a partir do 12º dia, já que a resposta vasoproliferativa não específica é maior quando o sistema imunológico do embrião está mais desenvolvido (NORRBY, 2006) (Figura 4).

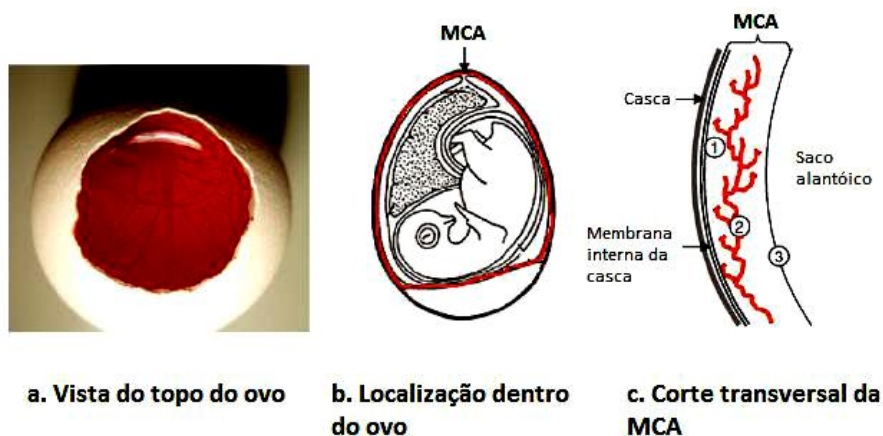


Figura 4 - Membrana corioalantóica (MCA) do embrião de galinha. A) Imagem da MCA de um embrião de 10 dias; B) Localização da MCA (em vermelho) ao redor do embrião de 12 dias e em contato direto com a casca do ovo; C) Ilustração do corte transversal da MCA no 10º-12º dia de incubação: 1. epitélio coriônico; 2. mesoderma com vasos sanguíneos em vermelho; 3. epitélio alantóico. Adaptado de (Vargas et al., 2007).

Existem diversos artefatos que tornam difícil a validação do ensaio de angiogênese da MCA. Qualquer material irritante, como a poeira gerada durante a abertura da casca pode gerar uma reação angiogênica mediada por uma inflamação. A MCA também é extremamente sensível a alterações na tensão de oxigênio, o que faz a vedação da abertura da casca ser crítica. É recomendável esperar 48 horas após a abertura da casca do ovo para adicionar a substância de teste a fim de verificar a presença de qualquer resposta inflamatória. Fármacos que necessitam de ativação metabólica não podem ser avaliados por esse método (STATON et al., 2004, NORRBY, 2006).

As formas pelas quais a MCA responde aos materiais aplicados na sua superfície são importantes para avaliar os sistemas de liberação de fármacos aplicados topicamente. Valdes e colaboradores constataram que tanto a resposta inflamatória aguda quanto a crônica da MCA a biomateriais são semelhantes às respostas encontradas em mamíferos (VALDES et al., 2002).

Os embriões de galinha podem ser utilizados para avaliar a atividade e a toxicidade de fármacos na MCA (presença de inflamação ou neovascularização) e no desenvolvimento anatômico do embrião, assim como a influência da via de administração do fármaco. A análise do sangue, a utilização de biossensores e de angiografias da MCA podem ser utilizados para determinar parâmetros farmacocinéticos, e a biocompatibilidade de sistemas de liberação de fármacos pode ser acessada após a sua aplicação tópica na MCA (VARGAS et al., 2007). O Quadro 1 resume as vantagens e as desvantagens do uso de embriões de galinha.

Tabela 1: Vantagens e desvantagens do uso de embriões de galinha para avaliação de fármacos e sistemas de liberação de fármacos

VANTAGENS	DESVANTAGENS
– Barato e rápido – Modelo <i>in vivo</i> – Aspectos legais – Rápida triagem de formulações – Avaliação de toxicidade, biocompatibilidade e atividade de fármacos – Fácil observação das respostas – Diferentes vias de administração – Crescimento espontâneo de vasos – Resposta tecidual da MCA é semelhante à resposta dos mamíferos – Várias amostras podem ser testadas na mesma MCA – Rápida detecção de efeitos adversos	– Dificuldade na extrapolação para modelos de mamíferos – Dificuldade na escolha de protocolos – Alto índice de contaminações – Rápida mudança da MCA durante o desenvolvimento – Via oral não pode ser testada

Fonte: Adaptado de Vargas et al 2007

Para a avaliação da atividade antiangiogênica a via de administração mais comumente utilizada é a tópica, sendo as substâncias em estudo geralmente adsorvidas em suportes de colágeno, celulose ou poliestireno (SEIDLITZ et al., 2004, VARGAS et al., 2007). A Figura 5 mostra os diferentes parâmetros dos sistemas de liberação de fármacos que podem ser avaliados nos embriões de galinha.

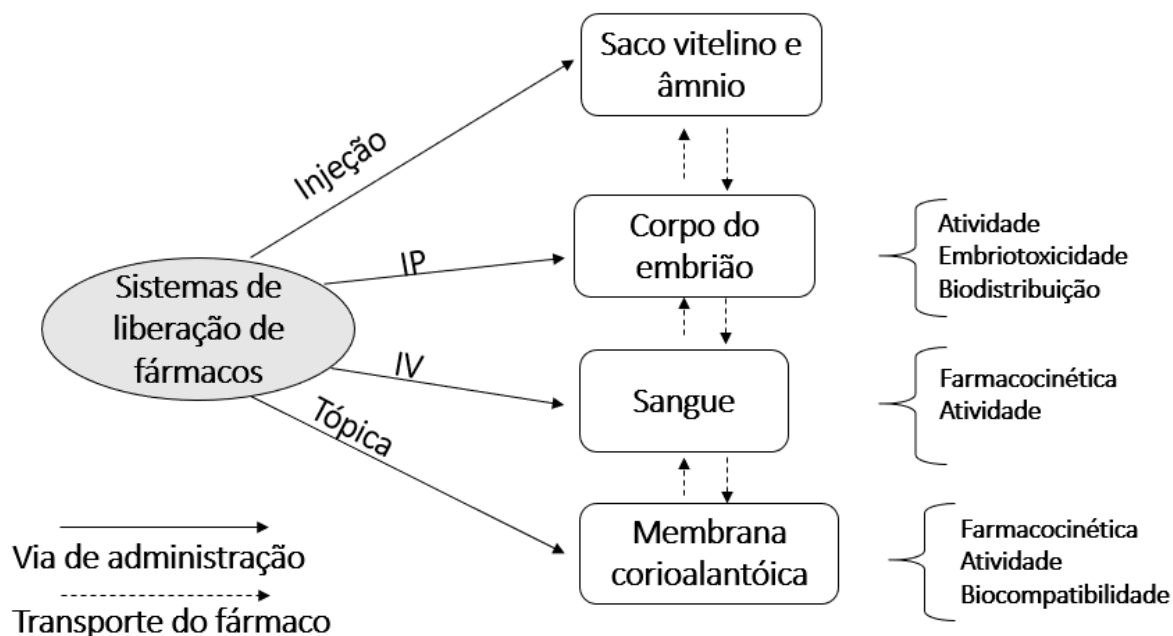


Figura 5 - Uso dos embriões de galinha para a avaliação de sistemas de liberação de fármacos. Adaptado de (Vargas et al., 2007).

Apesar de embriões de galinha não serem ainda amplamente utilizados para a avaliação de novos sistemas de liberação de fármacos, a *Food and Drug Administration* orienta que o modelo da membrana corioalantóica seja utilizado como uma alternativa a modelos de mamíferos para testes pré-clínicos durante o desenvolvimento de produtos para o tratamento de úlceras cutâneas crônicas e queimaduras (VARGAS et al., 2007). A Tabela 2 apresenta formulações que já foram avaliadas por meio do ensaio da MCA.

Tabela 2 – Sistemas de liberação de fármacos e formulações avaliadas por meio do ensaio da MCA

Sistemas de liberação de fármacos	Fármaco	Tipo de fármaco	Via de administração	Parâmetro avaliado
Micropartículas	Paclitaxel	Antigiotênico	Tópica	Eficácia
Implantes	Calcitrol	Hormônio	Tópica	Eficácia
Implantes	-	-	Tópica	Biocompatibilidade
Soluções	Hipericina	Fotossensibilizador	Tópica	Absorção e eficácia
Microemulsões	-	-	Tópica	Biocompatibilidade
Lipossomas	Doxorrubicina	Antigiotênico	Tópica	Eficácia
Gel	Amilorida	Antigiotênico	Tópica	Eficácia

Fonte: Adaptado de Vargas et al., 2007

2.11 Modelo de queimadura alcalina corneana em coelho

Há muito tempo coelhos são utilizados em pesquisas experimentais para queimadura ocular. A raça mais utilizada é a *New Zealand* (ZHANG et al., 2017, GORE et al., 2018, GRIFFITH et al., 2018). Apesar das diferenças significantes entre os olhos dos coelhos e dos humanos, os coelhos são utilizados para modelos experimentais de queimadura de córnea por terem olhos grandes, proeminente, que às vezes, se projeta da órbita por uma extensão de 5 milímetros além do arco zigomático e 12 milímetros além do arco frontal, além de serem fáceis de manejar e economicamente acessíveis (OYDANICH et al., 2018).

Existem vários modelos de queimadura química alcalina. Os agentes lesivos de queimaduras mais comumente utilizados são hidróxido de sódio (NaOH) e Etanol absoluto variando entre as metodologias quanto à forma de contato do agente com a córnea (seja por papel filme embebido com a solução lesiva, ou contato direto com a solução), das suas concentrações e o tempo de exposição ao agente, irá depender do objetivo de cada estudo (LIN et al., 2013, MENCUCCI et al., 2014, OH et al., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito terapêutico das membranas de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas na cicatrização de queimadura de córnea.

3.2 Específicos

- Avaliar se a membrana de gelatina contendo ácido úsnico promove alteração na vascularização;
- Investigar a toxicidade e biocompatibilidade da membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas;
- Investigar o potencial irritativo ocular da membrana quando adaptada aos olhos de coelhas;
- Avaliar a presença de morte celular tecidual corneana após tratamento com a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas após indução de lesão química alcalina;
- Avaliar se a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas promove cicatrização corneana após indução de lesão química alcalina;
- Investigar o perfil histológico da córnea de coelhas tratadas com a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo das membranas de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas

As membranas de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas foram preparadas através do desenvolvimento de duas soluções. A primeira delas, trata-se da solução de gelatina em pó (fornecedor NP produtos alimentícios LTDA) contendo ácido acético e plastificante (propilenoglicol e glicerol), agitada mecanicamente durante 24 horas. A segunda refere-se à preparação de uma solução lipídica (fosfatidilcolina - Lipoid GMBH 75%) contendo AU (pureza $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich®) e um solvente orgânico (clorofórmio). Esta última, após solubilização dos componentes, passou por um processo de evaporação do solvente utilizando evaporador rotativo, formando um filme seco no balão volumétrico. Este foi então ressuspenso em água destilada e a solução foi formada após agitação mecânica, a qual passou pelo ultrassom. As duas soluções foram em seguida homogeneizadas durante 24 horas utilizando agitação magnética, e finalmente, por 30 minutos ficam no ultrassom. Esta mistura foi vertida em placas de petri de 14 cm de diâmetro e armazenadas em capela com exaustão para a secagem à temperatura ambiente. Após evaporação da água foi formada uma membrana seca na placa, que foi cortada em círculos de pequeno diâmetro (0,5 cm com $4,92 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de AU) para utilização nos olhos dos animais. A membrana foi previamente caracterizada por Nunes, 2010 e Lima, 2017.

4.2 Avaliação da atividade biológica da membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas por meio do ensaio da MCA

A análise da atividade biológica da membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas foi realizada por meio do ensaio da MCA com a metodologia adaptada de Nowak-Sliwinska (NOWAK-SLIWINSKA, 2010), com algumas modificações, foi utilizado neste estudo. Ovos de galinha da espécie *Gallus domesticus* e da linhagem Ross, fertilizados e adquiridos através de vendedor local no município de Itabaiana-SE (n = 12), foram mantidos em uma incubadora para ovos fertilizados de galinha mantida a 37°C e 60% de umidade e rotação constante, utilizando uma incubadora automática digital Premium Ecológica®. Três dias após a fertilização foi

feita uma abertura circular de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro na região da câmara de ar da casca dos ovos, descartando-se os ovos inviáveis, ou seja, àqueles não embrionados ($n= 1$). Retirou-se a membrana interna da casca para a exposição da MCA e selou-se os ovos com fita adesiva transparente. Com auxílio de um suporte de papelão, os ovos foram acondicionados verticalmente na incubadora, onde permaneceram até o 5º dia de desenvolvimento, sem rotação programada.

Cinco e seis dias após a fertilização, as membranas de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas ($4,92 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) e as membranas de gelatina sem ácido úsnico (controle negativo) foram aplicadas sobre a superfície da MCA. Como controle positivo, foram aplicados 50 μL de solução de bevacizumabe (Avastin®, 0,5 mg / mL) sobre a superfície da MCA. O grupo controle negativo foi fixado em 100% para o cálculo das alterações da área capilar.

No 7º dia de incubação, realizou-se a extração das MCAs após prévia fixação com solução de formaldeído a 10% por 10 minutos, que foram posteriormente fotografadas com uma câmera digital acoplada a um microscópio (Olympus®, modelo BX43). As imagens obtidas foram analisadas com o auxílio do programa ImageJ versão 1.49p para a quantificação dos vasos sanguíneos. Os equipamentos utilizados na incubação dos ovos estão ilustradas na Figura 6.



Figura 6 – Equipamento utilizado para a incubação dos ovos. A) Incubadora automática; B) Posição vertical dos ovos na incubadora.

O bevacizumabe foi utilizado com o intuito de se validar o experimento de neovascularização, visto que possui atividade antiangiogênica comprovada, sendo

utilizado na prática clínica para o tratamento de câncer e de doenças oculares causadoras de neovascularização por meio de injeções intravítreas. Além disso, foi realizada a comparação da resposta obtida no tratamento com o AU e o bevacizumabe com a membrana sem ácido úsnico.

4.3 Avaliação quantitativa dos vasos nas imagens obtidas da MCA

Após ensaio da MCA foi realizado avaliação do efeito da membrana de gelatina contendo ácido úsnico carreado em lipossoma sobre a neovascularização através do software ImageJ[®] versão 1.49p. As MCAs foram observadas ao microscópio (Olympus[®], modelo BX43). Com um aumento padronizado de 4X.



Figura 7 – Obtenção das imagens da MCA.

A fim de padronizar a área a ser analisada de cada imagem pelo programa ImageJ versão 1.49p, foram quantificados os vasos presentes na região relativa aos discos de papel filtro com 1mm de diâmetro. Assim, inicialmente a área do disco foi selecionada e todo o restante foi apagado. Posteriormente, o plugin Color Threshold preto e branco e Color Space HSB foi utilizado para transformar a imagem em preto e branco e assim selecionar apenas os tons vermelhos da imagem (relativos aos vasos sanguíneos) conforme figura 8, não sendo padronizado o Threshold de cada avaliação, afim de manter a imagem dos vasos semelhantes a imagem original (figura 8C). As áreas brancas representam o que foi descartado (sem coloração vermelha). Após o tratamento das imagens, a quantificação foi realizada utilizando-se o *plugin Analyze Particles*, sendo a área referente aos vasos obtida em pixels, afim de obter um valor

bruto, para em seguida realizar a quantificação em porcentagem onde um grupo controle foi estipulado em 100%. Os resultados foram expressos como percentual referente ao número de vasos $\pm$ desvio padrão.

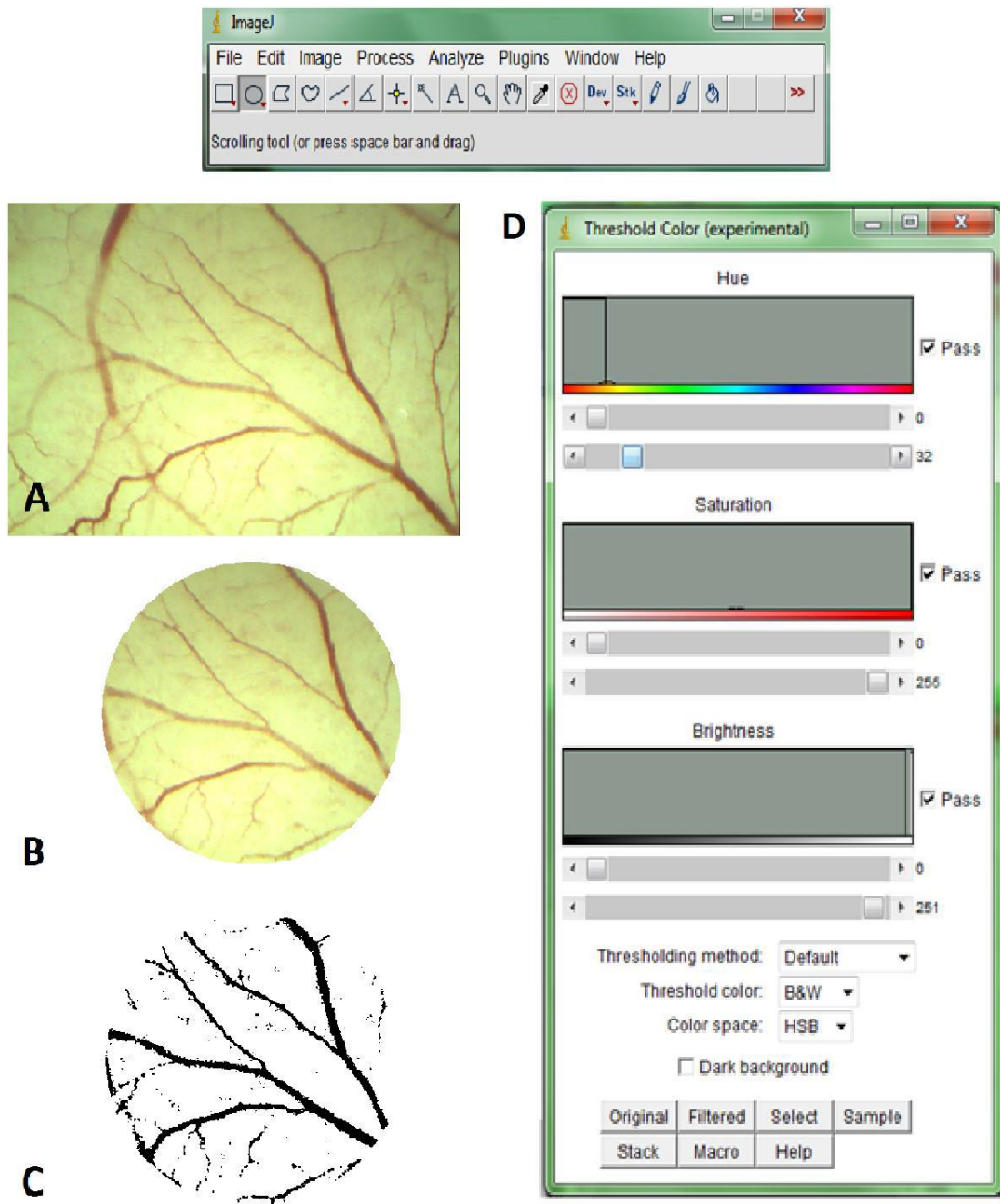


Figura 8 – Tratamento das imagens obtidas das MCAs. A) Imagem de uma MCA de um embrião de 7 dias; B) Imagem após a seleção da área referente ao disco do papel filtro; C) Imagem em preto e branco após o tratamento com a ferramenta Color Threshold; D) Plugin Color Threshold utilizado para selecionar os tons de vermelho da imagem, referentes aos vasos sanguíneos da MCA.

4.4 Teste de biocompatibilidade e tolerância ocular (HET-CAM)

A tolerabilidade ocular da membrana de gelatina foi avaliada pelo Teste de Ovos de Galinha - Teste de Membrana Corioalantóica (HET-CAM) descrito por Nobrega (1996). Dez ovos de galinha fertilizados para cada formulação foram selecionados. Os ovos foram incubados em uma unidade de rotação automática (Premium Ecológica, Brasil) a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ e $60 \pm 1\%$ de umidade relativa, por 10 dias. No dia 10, a casca do ovo foi perfurada no lado da câmara de ar e a membrana interna do ovo cuidadosamente removida para evitar qualquer dano aos vasos sanguíneos finos da membrana corioalantóide (MCA). Neste momento, as membranas de gelatina contendo ácido úsnico $4,92 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, medindo 0,5 cm de diâmetro foram aplicadas sobre a superfície da MCA. Como um controle negativo, membranas de gelatina sem ácido úsnico foram aplicadas sobre a superfície da MCA. Como controle positivo, 50 μL de NaOH 0,1 mol/L também foram aplicados. Após um contato de 5 min, a membrana foi lavada com solução de PBS (pH 7,4). As MCAs foram observadas ao estereomicroscópio Motic com câmera Motic Cam acoplada e as imagens obtidas pelo software Motic Images Plus 2.0, com um aumento padronizado de 20X. Em seguida, os vasos sanguíneos e o sistema capilar foram examinados de forma qualitativa pelo avaliador quanto a efeitos irritantes no pós-tratamento, incluindo hiperemia, hemorragia e coagulação, em vários intervalos (0, 0,5, 2 e 5 min). Um escore numérico foi então alocado para cada medição, e a soma dos escores medidos em cada intervalo para cada uma das três respostas (hiperemia, hemorragia e coagulação) foi computada. A média das pontuações individuais para todos os pontos finais de ensaios de 10 replicatas produziu um valor numérico que indica o potencial de irritação para a formulação. A intensidade das reações foi avaliada semi-quantitativamente pelo avaliador, em uma escala de 0 (sem reação) a 3 (reação forte). O índice de irritação ocular (OII) foi então calculado pela seguinte expressão:

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

onde 'h' é o intervalo de tempo (em segundos) avaliado no início da hemorragia, 'l' de lise e 'c' de coagulação. Utilizou-se a seguinte classificação: $\text{OII} \leq 0,9$: não irritante ou

levemente irritante; $0,9 > \text{OII} \leq 4,9$: moderadamente irritante; $4,9 > \text{OII} \leq 8,9$: irritante; $8,9 > \text{OII} \leq 21$: severamente irritante.

Após avaliação da tolerabilidade ocular, as amostras da MCA foram fixadas em formol a 10%, desidratadas, embebidas em parafina, cortadas a 4 μm de espessura e coradas com hematoxilina-eosina para avaliação histopatológica padrão. A análise histológica foi realizada utilizando um microscópio óptico (Leica Microsystems, Alemanha).

4.5 Aspectos éticos

Coelhas brancas *New Zeland*, com idade média de 3 meses e aproximadamente 2 kg, foram mantidos no biotério da Universidade Federal de Minas Gerais (local da realização do estudo) e utilizados no experimento de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo CEUA – Comissão de Ética no uso de animais para experimentação, . Os experimentos realizados com estes animais foram aprovados por para fins de pesquisa científica (ou ensino) - de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (ANEXO I).

4.6 Teste de irritabilidade ocular “Draize test”

A irritação ocular promovida pela membrana nos coelhos foi avaliada duas semanas antes do procedimento de queimadura química corneana, utilizando-se treze coelhas da raça *New Zealand*, com peso entre 2 e 3 Kg e com idade média de 3 meses de acordo com metodologia descrita por KWIATKOWSKI, 1985, com pequenas modificações. As avaliações foram realizadas 1h, 24h, 48h, 72h e 7 dias após a aplicação da membrana de gelatina contendo ácido úsnico. A pontuação total foi resultado da soma de todas as pontuações obtidas para córnea, íris e conjuntiva através de uma pontuação numérica média para cada grupo. Para tal avaliação foi definido pelo

avaliador como não irritante os escores de opacidade corneana, escore de irritação ou escore de vermelhidão conjuntival iguais a zero.

4.7 Indução de lesão química em córnea de coelho

Os coelhos foram utilizados como modelo neste projeto por possuírem globo ocular de tamanho próximo ao dos seres humanos e por terem sistema ocular com fisiologia semelhante à humana. Após duas semanas do teste de Draize, os coelhos utilizados foram submetidos à lesão química. Os grupos do estudo foram: grupo com lesão química tratado com membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas e grupo com lesão química tratado com membrana de gelatina sem ácido úsnico.

Com o objetivo de aliviar a dor sem perda da consciência, reduzindo também o desconforto e o estresse a que os animais foram submetidos, foi utilizado o analgésico Cloridrato de proximetacaína 0,5% (colírio) 1 gota a cada 3 horas (anestésias prolongadas de 5 a 7 doses). Para esse procedimento, o animal foi contido fisicamente com auxílio das mãos para evitar traumas a ele e ao operador. Todos os procedimentos de remoção epitelial foram realizados nos olhos direitos dos animais experimentais. As membranas de gelatina (contendo ou não ácido úsnico carregado em lipossomas), foram posicionadas no olho dos animais na região do saco conjuntival e em seguida, acompanhados e monitorados por 72 horas após o procedimento de lesão da córnea.

O método para lesão química descrito anteriormente (MENCUCCI, 2014) com algumas modificações foi utilizado neste trabalho (ANEXO II). Todos os procedimentos foram realizados com animais sob anestesia geral, induzida por injeção intramuscular de 50 mg/kg de cloridrato de cetamina (Dopalen[®], Brasil) e 15 mg/kg de cloridrato de xilazina (Anasedan[®], Brasil). Após anestesia da superfície ocular por instilação tópica de proximetacaina (Anestalcon[®], Brasil), uma lâmina Trephine de 9,0 mm (Katena, Denville, NJ) foi colocada manual e firmemente sob a superfície da córnea com uma leve pressão, 100 µL de etanol absoluto colocado e deixado no local por 30 segundos e posteriormente o excesso foi absorvido com algodão. Em seguida, o olho foi irrigado completamente com PBS estéril para remover todos os resíduos químicos. Para finalizar o procedimento, realizou-se desepitelização da córnea com o auxílio de um

bisturi previamente estéril. Todos os procedimentos de remoção epitelial foram realizados somente no olho direito de animais experimentais. Os tratamentos com a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas ou sem ácido úsnico foram iniciados imediatamente após a indução da lesão e foram repetidos a cada 24 horas durante 72 horas.

4.8 Avaliação da cicatrização da queimadura da córnea pelo marcador Fluoresceína

Afim de demarcar a área lesada, 1 (uma) gota de colírio fluoresceína (Fluoresceína Sódica 1,0%, Allergan[®], EUA) foi instilada no olho a ser avaliado. Na presença de lesões epiteliais, ela penetra o estroma hidrofílico, evidenciado pela coloração verde brilhante da fluoresceína. Posteriormente os animais foram expostos à luz de cobalto. As fotografias foram obtidas através do microscópio lâmpada de fenda (Apramed HS5, Brasil) usando uma câmera digital Canon EOS Rebel T5, (Canon, Inc., Tóquio, Japão) (ANEXO III). A área de abrasão da córnea foi medida manualmente no ImageJ (Versão 1.49p; National Institutes of Health, EUA) e plotada no programa Grap Pad Prism versão 5.0. Por se tratar de um corante hidrossolúvel, a fluoresceína não cora a córnea normal, uma vez que essa substância não ultrapassa o epitélio corneano hidrofóbico.

4.9 Avaliação da presença de células mortas na córnea pelo marcador Rosa Bengala

Com a finalidade de identificar células mortas na córnea, 1 (uma) gota de colírio Rosa Bengala (1,0%, Pharmedice) foi instilada no olho a ser avaliado dos 6 animais (3 de cada grupo), após anestesia tópica (Cloridrato de tetracaína 1%, cloridrato de fenilefrina 0,1%, Allergan[®]) e, após 1 minuto, foram expostos à luz branca. As fotografias foram obtidas através do microscópio lâmpada de fenda (Apramed HS5, Brasil) usando uma câmera digital Canon EOS Rebel T5, (Canon, Inc., Tóquio, Japão). A área de abrasão da córnea foi medida manualmente no ImageJ (Versão 1.49p; National Institutes of Health, EUA) e plotada no programa Grap Pad Prism versão 5.0. O corante rosa bengala é similar à fluoresceína e liga-se à células epiteliais desvitalizadas e necróticas, além de muco.

4.10 Avaliação histológica do epitélio corneano

Amostras de córnea foram obtidas e fixadas em solução de Dawidson (duas partes de 10% de formalina tamponada com fosfato neutro, três partes de etanol a 95%, uma parte de ácido acético glacial e três partes de água ultrapura) por 24 horas, então o tecido corneano foi colocado em etanol a 70% por 12 horas e embebido em parafina, cortado a 4 μ m e corado com hematoxilina-eosina afim de demarcar células em tom rosa e roxo, além de tricômico de gomori para avaliação de fibras de colágeno (ANEXO IV). A avaliação histológica foi realizada através do uso de microscópio óptico (Zeiss®, modelo Axio Imager M2). As imagens foram obtidas em aumento de 5x e 20x.

4.11 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando-se o programa Graph Pad Prism™ versão 5.0, através do teste Anova de duas vias, com pós-teste de Bonferroni para a avaliação de cicatrização e do número de células mortas da córnea e Anova de uma via para avaliação do ensaio na MCA. O n amostral é indicado nas legendas das respectivas figuras. * indicam diferença significativa quando comparado ao controle para valores de $p < 0.05$, com intervalo de confiança de no mínimo 95%.

5 RESULTADOS

5.1 Membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas promove neovascularização no modelo da MCA

Tendo em vista a ausência de estudos publicados sobre o papel das membranas de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas quanto à vascularização ocular, é importante investigar o comportamento deste biomaterial através de modelos compatíveis com esses sistemas. Nesse sentido, os ensaios na MCA foram considerados um modelo apropriado. Assim, investigamos principalmente, neste modelo tradicional de vascularização, se a MCA poderia apresentar vascularização alterada quando exposta às membranas de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas. A membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas promove neovascularização após 24 e 48 horas (Figura 9). Bevacizumabe (0,4 mg/mL) foi utilizado como controle positivo, por proporcionar redução significativa na neovascularização (Figura 10).

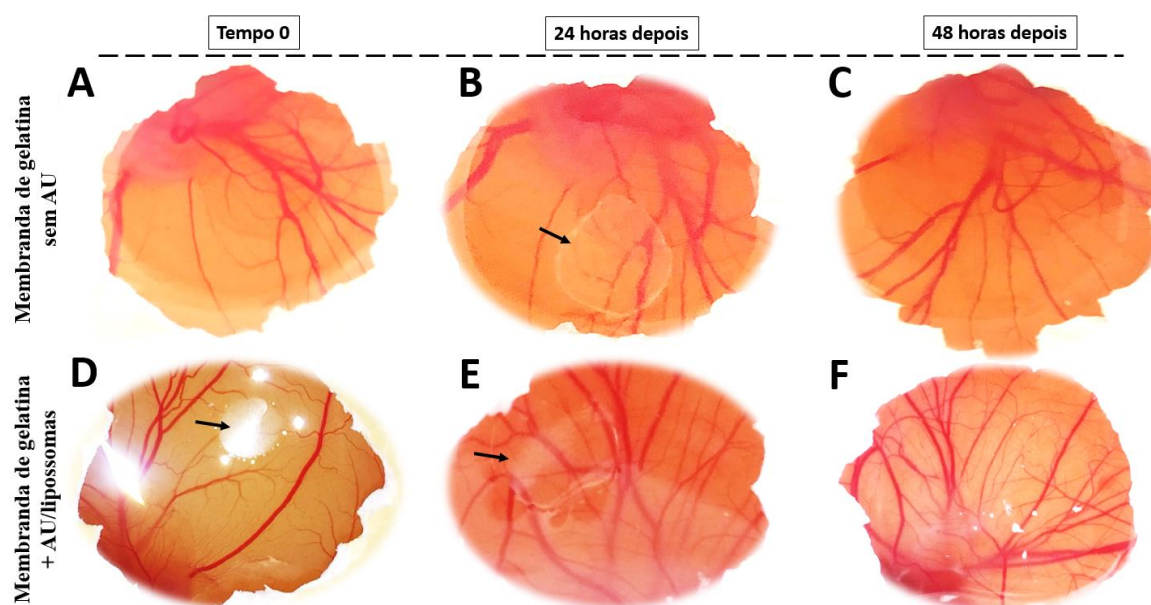


Figura 9 - Membrana de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas promove neovascularização. (A) mostra uma MCA exposta a membrana de gelatina sem ácido úsnico no tempo inicial ($n = 4$) e (B) a mesma MCA após 24 e 48 horas (C). Em (D) é mostrada uma MCA no tempo inicial exposta à membrana de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas $4,92 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n=4$) no tempo inicial. Observa-se a presença de neovascularização após 24 horas (E) e 48 horas (F). As setas pretas indicam a localização da membrana de gelatina contendo ou não ácido úsnico/lipossomas, mostrando que não são totalmente biodegradadas nas primeiras 24 horas do estudo.

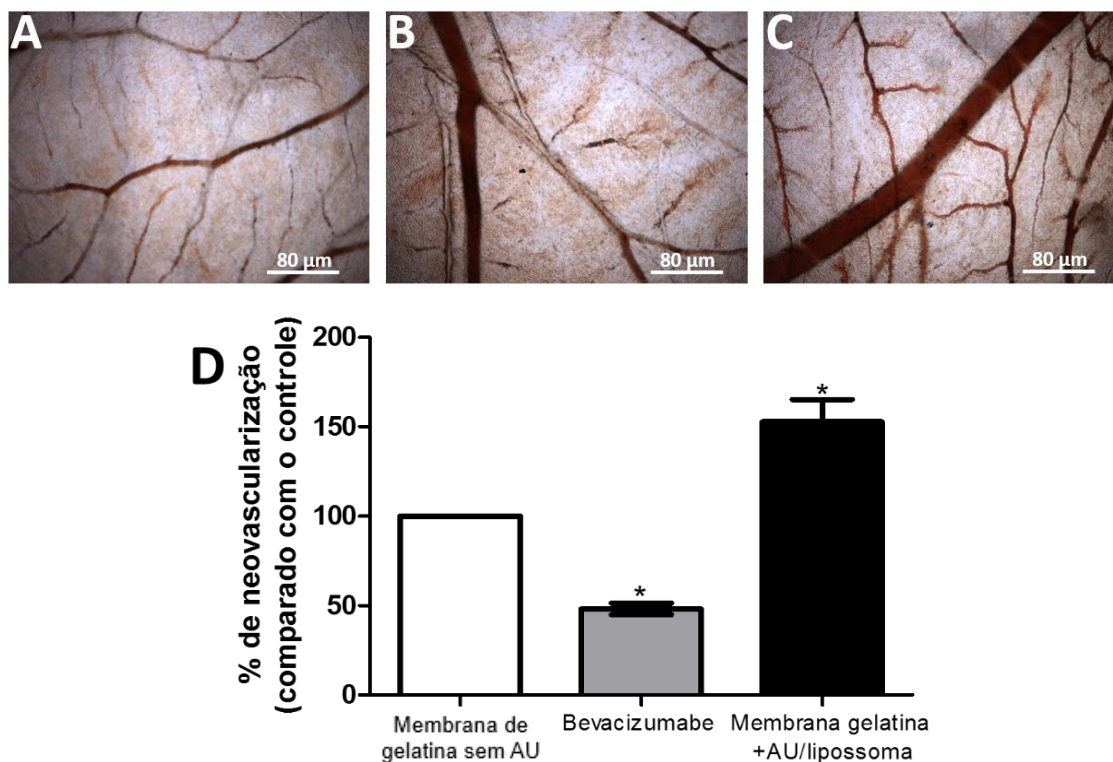


Figura 10 – A membrana de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas promove a neovascularização na MCA: É mostrada uma sequência de fotografias ilustrando (A) MCA exposta a membrana de gelatina sem ácido úsnico ($n=4$), (B) MCA exposta ao Bevacizumabe 0,4mg / mL ($n=3$) e (C) MCA exposta a membrana de gelatina contendo ácido úsnico $4,92 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ carregado em lipossoma ($n=4$) em um período de 48h. (D) O gráfico mostra a medida da vascularização em % da MCA após a exposição à membrana de gelatina contendo ácido úsnico ou Bevacizumabe comparados ao controle. Os dados representam em % média e desvio padrão do número de pixels referente aos experimentos independentes. *indica diferença significativa quando comparado ao veículo ($p < 0,05$).

5.2 Membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas não promove toxicidade e são biocompatíveis com o sistema ocular pelo método HET-CAM

As áreas em capilares de MCA foram expostas à membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas e membrana gelatina sem ácido úsnico, afim de certificar sua biocompatibilidade como mostrado nas figuras 11 e 12. Para garantir a segurança do sistema de liberação, a MCA foi exposta à membrana de gelatina contendo ácido úsnico, a membrana de gelatina sem ácido úsnico e ao NaOH 0,1 M. O aspecto dos vasos após o tratamento com a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas foi semelhante ao resultado encontrado após o tratamento com a membrana de gelatina sem ácido úsnico. Não houve fenômenos de coagulação, hiperemia e hemorragia observados na amostra após o tratamento com a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas em comparação com o controle

positivo (Figura 13). Uma comparação com o controle positivo (NaOH 0,1 M) mostra que as MCAs expostas membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas não possuem os marcadores de coagulação, hiperemia e hemorragia da inflamação assemelhando-se ao controle negativo.

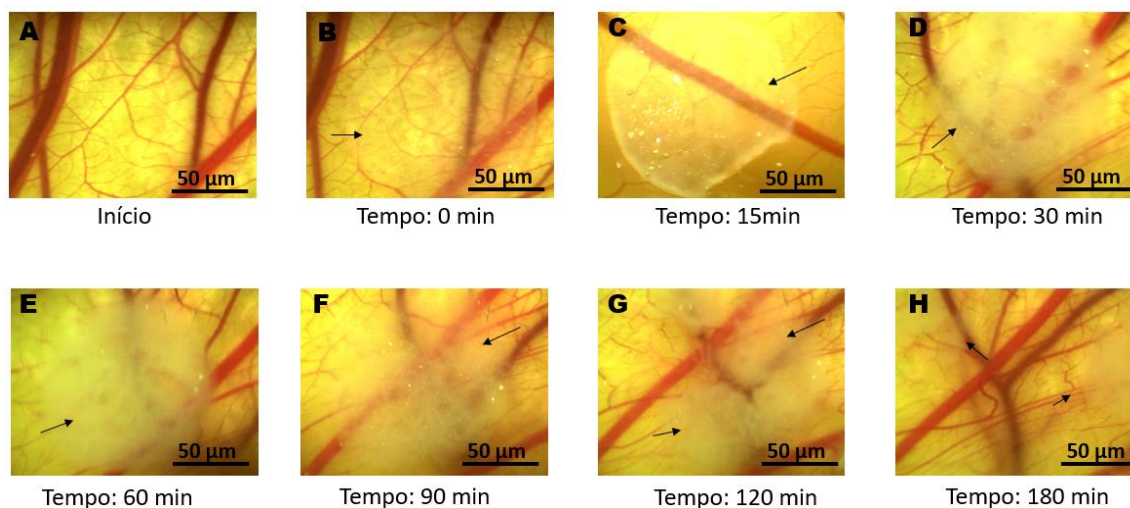


Figura 11 – Áreas em capilares de MCA expostas à membrana de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas. (A) área inicial sem exposição à membrana de ácido úsnico/lipossomas $4,92 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (B) Exposição a membrana no tempo 0, com posicionamento indicado por seta preta (C, D, E, F e G) acompanhamento da biodegradação da membrana nos primeiros 120 min (H) após 180 min ainda há a presença de membrana nos capilares da MCA (identificado por setas pretas).

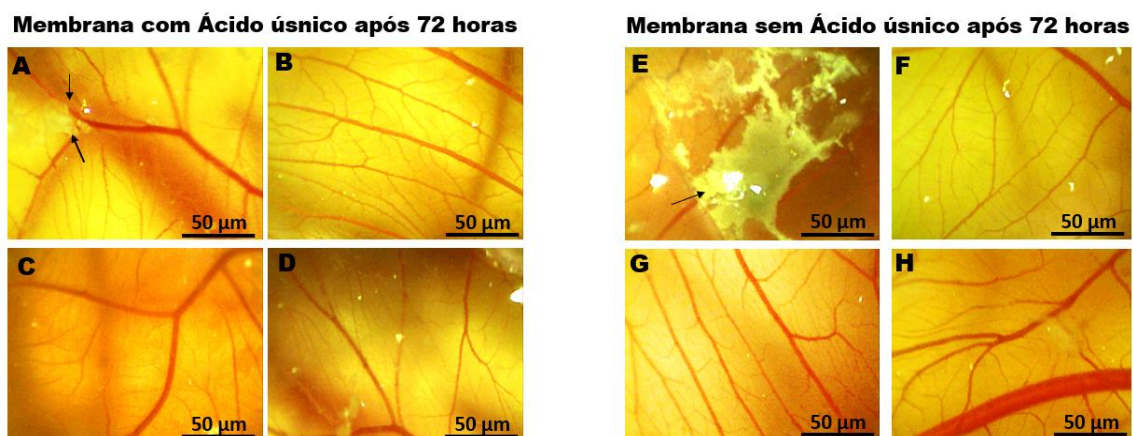


Figura 12: Teste de biocompatibilidade na MCA expostas à membrana de gelatina contendo ácido úsnico ($n = 8$) e membrana gelatina sem ácido úsnico ($n = 8$). (A) presença de membrana de gelatina contendo ácido úsnico $4,92 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ na MCA após 72 horas (indicado por setas pretas) (B, C e D) áreas da MCA com a membrana de gelatina contendo ácido úsnico já biodegradada após 72 horas (E) presença de membrana de gelatina sem ácido úsnico na MCA após 72 horas (indicada por seta preta) (F, G e H) áreas da MCA com a membrana de gelatina sem ácido úsnico sendo biodegradada após 72 horas.

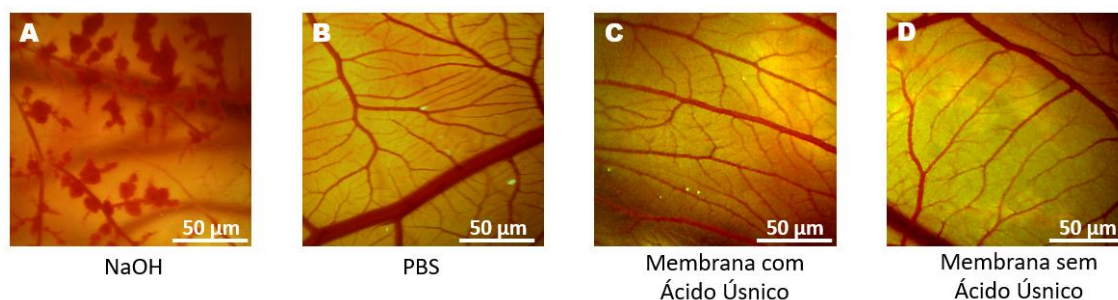


Figura 13: Áreas em capilares de MCA para avaliação da toxicidade. (A) NaOH 0,1 M como controle positivo, evidenciando sinais de hemorragia e hiperemia, (B) PBS como controle negativo, (C) membrana de gelatina contendo ácido úsnico $4,92 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ sem sinais de hemorragia e/ou hiperemia e (D) membrana de gelatina sem ácido úsnico também sem sinais de hemorragia e/ou hiperemia.

Pontuações OII de 0,9 foram obtidas para PBS (controle negativo) e 21 para soluções de NaOH 0,1 M (controle positivo) (Tabela 2). Enquanto isso, as membranas de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas $4,92 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ não foram irritantes (pontuação 0,9), assim como o controle PBS. Além disso, não foram observadas alterações estruturais e lise dos vasos sanguíneos após o tratamento com as membranas contendo ou não ácido úsnico. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os cortes histológicos entre os grupos tratados com a membrana de gelatina sem ácido úsnico e com a membrana de gelatina contendo ácido úsnico. Ambos os grupos mostram as três camadas (ectoderme, estroma e endoderme) da MCA com aparência normal. Além disso, não foram observadas, alterações estruturais e lise dos vasos sanguíneos após o tratamento com as membranas contendo ou não ácido úsnico (Figura 14).

Tabela 3 - Índice de irritação ocular (OII). Os resultados são expressos como média $\pm$ D.P.

* NI - não irritante ou levemente irritante; * SI - Severamente irritante

Solução testada / dispersão	média $\pm$ D.P	Classificação de Irritância
NaOH (1M) (Controle Positivo)	21,11 $\pm$ 0,32	SI
PBS 7,4 (Controle Negativo)	$\leq 0,9 \pm 0,0$	NI
Membrana com Ácido Úsnico ($4,92 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$\leq 0,9 \pm 0,0$	NI
Membrana sem Ácido Úsnico	$\leq 0,9 \pm 0,0$	NI

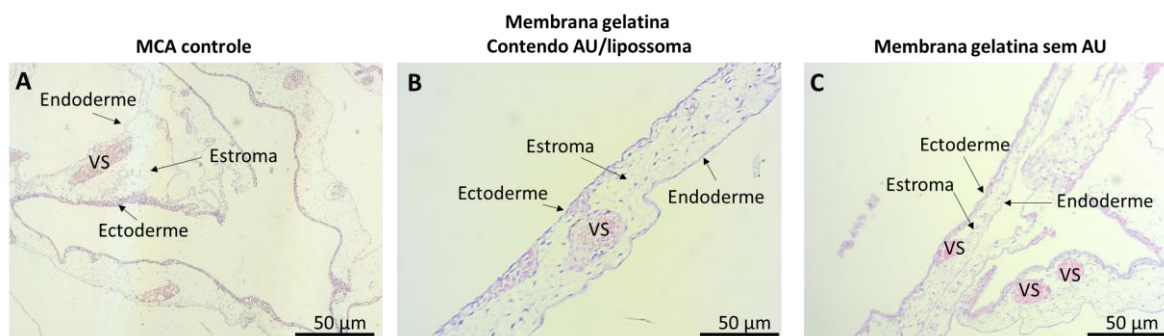


Figura 14 - Avaliação histológica da MCA. A sequência de fotografias ilustra (A) Secções histológicas de MCA não exposta à membrana de gelatina contendo ou não ácido úsnico (controle), (B) MCA após exposição durante 5 min. (C) MCA após aplicação de membrana de gelatina contendo ácido úsnico/lipossoma. MCA: Membrana corioalantóica. VS: Vaso sanguíneo. AU: Ácido úsnico.

5.3 Membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas não promovem irritabilidade ocular

Os resultados do teste de irritação estão representados na Tabela 3, junto às observações realizadas 1h, 24h, 48h, 72h e 7 dias após a aplicação. Os resultados indicam que as formulações testadas, tanto a membrana contendo ácido úsnico quanto a membrana sem ácido úsnico, não produziram qualquer tipo de irritabilidade ao olho do coelho.

Para as duas membranas, os escores que classificam a opacidade corneana, hiperemia de conjuntiva e hiperemia de íris foram iguais a zero, o que permite classificar as membranas testadas como não irritantes.

Tabela 4 - Avaliação da irritabilidade ocular de membranas de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas pelo Teste de Draize.

BIOMATERIAL	TEMPO AVALIADO (h ou dias)	OPACIDADE CORNEANA	HIPEREMIA DA ÍRIS	HIPEREMIA DA CONJUNTIVA	
				Congestão	Inchaço
Membrana de gelatina contendo AU carregado em lipossoma 4,92 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	1	0	0	0	0
	24	0	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	0	0	0	0
	7 dias	0	0	0	0
Membrana de gelatina sem AU	1	0	0	0	0
	24	0	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	0	0	0	0
	7 dias	0	0	0	0

Membranas de gelatina com e sem ácido úsnico carregado em lipossomas foram topicamente administradas no olho direito uma única vez. Em seguida, foram realizadas observações após 1h, 24h, 48h, 72h e 7 dias a fim de se avaliar a tolerabilidade ocular.

5.4 Membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas promove cicatrização de queimadura química alcalina corneana

Após as membranas de gelatina contendo ácido úsnico mostrarem não ser irritativas em olhos de coelhos (Tabela 3), iniciou-se o tratamento com as membranas de AU/lipossomas após a indução da queimadura química alcalina. O intuito deste experimento foi investigar a eficiência da membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas em promover cicatrização corneana após queimadura química alcalina. Para tanto foi utilizado o marcador fluoresceína sob uma luz azul cobalto através do microscópio lâmpada de fenda. A Figura 15 mostra imagens da marcação com fluoresceína em dois grupos estudados: tratado (membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas) e controle (membrana de gelatina sem ácido úsnico) imediatamente após a lesão no tempo 0 (tempo inicial) (Figura 15A e C) e 72 horas após a lesão (Figura 15B e D).

Imediatamente após o procedimento, não foi observada cicatrização na presença do ácido úsnico carregado em lipossomas (Figura 15C, E e F) quando comparado ao grupo controle (membrana de gelatina sem ácido úsnico) (Figura 15A, E e F). Entretanto, a diferença ocorreu, de forma significativa, com redução da área queimada após 72h do grupo tratado com membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado

em lipossomas (Figura 15D e E) quando comparado ao controle (Figura 15B e E). Na figura 15F pode-se observar um percentual de redução da área da lesão 72 horas após a queimadura química alcalina de 55,9% da área lesada na córnea dos animais tratados com a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas enquanto o grupo de animais tratados com a membrana sem ácido úsnico apresentou uma redução de 31,5%. A membrana de gelatina contendo ácido úsnico promoveu cicatrização corneana de uma maneira mais eficiente e uniforme (Figura 15D), quando comparado ao animal tratado com a membrana de gelatina sem ácido úsnico (Figura 15B).

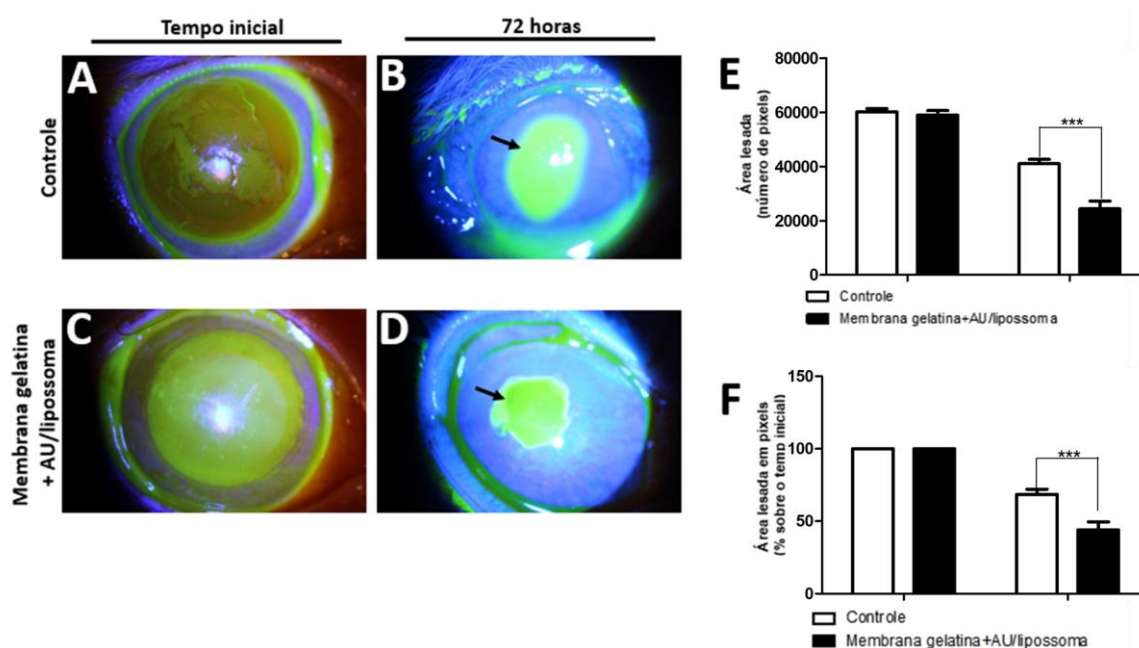


Figura 15 - Marcação com fluoresceína em dois grupos (grupo tratado com membrana de gelatina contendo ácido úsnico n=7 e grupo controle n=6). (A) imagem imediatamente após a queimadura no grupo controle, (B) grupo controle após 72 horas, com lesão ainda disforme (seta preta), (C) imagem imediatamente após a queimadura no grupo tratado, (D) lesão após 72 horas no grupo tratado evidenciando redução da área tratada e lesão mais uniforme (seta preta), (E) o gráfico mostra diferença significativa entre os grupos, quanto à redução da área lesada entre os grupos em pixels e (F) redução da área lesada em %. * indicam diferença significativa quando comparado ao controle para valores de $p < 0.05$.

5.5 Membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas promove redução da presença de células mortas e da irritabilidade conjuntival

Após observar que a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas promoveu cicatrização corneal em olhos de coelhos de forma eficiente (Figura 15), foi realizada a análise da área lesada em relação à presença de células

mortas na córnea, bem como alterações importantes que influenciam na velocidade do processo de cicatrização, como hiperemia da córnea. O intuito deste experimento foi investigar a eficiência da membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas em reduzir a quantidade de células lesadas na córnea e a hiperemia conjuntival após queimadura química alcalina. Para tanto foi utilizado o marcador Rosa Bengala sob uma luz branca através do microscópio lâmpada de fenda.

A Figura 16 mostra imagens da marcação com Rosa Bengala em dois grupos estudados: tratado (membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas) e controle (membrana de gelatina sem ácido úsnico) imediatamente após a lesão no tempo 0 (tempo inicial) (Figura 16A e C) e 72 horas após a lesão (Figura 16B e D).

Após o procedimento, verificou-se diferença significativa na redução da área tecidual que apresenta células mortas durante o processo de lesão química, na presença do ácido úsnico carregado em lipossomas (Figura 16C e F) quando comparado ao grupo controle (Figura 16A e F). Na figura 16G podemos observar um percentual de redução de células mortas na lesão 72 horas após a queimadura química alcalina de 87,8% da área lesada na córnea dos animais tratados com a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas enquanto o grupo de animais tratados com a membrana sem ácido úsnico apresentou uma redução de 74,7%. Além disso, observou-se que após o procedimento (tempo inicial) o grupo controle (Figura 16A) apresentou leve hiperemia e irritação conjuntival indicada pelas setas brancas, e que após 72 horas a hiperemia mostrou-se aumentada neste grupo (Figura 16B). Após 72 horas de tratamento com a membrana contendo ácido úsnico carregado em lipossomas foi observada uma redução da hiperemia conjuntival (Figura 16D) indicada pelas setas amarelas, assemelhando-se a um olho sadio de coelho dentro do mesmo período de 72 horas (Figura 16E).

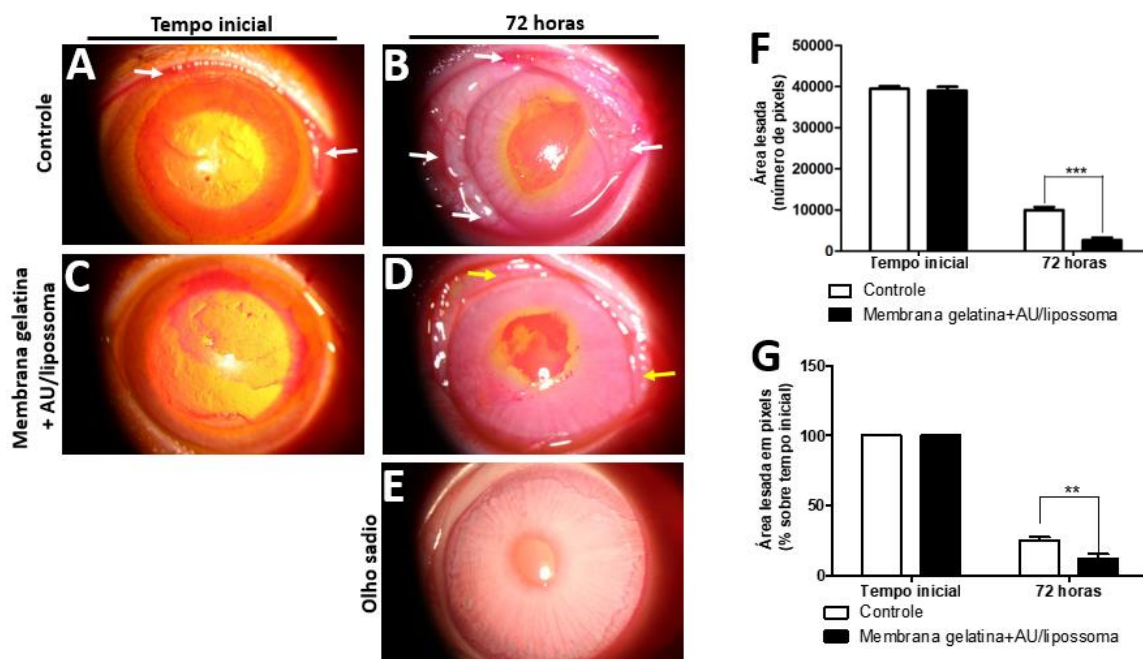


Figura 16 - Marcação com Rosa Bengala em dois grupos (grupo tratado n=3 e grupo controle n=3). (A) imagem imediatamente após a queimadura no grupo controle, (B) imagem do grupo controle após 72 horas, ainda com hiperemia e irritação conjuntival (setas brancas), (C) imagem imediatamente após a queimadura no grupo tratado, (D) lesão após 72 horas no grupo tratado evidenciando redução da área de hiperemia e da irritação conjuntival (setas amarelas), (E) imagem de olho sadio em 72 horas após o início do experimento, (F) diferença significativa entre os grupos, quanto a redução da área lesada, entre os grupos (G) redução da área lesada (em pixels) em %.* indicam diferença significativa quando comparado ao controle para valores de $p < 0.05$.

5.6 Membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossoma não promove alteração histológica do epitélio corneano e estimula reparo estromal

A avaliação histológica do epitélio da córnea após 72 horas de lesão é mostrada na figura 17. Na figura 17A pode-se observar área com lesão em região epitelial ainda presente. Quanto à córnea tratada com membrana de gelatina contendo ácido úsnico, observamos processo de regeneração em estágio avançado, além de maior continuidade do epitélio corneano quando comparado ao grupo controle (Figura 17D).

Nos animais tratados com membrana de gelatina contendo ácido úsnico foi evidenciado qualitativamente ausência de tecido de granulação, além de feixes de colágeno organizados e alinhados paralelamente na camada estromal (Fig. 17E e F), opostamente ao que foi observado na histologia da córnea dos animais tratados apenas com membrana sem ácido úsnico (Fig. 17B e C). Observou-se também que o grupo tratado com membrana de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas apresentou estroma com fibrócitos sem alterações morfológicas e epitalização com seis a sete

camadas, além de presença de vasos sanguíneos na região do estroma próxima ao epitélio (figura 17E). Por outro lado, os animais tratados com membrana sem ácido úsnico/lipossomas expressaram epitélio com camadas de colágeno depositadas de forma desorganizada e estroma com aumento da equidistância entre as fibras (figura 17B), quando comparados à córnea saudável.

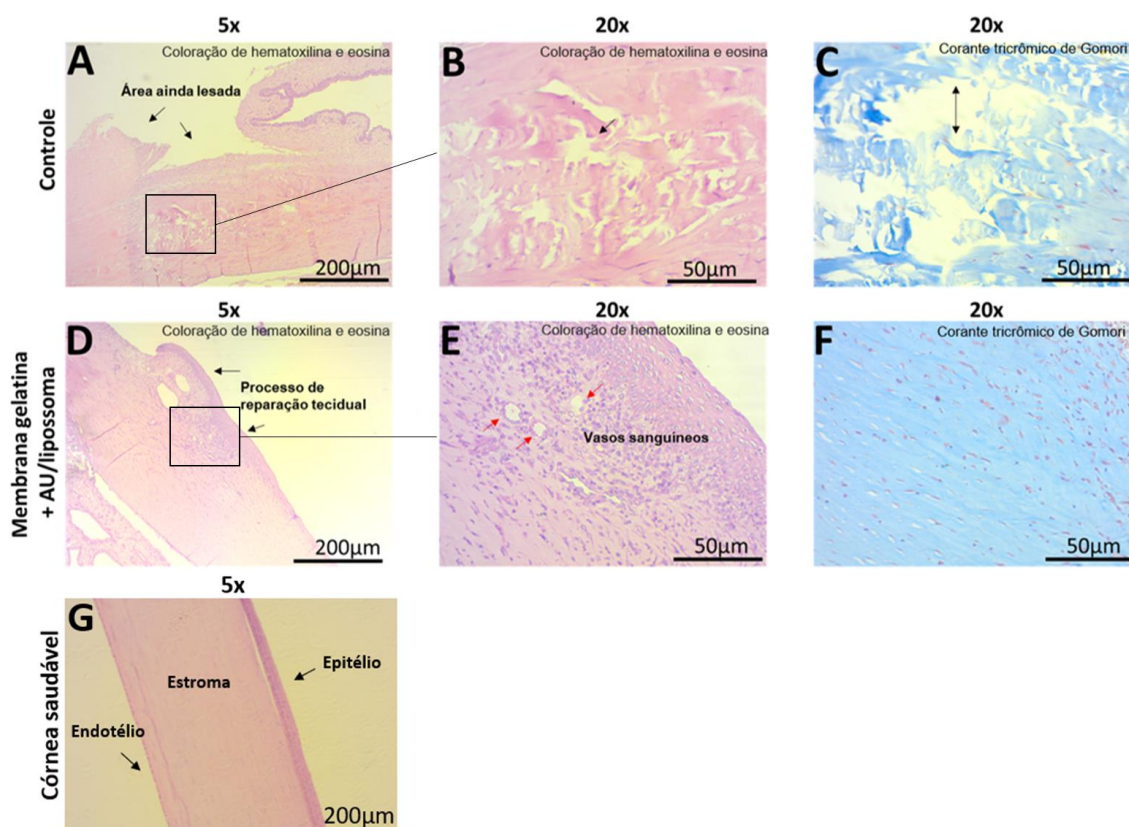


Figura 17 - Avaliação histológica da córnea após 72 horas (A) imagem mostrando epitélio de córnea tratada com a membrana de gelatina sem ácido úsnico ainda com área lesada (setas pretas), coloração H&E (B) áreas de estroma apresentando deposição de colágeno de forma desorganizada (seta preta), coloração H&E (C) aumento da equidistância entre as fibras de colágeno indicado por seta preta. Coloração tricrômio de Gomori (D) processo de regeneração em estágio avançado (setas pretas). Coloração H&E (E) feixes de colágeno alinhados paralelamente na camada estromal, com presença de vasos na porção distal do estroma (setas vermelhas), coloração y790yyyH&E (F) feixes de colágeno alinhados paralelamente na camada estromal. Coloração tricrômio de Gomori e (G) histologia de córnea saudável.

6. DISCUSSÃO

As estratégias de tratamento para lesões da córnea geralmente incluem várias opções terapêuticas como antibióticos tópicos, esteróides, agentes cicloplégicos e terapia tópica ou sistêmica para estimular a síntese de colágeno (KOUTSILIERI et al., 2007). No presente estudo procurou-se avaliar primeiramente a segurança da aplicação ocular da membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas em córnea de coelho, bem como seu potencial cicatrizante em queimadura de córnea. Para tal investigação, sabendo da importância da biocompatibilidade e baixa irritabilidade de fármacos para uso oftalmológicos, foram utilizados modelos *in vivo* tanto para avaliação de biocompatibilidade e toxicidade quanto para neovascularização, cicatrização e teste de irritabilidade ocular.

A toxicidade de drogas ou transportadores em embriões de galinha pode ser avaliada pela morte do embrião ou efeitos adversos na MCA, incluindo inflamação (RIBATTI, 2017). A resposta inflamatória da MCA do ovo a um biomaterial foi similar à da resposta dos mamíferos (VALDES et al., 2002) e esta correlação permite considerar a MCA como um modelo *in vivo* para triagem de materiais para sua biocompatibilidade e seu efeito sobre tecido conjuntivo (SPANIEL-BOROWSKI, 1989). A irritação com risco de dano vascular (hemorragia, lise e coagulação) de formulações oculares também pode ser avaliada pelo teste HET-CAM porque a mucosa vascularizada do embrião de galinha se assemelha ao olho humano (ABDELKADER et al., 2012).

Já foi demonstrado que existe um efeito antiangiogênico do ácido úsnico em embriões zebra fish (DRAUT et al., 2017). Porém, presença da formação de novos vasos na MCA (Figura 8) evidencia o efeito angiogênico da membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas na membrana corioalantóica dos ovos de galinha e seu papel na neovascularização. Diferente dos achados encontrados por Song et al.(2012) em que o ácido úsnico (10 μ M de solução) inibiu a angiogênese *in vivo* em um ensaio de membrana corioalantóica de embrião de galinha para modelo de tumor em rato. Tal discordância pode ser justificada pelo fato de a membrana contendo ácido úsnico carregado em lipossomas possuir sistema de liberação controlada como estratégia para incorporação de substâncias ativas o que acaba por possibilitar um maior controle da liberação do princípio ativo, redução de doses tóxicas e subterapêuticas (VILAR et

al., 2012). Além do fato de a membrana apresentar biodegradação mais lenta, promover a penetração e permeação do fármaco, bem como, apresentar estabilidade quanto à variações térmicas e exposição à luz, opostamente ao estudo de Song (2012) que utilizou o ácido úsnico em solução ao invés de estar associado a um sistema de liberação controlada.

Conforme relatado por Silva (2017), os estudos sobre o potencial toxicológico do ácido úsnico são bastante limitados, sendo que a grande maioria dos dados disponíveis na literatura está relacionada apenas às atividades biológicas (SILVA et al., 2017). Em estudo recente, foi realizado um teste de toxicidade do ácido úsnico, entretanto, direcionado à mucosa oral em ratos, o qual o ácido úsnico foi utilizado na concentração 15 a 25 mg/Kg administrado via gavagem durante um período de 15 dias de gestação. Observou-se que no 20º dia ocorreram alterações morfológicas na ninhada como exposição do olho e atrofia dos membros na dose de 25 mg/kg (SILVA et al., 2017). No modelo utilizado no presente trabalho não foi observado qualquer alteração morfológica, seja no embrião ou nos animais, na presença do ácido úsnico na concentração de $4,92 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Sendo assim, a avaliação do efeito da membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas sobre a neovascularização, biocompatibilidade e toxicidade ocular foram investigadas de forma inédita neste trabalho. A MCA do embrião foi exposta a duas membranas diferentes (membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas e membrana de gelatina sem ácido úsnico) e também foi exposta a duas soluções diferentes NaOH a 0,1 M (controle positivo do experimento, por promover hemorragia) e PBS a 0,5% (controle negativo, por não promover hemorragia). Ambas membranas de gelatina mostraram ser seguras para uso oftálmico, uma vez que os sintomas adversos vasculares foram ausentes (Figura 12). É importante destacar que os escores acumulados médios calculados para as membranas de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas foram $\leq 0,9$, o que classificou estas membranas como não irritantes, demonstrando que na ausência do ácido úsnico e do sistema de liberação controlada não promove toxicidade, sendo portanto, seguro. No entanto, o escore acumulado médio do controle positivo NaOH 0,1 M classificou-o como severamente irritante (Tabela 2). Assim, a semelhança do aspecto histológico entre o controle negativo e o grupo tratado com membrana de gelatina

contendo ou não ácido úsnico argumenta para a inocuidade da substância e do sistema de liberação escolhido para aplicação na superfície da MCA (Figura 13).

Além dessas observações, o teste HET-CAM, mostrou um tempo de biodegradação de aproximadamente 72 horas (Figura 11), o que torna a membrana compatível para administração eficaz de medicamentos oftalmológicos, visto que, uma formulação adequada é a que permite manter a concentração do fármaco eficaz no tecido ou no local de ação durante um período de tempo significativo, a fim de atingir a resposta terapêutica desejada. Neste caso, a administração tópica, atualmente tem sido a melhor opção de administração (FABIANO et al., 2015, BEHL et al., 2016).

Em estudo de caracterização da membrana de gelatina contendo ácido úsnico, Lima (2017) observou perfil de liberação controlada demonstrando nas duas primeiras horas de experimento, uma liberação de 38,70% do AU contido na membrana. No entanto, após às 24 horas, as membranas de AU/lipossomas mostraram uma liberação controlada, liberando 98,15% do AU contido na membrana. Sendo assim pode-se concluir que a membrana de AU/Lipossomas é capaz de controlar a liberação do AU durante seu tempo de biodegradação na córnea do coelho, devido a sua incorporação em lipossomas, mantendo a concentração do princípio ativo constante durante um longo período de tempo e reduzindo a frequência de administração (YANG et al., 2015).

No teste do ovo de galinha (HET-CAM) observou-se que a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas não apresentou sinais de hemorragia e/ou hiperemia, assim como também não demonstrou sinais de irritabilidade (Figura 12). Deve-se considerar que a avaliação da toxicidade de formulações oftálmicas e o potencial de irritação ocular representam um passo fundamental no que se refere ao desenvolvimento de novos sistemas de entrega para tratamento de afecções oftalmológicas (SAW et al., 2008).

Além das observações em embriões de galinha, o teste de Draize para determinação da toxicidade ocular foi realizado conforme descrito nos métodos. O teste de Draize que avalia a toxicidade ocular mostrou que as membranas de gelatina contendo ou não ácido úsnico carregado em lipossomas não induziram sinais de inflamação ocular ou alteração do tecido nos olhos dos coelhos. Após uma única administração, o escore de congestão conjuntival, inchaço, hiperemia da íris e opacidade da córnea permaneceu zero em cada observação. Com base na ausência de efeito irritante pelas membranas de gelatina contendo ou não ácido úsnico carregado em

lipossomas nos testes HET-CAM e Draize, é suportada neste trabalho a tolerabilidade e a segurança ocular da membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas.

Após avaliação do potencial efeito da membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas na cicatrização após a indução de queimadura química alcalina da córnea de coelhas, o diagnóstico de abrasão corneana foi confirmado pela visualização da córnea sob luz azul-cobalto filtrada após a aplicação de fluoresceína, identificando a área que sofreu a abrasão de cor verde, assim como já descrito na literatura (WILSON and LAST, 2004).

Verificou-se que o tratamento com a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas em olhos de coelho expostos ao etanol resultou em uma significativa redução na área danificada avaliada pela epitelização corneana mais rápida após 72 horas em comparação com o grupo controle (tratado com membrana de gelatina sem ácido úsnico) (Figura 14).

É bem estabelecido que tanto a aceleração quanto o adequado processo de cicatrização da córnea tem relação com o controle do processo inflamatório na fase latente após lesão. Tendo em vista os resultados sugestivos de um processo cicatricial mais robusto no grupo tratado com a membrana de gelatina contendo ácido úsnico, pode-se atribuir à atuação do AU sobre alguns mediadores pró e anti-inflamatórios. Em estudo realizado por Barbosa e colaboradores (2017), o AU demonstrou atividade anti-inflamatória em edema de pata de rato induzido por carragenina. Em estudo de Huang et al., 2011, demonstrou que o efeito anti-inflamatório do AU está relacionado à regulação negativa da IL-1 β e TNF- α . Su et al., 2014, observaram que AU protege a lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo em camundongos e avaliação da atividade anti-inflamatória indicou que o AU atenuou a expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Entretanto, não existem trabalhos na literatura que demonstrem o efeito anti-inflamatório de membranas de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas na redução do processo inflamatório de feridas epiteliais na superfície da córnea de coelhos.

A detecção de células danificadas da córnea e conjuntiva foram avaliadas através do uso de marcador Rosa bengala por instilação do colírio no saco conjuntival, buscando identificar células não íntegras no olho do animal sob exame com microscópio de lâmpada de fenda. Nos resultados obtidos, quanto maior a intensidade

da coloração rosa na superfície, seja córnea ou conjuntiva, maior a extensão de tecido lesado. Deve-se levar em consideração o edema e hiperemia conjuntival após lesão corneana. Em estudos anteriores, na determinação da lesão corneana através do uso do colírio rosa bengala, também foram encontrados em maior intensidade de coloração a córnea e conjuntiva dos animais no grupo controle quando comparado ao grupo tratado (WANG et al., 2011, LIN et al., 2018).

É importante considerar também, que diferentemente dos processos reparadores teciduais dérmicos, a cicatrização da ferida da córnea é mais complexa devido à organização e diferenciação das subestruturas corneanas que exigem ausência de vasculogênese (WILSON et al., 2001, AGRAWAL and TSAI, 2003, NETTO et al., 2005, GIESE and SPETH, 2014). A córnea possui um arranjo ordenado de fibras colágenas estromais e a ausência de vasos sanguíneos (MEEK and BOOTE, 2004, MULLER et al., 2004, DELMONTE and KIM, 2011). A cicatrização inadequada ou incompleta da córnea após a lesão pode resultar em diminuição ou perda da visão. Embora o ensaio da MCA tenha apresentado neovascularização na presença da membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas (Figura 8), o teste de biocompatibilidade ocular (Figura 11) na HET-CAM não apresentou quaisquer alterações nos vasos sanguíneos. Além disso, o teste de Draize (Tabela 3) demonstrou que a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas não promoveu hiperemia da conjuntiva, lacrimejamento e irritação corneana, indicando que, embora o produto apresente potencial angiogênico na MCA, não foi capaz de promover irritabilidade ocular e tão pouco modificar a integridade tecidual da córnea conforme observado no exame histológico (Figura 16).

A microscopia das secções histológicas dos grupos tratados com a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas comparada com o controle (grupo tratado com membrana de gelatina sem ácido úsnico) confirmou os sinais de recuperação melhorada nos animais tratados com a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas (Figura 16). Os resultados confirmam a melhora da superfície ocular após a lesão química quando tratados com a membrana contendo ácido úsnico, evidenciada por menor granulação e feixes de colágeno mais organizados, alinhados paralelamente. Além disso, outro ponto importante na organização da deposição das fibras de colágeno é a prevenção de sequelas como opacidade da córnea, que não foi observada (GOMES et al., 2010).

No processo de cicatrização corneano, avaliado através do percentual de redução da área da lesão 72 horas após a queimadura química alcalina, observou-se uma redução de 55,9% da área lesada na córnea de animais tratados com a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas enquanto o grupo de animais tratados com a membrana sem ácido úsnico apresentou uma redução de 31,5%. Embora ainda não tenha sido demonstrado o efeito de membranas de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas no sistema ocular, o potencial da membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas em promover cicatrização já foi demonstrado pelo nosso grupo (NUNES et al., 2010, NUNES et al., 2011, NUNES et al., 2016) onde concluiu-se que a membrana de gelatina contendo ácido úsnico promoveu cicatrização e redução macroscópica de feridas de queimadura. Corroborando os resultados encontrados nesses estudos anteriores, tendo em vista que existem semelhanças definitivas na cicatrização por células epiteliais, estromais e endoteliais relacionadas à migração celular, já foi demonstrado também que existe uma dependência de fatores de crescimento e remodelação da matriz extracelular (MEC) (WILLIAMSON, 1972, LJUBIMOV and SAGHIZADEH, 2015).

Quanto à comparação dos dois grupos deste estudo, verificou-se uma redução da porcentagem de células mortas do grupo tratado em 87,8% enquanto no grupo controle observamos uma redução de 74,7%. Segundo Mello (2011) para que haja viabilização do processo cicatricial, o epitélio íntegro é fundamental para diminuir a possibilidade de contaminação secundária da ferida, risco de infecção e processos inflamatórios, sendo esses alguns dos motivos pelo atraso na reepitelização. Estes dados tornam a membrana de gelatina contendo ácido úsnico eficaz na viabilização do processo cicatricial.

7. CONCLUSÃO

As membranas de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossomas promoveram angiogênese em modelo *in vivo* pelo ensaio na MCA. Além disso, são compatíveis com o tecido ocular e seguras para aplicação oftálmica por não apresentar toxicidade. Este trabalho mostrou que o produto promove cicatrização corneana provocada por queimadura química alcalina de maneira eficiente em coelhos, acompanhado de uma redução na presença de células mortas na córnea lesada e da melhora da irritabilidade conjuntival, o que torna o produto uma excelente opção farmacêutica para uma recuperação mais rápida e menos dolorosa.

PERSPECTIVAS

Uma vez que o controle do processo inflamatório na fase aguda da queimadura química é determinante para cicatrização adequada, e tendo em vista que a membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossoma apresentou potencial cicatrizante do epitélio corneano, torna-se necessária a investigação de mecanismos relacionados ao processo inflamatório. Desta forma, pretende-se avaliar a expressão gênica de: IL1- β , TNF- α , TGF- β e VEGF, tendo como controle β -actina ou GAPDH, através da quantificação por rt-PCR de amostras da córnea dos grupos tratado (membrana de gelatina contendo ácido úsnico carregado em lipossoma) e controle (membrana de gelatina sem ácido úsnico).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABDEL-NABY, W.;B. COLE;A. LIU;J. LIU;P. WAN;R. SCHREINER;D. W. INFANGER;N. B. PAULSON;B. D. LAWRENCE AND M. I. ROSENBLATT (2017). "Treatment with solubilized silk-derived protein (sdp) enhances rabbit corneal epithelial wound healing." **PLoS One** 12(11): e0188154.

ABDELKADER, H.;S. ISMAIL;A. HUSSEIN;Z. WU;R. AL-KASSAS AND R. G. ALANY (2012). "Conjunctival and corneal tolerability assessment of ocular naltrexone niosomes and their ingredients on the hen's egg chorioallantoic membrane and excised bovine cornea models." **Int J Pharm** 432(1-2): 1-10.

AGRAWAL, V. B. AND R. J. TSAI (2003). "Corneal epithelial wound healing." **Indian J Ophthalmol** 51(1): 5-15.

AMBROSONE, L.;G. GUERRA;M. CINELLI;M. FILIPPELLI;M. MOSCA;F. VIZZARRI;D. GIORGIO AND C. COSTAGLIOLA (2014). "Corneal epithelial wound healing promoted by verbascoside-based liposomal eyedrops." **Biomed Res Int** 2014: 471642.

ARAÚJO, A. A. S. et al. (2015) Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. *Nat Prod Res.* v. 29, n. 23, p. 2167-2180.

ASLAM, S. A.;H. G. SHETH AND A. J. VAUGHAN (2007). "Emergency management of corneal injuries." **Injury** 38(5): 594-597.

ATHANASIOU, K. A. E. A. (1996). "Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copo-lymers." **Biomaterials** 17(2): 93-102.

BARBOSA, J. A. P. et al., (2017) Poly-ε-Caprolactone Microsphere Polymers Containing Usnic Acid: Acute Toxicity and Anti-Inflammatory Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* v. 2017, p. 1-9.

BEHL, G.;J. IQBAL;N. J. O'REILLY;P. MCLOUGHLIN AND L. FITZHENRY (2016). "Synthesis and characterization of poly(2-hydroxyethylmethacrylate) contact lenses containing chitosan nanoparticles as an ocular delivery system for dexamethasone sodium phosphate." **Pharm Res** 33(7): 1638-1648.

BOCHATON-PIALLAT, M. L.;G. GABBIANI AND B. HINZ (2016). "The myofibroblast in wound healing and fibrosis: Answered and unanswered questions." **F1000Res** 5.

BOURNE, R. R. A.;S. R. FLAXMAN;T. BRAITHWAITE;M. V. CICINELLI;A. DAS;J. B. JONAS;J. KEEFFE;J. H. KEMPEN;J. LEASHER;H. LIMBURG;K. NAIDOO;K. PESUDOV;S. RESNIKOFF;A. SILVESTER;G. A. STEVENS;N. TAHHAN;T. Y. WONG;H. R. TAYLOR AND G. Vision Loss Expert (2017). "Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: A systematic review and meta-analysis." **Lancet Glob Health** 5(9): e888-e897.

CADE, F., PASCHALIS, E. I., REGATIERI, C. V., VAVVAS, D. G., DANA, R., & DOHLMAN, C. H. (2014). Alkali Burn to the Eye. *Cornea*, 33(4), 382–389.

CHOI, J. S. A. C. K. J. (2013). " Wakayama symposium: New therapies for modulation of epithelialization in corneal wound healing." **Ocul Surf** 11: 16-18.

COCCHIETTO, M.;N. SKERT;P. L. NIMIS AND G. SAVA (2002). "A review on usnic acid, an interesting natural compound." **Naturwissenschaften** 89(4): 137-146.

CUNHA, R. B.;R. C. SIQUEIRA;A. MESSIAS;I. U. SCOTT;S. L. FIALHO;A. D. S. CUNHA-JUNIOR AND R. JORGE (2018). "Safety and feasibility of a novel 25-gauge biodegradable implant of dexamethasone for treatment of macular edema associated with retinal vein occlusion: A phase i clinical trial." **Retin Cases Brief Rep** 12(1): 50-58.

DA SILVA, G. R.;T. H. LIMA;R. L. OREFICE;G. M. FERNANDES-CUNHA;A. SILVA-CUNHA;M. ZHAO AND F. BEHAR-COHEN (2015). "In vitro and in vivo ocular biocompatibility of electrospun poly(varepsilon-caprolactone) nanofibers." **Eur J Pharm Sci** 73: 9-19.

DA SILVA SANTOS N. P. S., NASCIMENTO S. C., WANDERLEY M. S. O., et al. (2006) Nanoencapsulation of usnic acid: improvement on the antitumour activity and reduction of hepatotoxicity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 64(2):154–160.

DE CARVALHO, E. A.;P. P. ANDRADE;N. H. SILVA;E. C. PEREIRA AND R. C. FIGUEIREDO (2005). "Effect of usnic acid from the lichen *cladonia substellata* on *trypanosoma cruzi* in vitro: An ultrastructural study." **Micron** 36(2): 155-161.

DE MELO COSTA, A. C. S. (2016). Estudo clínico piloto do efeito de membranas de gelatina contendo ácido úsnico incorporado em lipossomas no processo de cicatrização de queimaduras. Dissertação de doutorado. Universidade Federal de Sergipe.

DELMONTE, D. W. AND T. KIM (2011). "Anatomy and physiology of the cornea." **J Cataract Refract Surg** 37(3): 588-598.

DI GIROLAMO, N.;S. BOBBA;V. RAVIRAJ;N. C. DELIC;I. SLAPETOVA;P. R. NICOVICH;G. M. HALLIDAY;D. WAKEFIELD;R. WHAN AND J. G. LYONS (2015). "Tracing the fate of limbal epithelial progenitor cells in the murine cornea." **Stem Cells** 33(1): 157-169.

DIAS, M. F.;B. C. P. FIGUEIREDO;J. TEIXEIRA-NETO;M. C. A. GUERRA;S. L. FIALHO AND A. SILVA CUNHA (2018). "In vivo evaluation of antitumoral and antiangiogenic effect of imiquimod-loaded polymeric nanoparticles." **Biomed Pharmacother** 103: 1107-1114.

DIMITRIPULOU, C. E. A. (1998). "The vascular architecture of the chick chorioallantoic membrane: Sequential quantitative evaluation using corrosion casting. Angiogenesis." 2: 255-263.

DRAUT, H.;T. REHM;G. BEGEMANN AND R. SCHOBERT (2017). "Antiangiogenic and toxic effects of genistein, usnic acid, and their copper complexes in zebrafish embryos at different developmental stages." **Chem Biodivers** 14(3).

DUA, H. S.;J. A. GOMES AND A. SINGH (1994). "Corneal epithelial wound healing." **Br J Ophthalmol** 78(5): 401-408.

EINARSDÓTTIR E., GROENEWEG J., BJÖRNSDÓTTIR G. G., et al. (2010) Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Medica*. 76(10):969–974.

ESLANI, M., A. BARADARAN-RAFII, A. MOVAHEDAN AND A. R. DJALILIAN (2014). "The ocular surface chemical burns." **Journal of Ophthalmology**.

FABIANO, A.;P. CHETONI AND Y. ZAMBITO (2015). "Mucoadhesive nano-sized supramolecular assemblies for improved pre-corneal drug residence time." **Drug Dev Ind Pharm** 41(12): 2069-2076.

FERREIRA, A. E.;B. F. CASTRO;L. C. VIEIRA;G. D. CASSALI;C. M. SOUZA;G. O. FULGENCIO;E. AYRES;R. L. OREFICE;R. JORGE;A. SILVA-CUNHA AND S. L. FIALHO (2017). "Antiangiogenic activity of a bevacizumab-loaded polyurethane device in animal neovascularization models." **J Fr Ophtalmol** 40(3): 202-208.

FIALHO, S. L. AND S. CUNHA JUNIOR ADA (2007). "[drug delivery systems for the posterior segment of the eye: Fundamental basis and applications]." **Arq Bras Oftalmol** 70(1): 173-179.

FIALHO, S. L. E. A. (2003). "Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular." **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia** **66**: 891-896.

FIALHO, S. L. E. A. (2003). "Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular." **Arq. Bras. Oftalmol** **66**: 891-896.

FISH, R. AND R. S. DAVIDSON (2010). "Management of ocular thermal and chemical injuries, including amniotic membrane therapy." **Curr Opin Ophthalmol** **21**(4): 317-321.

FORTI, F. L.;G. GOISSIS AND A. M. PLEPIS (2006). "Modifications on collagen structures promoted by 1,4-dioxane improve thermal and biological properties of bovine pericardium as a biomaterial." **J Biomater Appl** **20**(3): 267-285.

FRANCOLINI, I.;V. TARESCO;F. CRISANTE;A. MARTINELLI;L. D'ILARIO AND A. PIOZZI (2013). "Water soluble usnic acid-polyacrylamide complexes with enhanced antimicrobial activity against staphylococcus epidermidis." **Int J Mol Sci** **14**(4): 7356-7369.

FRICK, K. D. AND A. FOSTER (2003). "The magnitude and cost of global blindness: An increasing problem that can be alleviated." **Am J Ophthalmol** **135**(4): 471-476.

GIESE, M. J. AND R. C. SPETH (2014). "The ocular renin-angiotensin system: A therapeutic target for the treatment of ocular disease." **Pharmacol Ther** **142**(1): 11-32.

GOMES, F. S.;V. SPINOLA CDE;H. A. RIBEIRO;M. T. LOPES;G. D. CASSALI AND C. E. SALAS (2010). "Wound-healing activity of a proteolytic fraction from carica candamarcensis on experimentally induced burn." **Burns** **36**(2): 277-283.

GORE, A.;V. HORWITZ;M. COHEN;H. GUTMAN;L. COHEN;R. GEZ;T. KADAR AND S. DACHIR (2018). "Successful single treatment with ziv-aflibercept for existing corneal neovascularization following ocular chemical insult in the rabbit model." **Exp Eye Res** **171**: 183-191.

GRIFFITH, G. L.;B. WIROSTKO;H. K. LEE;L. E. CORNELL;J. S. MCDANIEL;D. O. ZAMORA AND A. J. JOHNSON (2018). "Treatment of corneal chemical alkali burns with a crosslinked thiolated hyaluronic acid film." **Burns** **44**(5): 1179-1186.

GUPTA, V. K.;S. VERMA;S. GUPTA;A. SINGH;A. PAL;S. K. SRIVASTAVA;P. K. SRIVASTAVA;S. C. SINGH AND M. P. DAROKAR (2012). "Membrane-damaging potential of natural l-(-)-usnic acid in staphylococcus aureus." **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** **31**(12): 3375-3383.

HARING, R. S.;I. D. SHEFFIELD;R. CHANNA;J. K. CANNER AND E. B. SCHNEIDER (2016). "Epidemiologic trends of chemical ocular burns in the united states." **JAMA Ophthalmol** **134**(10): 1119-1124.

HEILBRONN, C. M.;P. F. SVIDER;A. J. FOLBE;M. A. SHKOUKANI;M. A. CARRON;J. A. ELOY AND G. ZULIANI (2015). "Burns in the head and neck: A national representative analysis of emergency department visits." **Laryngoscope** **125**(7): 1573-1578.

HELARY, C.;L. OVTRACHT;B. COULOMB;G. GODEAU AND M. M. GIRAUD-GUILLE (2006). "Dense fibrillar collagen matrices: A model to study myofibroblast behaviour during wound healing." **Biomaterials** **27**(25): 4443-4452.

HONDA, N. K.;F. R. PAVAN;R. G. COELHO;S. R. DE ANDRADE LEITE;A. C. MICHELETTI;T. I. LOPES;M. Y. MISUTSU;A. BEATRIZ;R. L. BRUM AND C. Q. LEITE (2010). "Antimycobacterial activity of lichen substances." **Phytomedicine** **17**(5): 328-332.

HONG, J.;T. QIU;A. WEI;X. SUN AND J. XU (2010). "Clinical characteristics and visual outcome of severe ocular chemical injuries in shanghai." **Ophthalmology** **117**(12): 2268-2272.

HUANG Z., ZHENG G., TAO J., RUAN J. (2011) Anti-inflammatory effects and mechanisms of usnic acid. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* **26**(5):955–959.

IGARASHI, J.;N. FUKUDA;T. INOUE;S. NAKAI;K. SAITO;K. FUJIWARA;H. MATSUDA;T. UENO;Y. MATSUMOTO;T. WATANABE;H. NAGASE;T. BANDO;H. SUGIYAMA;T. ITOH AND M. SOMA (2015). "Preclinical study of novel gene silencer pyrrole-imidazole polyamide targeting human tgf-beta1 promoter for hypertrophic scars in a common marmoset primate model." **PLoS One** **10**(5): e0125295.

JARVINEN, K. E. A. (1995). "Ocular absorption following topical delivery." **Advanced Drug Delivery Reviews** **16**: 3-19.

JEON, K. I.;A. KULKARNI;C. F. WOELLER;R. P. PHIPPS;P. J. SIME;H. B. HINDMAN AND K. R. HUXLIN (2014). "Inhibitory effects of ppargamma ligands on tgf-beta1-induced corneal myofibroblast transformation." **Am J Pathol** **184**(5): 1429-1445.

JESTER, J. V.;D. BROWN;A. PAPPA AND V. VASILIOU (2012). "Myofibroblast differentiation modulates keratocyte crystallin protein expression, concentration, and cellular light scattering." **Invest Ophthalmol Vis Sci** 53(2): 770-778.

KANE C, C. J., DIAS P, CAMELLITI P, YACoub M, TERRACCIANO C (2014). "Cardiomyocytes influence fibroblast proliferation and α -smooth muscle actin expression via the secretion of paracrine mediators." **Heart** 100(Suppl 1): A6–7.

KAUR, I. P. AND M. KANWAR (2002). "Ocular preparations: The formulation approach." **Drug Dev Ind Pharm** 28(5): 473-493.

KIMURA, H. O., Y. (2001). "Biodegradable polymers for ocular drug delivery." **KIMURA, H.; OGURA, Y.** 215(3): 143-155.

KOCABA, V.;O. DAMOUR;C. AUXENFANS AND C. BURILLON (2018). "[corneal endothelial cell therapy, a review]." **J Fr Ophthalmol**.

KOMPELLA, U. B.;A. C. AMRITE;R. PACHA RAVI AND S. A. DURAZO (2013). "Nanomedicines for back of the eye drug delivery, gene delivery, and imaging." **Prog Retin Eye Res** 36: 172-198.

KOUTSILIERI, E.;A. RETHWILM AND C. SCHELLER (2007). "The therapeutic potential of sirna in gene therapy of neurodegenerative disorders." **J Neural Transm Suppl**(72): 43-49.

KUCKELKORN, R.;I. LUFT;A. A. KOTTEK;N. F. SCHRAGE;W. MAKROPOULOS AND M. REIM (1993). "[chemical and thermal eye burns in the residential area of rwth aachen. Analysis of accidents in 1 year using a new automated documentation of findings]." **Klin Monbl Augenheilkd** 203(1): 34-42.

KUCKELKORN, R.;N. SCHRAGE;G. KELLER AND C. REDBRAKE (2002). "Emergency treatment of chemical and thermal eye burns." **Acta Ophthalmol Scand** 80(1): 4-10.

KRISTMUNDSDÓTTIR T., JÓNSDÓTTIR E., ÖGMUNDSDÓTTIR H. M., INGÓLFSDÓTTIR K. (2005) Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 24(5):539–543.

KWIATKOWSKI, A. (1985). "Experimental method of claud bernard and its current importance for research studies in medicine." **Arch Hist Med (Warsz)** 48(2): 167-182.

LE, Q.;Y. CHEN;X. WANG;Y. LI;J. HONG AND J. XU (2011). "Vision-related quality of life in patients with ocular chemical burns." **Invest Ophthalmol Vis Sci** 52(12): 8951-8956.

LIMA, B. D. S. (2017). **Estudos de liberação, permeação, adesão e estabilidade de membranas de gelatina contendo ácido úsnico na forma lipossomal para o tratamento de queimaduras**. Master Dissertação, Universidade Federal de Sergipe.

LIN, H.;Y. LIU;S. P. KAMBHAMPATI;C. C. HSU;R. M. KANNAN AND S. C. YIU (2018). "Subconjunctival dendrimer-drug therapy for the treatment of dry eye in rabbits with induced autoimmune dacryoadenitis." **Ocul Surf**.

LIN, H. F.;Y. C. LAI;C. F. TAI;J. L. TSAI;H. C. HSU;R. F. HSU;S. N. LU;N. H. FENG;C. Y. CHAI AND C. H. LEE (2013). "Effects of cultured human adipose-derived stem cells transplantation on rabbit cornea regeneration after alkaline chemical burn." **Kaohsiung J Med Sci** 29(1): 14-18.

LJUBIMOV, A. V. AND M. SAGHIZADEH (2015). "Progress in corneal wound healing." **Prog Retin Eye Res** 49: 17-45.

LOSS, M.;V. WEDLER;W. KUNZI;C. MEULI-SIMMEN AND V. E. MEYER (2000). "Artificial skin, split-thickness autograft and cultured autologous keratinocytes combined to treat a severe burn injury of 93% of tbsa." **Burns** 26(7): 644-652.

MAHALING, B. AND D. S. KATTI (2016). "Understanding the influence of surface properties of nanoparticles and penetration enhancers for improving bioavailability in eye tissues in vivo." **Int J Pharm** 501(1-2): 1-9.

MAIA, A. L. C.;C. A. FERREIRA;A. L. B. BARROS;E. S. ATM;G. A. RAMALDES;A. D. SILVA CUNHA JUNIOR;D. C. P. OLIVEIRA;C. FERNANDES AND D. C. FERREIRA SOARES (2017). "Vincristine-loaded hydroxyapatite nanoparticles as a potential delivery system for bone cancer therapy." **J Drug Target**: 1-12.

MANOJLOVIC, N. T.;P. J. VASILJEVIC;P. Z. MASKOVIC;M. JUSKOVIC AND G. BOGDANOVIC-DUSANOVIC (2012). "Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen umbilicaria cylindrica (l.) delise (umbilicariaceae)." **Evid Based Complement Alternat Med** 2012: 452431.

MASHIGE, K. (2016). "Chemical and thermal ocular burns: A review of causes, clinical features and management protocol." **South African Family Practice** 58: 1-4.

MEAD MD, C. K. (1994). **Evaluation and initial management of patients with ocular and adnexal trauma. Principles and practice of ophthalmology**. Philadelphia, WB Saunders.

MEEK, K. M. AND C. BOOTE (2004). "The organization of collagen in the corneal stroma." **Exp Eye Res** 78(3): 503-512.

MELLO, G. H.;F. G. LUPION;F. M. OLIVEIRA;L. R. BUDE;D. WASILEWESKI;T. C. CAVALCANTI AND H. MOREIRA (2011). "[effect of subconjunctival bevacizumab on corneal neovascularization and reepithelization 25 days after chemical burn]." **Arq Bras Oftalmol** 74(1): 48-52.

MENCUCCI, R., E. FAVUZZA, C. BOCCALINI, A. LAPUCCI, R. FELICI, F. RESTA, A. CHIARUGI AND L. CAVONE (2014). "Coq10-containing eye drops prevent uvb-induced cornea cell damage and increase cornea wound healing by preserving mitochondrial function." **Invest Ophthalmol Vis Sci** 55: 7266–7271.

MENCUCCI, R.;E. FAVUZZA;C. BOCCALINI;A. LAPUCCI;R. FELICI;F. RESTA;A. CHIARUGI AND L. CAVONE (2014). "Coq10-containing eye drops prevent uvb-induced cornea cell damage and increase cornea wound healing by preserving mitochondrial function." **Invest Ophthalmol Vis Sci** 55(11): 7266-7271.

MERLE, H.;M. GERARD AND N. SCHRAGE (2008). "[ocular burns]." **J Fr Ophthalmol** 31(7): 723-734.

MILTON, R.;L. MATHIEU;A. H. HALL AND H. I. MAIBACH (2010). "Chemical assault and skin/eye burns: Two representative cases, report from the acid survivors foundation, and literature review." **Burns** 36(6): 924-932.

MORGAN, S. J. (1987). "Chemical burns of the eye: Causes and management." **Br J Ophthalmol** 71(11): 854-857.

MULLER, L. J.;E. PELS;L. R. SCHURMANS AND G. F. VRENSSEN (2004). "A new three-dimensional model of the organization of proteoglycans and collagen fibrils in the human corneal stroma." **Exp Eye Res** 78(3): 493-501.

NETTO, M. V.;R. R. MOHAN;R. AMBROSIO, JR.;A. E. HUTCHEON;J. D. ZIESKE AND S. E. WILSON (2005). "Wound healing in the cornea: A review of refractive surgery complications and new prospects for therapy." **Cornea** 24(5): 509-522.

NICOLOSI, J. G. M., A. M. (2005). **Biomateriais destinados à terapia de queimaduras: Estudo entre o custo e o potencial de efetividade de curativos avançados**, VI Cobeq. .

NORRBY, K. (2006). "In vivo models of angiogenesis." **J Cell Mol Med** 10(3): 588-612.

NOWAK-SLIWINSKA, P., J. P. BALLINI, G. WAGNIERES AND H. VAN DEN BERGH (2010). "Processing of fluorescence angiograms for the quantification of vascular effects induced by antiangiogenic agents in the cam model." **Microvasc Res** 79: 21-28.

NUNES, P. S.;R. L. ALBUQUERQUE, JR.;D. R. CAVALCANTE;M. D. DANTAS;J. C. CARDOSO;M. S. BEZERRA;J. C. SOUZA;M. R. SERAFINI;L. J. QUITANS, JR.;L. R. BONJARDIM AND A. A. ARAUJO (2011). "Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing." **J Biomed Biotechnol** 2011: 761593.

NUNES, P. S.;A. S. RABELO;J. C. SOUZA;B. V. SANTANA;T. M. DA SILVA;M. R. SERAFINI;P. DOS PASSOS MENEZES;B. DOS SANTOS LIMA;J. C. CARDOSO;J. C. ALVES;L. A. FRANK;S. S. GUTERRES;A. R. POHLMANN;M. S. PINHEIRO;R. L. J. DE ALBUQUERQUE AND A. A. ARAUJO (2016). "Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model." **Int J Pharm** 513(1-2): 473-482.

NUNES, P. S. B., M. S. ; COSTA, L. P. ; CARDOSO, J. C. ; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L. C. ; BARIN, G. B. ; SILVA, F. A. ; ARAUJO, A. A. S. (2010). "Thermal characterization of usnic acid/collagen-based films." **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry** 99: 1011-1014.

NUNES, P. S. J., D.C.; BEZERRA, M.S.; SOUZA, J.C.C.; SILVA, F.A.; SERAFINI, M.R.; LIMA, B.S.; SHANMUGAM, S.; JUNIOR, R.L.C.A.; ARAÚJO, A.A.S. (2015). "Validation of a uv-vis spectrophotometric method for the determination of usnic acid /collagen-based membranes." **Scientia Plena** 11(9).

OH, J. Y.;J. H. KO;M. K. KIM AND W. R. WEE (2014). "Effects of mesenchymal stem/stromal cells on cultures of corneal epithelial progenitor cells with ethanol injury." **Invest Ophthalmol Vis Sci** 55(11): 7628-7635.

OYDANICH, M. K.;S. P. EPSTEIN;N. GADARIA-RATHOD;J. J. GUERS;K. B. FERNANDEZ AND P. A. ASBELL (2018). "In vivo efficacy of histatin-1 in a rabbit animal model." **Curr Eye Res**.

PASCOLINI, D. AND S. P. MARIOTTI (2012). "Global estimates of visual impairment: 2010." **Br J Ophthalmol** 96(5): 614-618.

PECK, M. D. (2012). "Epidemiology of burns throughout the world. Part ii: Intentional burns in adults." **Burns** **38**(5): 630-637.

PFISTER, R. R. (1983). "Chemical injuries of the eye." **Ophthalmology** **90**(10): 1246-1253.

RABELO T. K., ZEIDÁN-CHULIÁ F., VASQUES L. M., et al. (2012) Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y) Toxicology in Vitro.26(2):304–314.

RENEKER, L. W.;A. BLOCH;L. XIE;P. A. OVERBEEK and J. D. ASH (2010). "Induction of corneal myofibroblasts by lens-derived transforming growth factor beta1 (tgfbeta1): A transgenic mouse model." **Brain Res Bull** **81**(2-3): 287-296.

RIBATTI, D. (2010). "The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo assay to study antiangiogenesis." **Pharmaceuticals (Basel)** **3**(3): 482-513.

RIBATTI, D. (2017). "The chick embryo chorioallantoic membrane (cam) assay." **Reprod Toxicol** **70**: 97-101.

RIBATTI, D.;B. NICO;A. VACCA;L. RONCALI;P. H. BURRI AND V. DJONOV (2001). "Chorioallantoic membrane capillary bed: A useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo." **Anat Rec** **264**(4): 317-324.

SAW, C. L.;P. W. HENG AND C. V. LIEW (2008). "Chick chorioallantoic membrane as an in situ biological membrane for pharmaceutical formulation development: A review." **Drug Dev Ind Pharm** **34**(11): 1168-1177.

SEGATORE, B.;P. BELLIO;D. SETACCI;F. BRISDELLI;M. PIOVANO;J. A. GARBARINO;M. NICOLETTI;G. AMICOSANTE;M. PERILLI AND G. CELENZA (2012). "In vitro interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant staphylococcus aureus clinical isolates determined by fici and deltae model methods." **Phytomedicine** **19**(3-4): 341-347.

SEIDLITZ, E.;D. KORBIE;L. MARIEN;M. RICHARDSON AND G. SINGH (2004). "Quantification of anti-angiogenesis using the capillaries of the chick chorioallantoic membrane demonstrates that the effect of human angiostatin is age-dependent." **Microvasc Res** **67**(2): 105-116.

SHAH, S. S.;L. V. DENHAM;J. R. ELISON;P. S. BHATTACHARJEE;C. CLEMENT;T. HUQ AND J. M. HILL (2010). "Drug delivery to the posterior segment of the eye for pharmacologic therapy." **Expert Rev Ophthalmol** **5**(1): 75-93.

SHAO Y, ZHANG Y, YU Y, XU TT, WEI R, ZHOU Q. Impact of catalpol on retinal ganglion cells in diabetic retinopathy. *Int J Clin Exp Med*. 2016;9:17274–17280.

SHARMA, N.;M. KAUR;T. AGARWAL;V. S. SANGWAN AND R. B. VAJPAYEE (2018). "Treatment of acute ocular chemical burns." **Surv Ophthalmol** 63(2): 214-235.

SILVA, C. R.;K. S. MARINHO;T. D. SILVA;D. K. FERREIRA;G. M. AGUIAR;M. C. MARTINS;K. R. SANTOS;F. C. AGUIAR JUNIOR;N. P. SANTOS;E. C. PEREIRA AND N. H. SILVA (2017). "Teratogenic effect of usnic acid from cladonia substellata vainio during organogenesis." **Biomed Res Int** 2017: 5948936.

SINGH, P.;M. TYAGI;Y. KUMAR;K. K. GUPTA AND P. D. SHARMA (2013). "Ocular chemical injuries and their management." **Oman J Ophthalmol** 6(2): 83-86.

SINGH, V.;A. A. TORRICELLI;N. NAYEB-HASHEMI;V. AGRAWAL AND S. E. WILSON (2013). "Mouse strain variation in sma(+) myofibroblast development after corneal injury." **Exp Eye Res** 115: 27-30.

SONG, Y.;F. DAI;D. ZHAI;Y. DONG;J. ZHANG;B. LU;J. LUO;M. LIU AND Z. YI (2012). "Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing vegfr2-mediated akt and erk1/2 signaling pathways." **Angiogenesis** 15(3): 421-432.

SPANIEL-BOROWSKI, K. (1989). "The chick chorioallantoic membrane as test system for biocompatible materials." **Res Exp Med (Berl)** 189(1): 69-75.

SRINIVAS, S. P.;A. GOYAL;D. P. TALELE;S. MAHADIK;R. R. SUDHIR;P. P. MURTHY;S. RANGANATH;U. B. KOMPELLA AND P. PADMANABHAN (2018). "Corneal epithelial permeability to fluorescein in humans by a multi-drop method." **PLoS One** 13(6): e0198831.

SRIRAM S, G. D., ROBINSON P, TULI S, LEWIN AS, SCHULTZ G. (2013). "Reduction of corneal scarring in rabbits by targeting the tgfb1 pathway with a triple sirna combination." **Adv Biosci Biotechnol** 4(10): 47–55.

STATON, C. A.;S. M. STRIBBLING;S. TAZZYMAN;R. HUGHES;N. J. BROWN AND C. E. LEWIS (2004). "Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo." **Int J Exp Pathol** 85(5): 233-248.

SU Z-Q, et al., (2014). Usnic acid protects LPS-induced acute lung injury in mice through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. *Inter Immunopharmacology* 22: 371–378.

SUKATI VN, H. R. (2013). "Characteristics of eye injuries in urban kwazulu-natal province, south africa: 2005–2008. ." **S Afr Optom.** **72**(3): 119-126.

SULTANA, Y.;R. JAIN;M. AQIL and A. ALI (2006). "Review of ocular drug delivery." **Curr Drug Deliv** **3**(2): 207-217.

SUN, Y.;C. S. CHEN and J. FU (2012). "Forcing stem cells to behave: A biophysical perspective of the cellular microenvironment." **Annu Rev Biophys** **41**: 519-542.

TOVEY J, G. K., GIULIANO EA, SIDDIQUI S, SHARMA A, BROOKE JL, et al. (2014). "Role of cellular kinases and smads in the modulation of saha-mediated corneal fibrosis inhibition." **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **55**(13): 5147.

USTAOGU, M., N. SOLMAZ AND F. ONDER (2017). "Ocular surface chemical injury treated by regenerating agent (rgta, caticol20)." **GMS Ophthalmology Cases** **7**: 1-4.

VALDES, T. I.;D. KREUTZER AND F. MOUSSY (2002). "The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials." **J Biomed Mater Res** **62**(2): 273-282.

VARGAS, A.;M. ZEISSER-LABOUEBE;N. LANGE;R. GURNY AND F. DELIE (2007). "The chick embryo and its chorioallantoic membrane (cam) for the in vivo evaluation of drug delivery systems." **Adv Drug Deliv Rev** **59**(11): 1162-1176.

VERHAEGEN, P. D.;P. P. VAN ZUIJLEN;N. M. PENNING;J. VAN MARLE;F. B. NIESSEN;C. M. VAN DER HORST AND E. MIDDELKOOP (2009). "Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis." **Wound Repair Regen** **17**(5): 649-656.

VIJAYAKUMAR, C. S.;S. VISWANATHAN;M. K. REDDY;S. PARVATHAVARTHINI;A. B. KUNDU AND E. SUKUMAR (2000). "Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid." **Fitoterapia** **71**(5): 564-566.

VILAR, G.;J. TULLA-PUCHE AND F. ALBERICIO (2012). "Polymers and drug delivery systems." **Curr Drug Deliv** **9**(4): 367-394.

WAGONER, M. D. (1997). "Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and therapy." **Surv Ophthalmol** **41**(4): 275-313.

WANG, Y.;I. E. KOICHEVAR;R. W. REDMOND AND M. YAO (2011). "A light-activated method for repair of corneal surface defects." **Lasers Surg Med** **43**(6): 481-489.

WECKESSER S., ENGEL K., SIMON-HAARHAUS B., WITTMER A., PELZ K., SCHEMPP C. M. (2007) Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*.14(7-8):508–516.

WEST, J. D.;N. J. DORA AND J. M. COLLINSON (2015). "Evaluating alternative stem cell hypotheses for adult corneal epithelial maintenance." **World J Stem Cells** 7(2): 281-299.

WHITE, M. L.;J. CHODOSH;J. JANG AND C. DOHLMAN (2015). "Incidence of stevens-johnson syndrome and chemical burns to the eye." **Cornea** 34(12): 1527-1533.

WILLIAMSON, F. (1972). "In a troubled community." **Nurs Times** 68(52): 1638-1641.

WILSON, S. A. AND A. LAST (2004). "Management of corneal abrasions." **Am Fam Physician** 70(1): 123-128.

WILSON, S. E.;R. R. MOHAN;R. R. MOHAN;R. AMBROSIO, JR.;J. HONG AND J. LEE (2001). "The corneal wound healing response: Cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells." **Prog Retin Eye Res** 20(5): 625-637.

YANG, Z.;J. LIU;J. GAO;S. CHEN AND G. HUANG (2015). "Chitosan coated vancomycin hydrochloride liposomes: Characterizations and evaluation." **Int J Pharm** 495(1): 508-515.

YASUKAWA, T.;Y. OGURA;Y. TABATA;H. KIMURA;P. WIEDEMANN AND Y. HONDA (2004). "Drug delivery systems for vitreoretinal diseases." **Prog Retin Eye Res** 23(3): 253-281.

ZAGELBAUM, B. M.;J. R. TOSTANOSKI;D. J. KERNER AND P. S. HERSH (1993). "Urban eye trauma. A one-year prospective study." **Ophthalmology** 100(6): 851-856.

ZHANG, W.;L. NIE;L. DU;W. CHEN;Z. WU AND Y. JIN (2017). "Topical treatment of corneal alkali burns with gly-thymosin beta4 solutions and in situ hydrogels via inhibiting corneal neovascularization and improving corneal epidermal recovery in experimental rabbits." **Burns** 43(8): 1742-1747.

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da toxicidade e da atividade de filme à base de colágeno contendo ácido úsnico em modelo de cicatrização da córnea de coelhos", protocolo do CEUA: 93/2018 sob a responsabilidade de Armando da Silva Cunha Junior que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 07/05/2018.

Vigência da Autorização	07/05/2018 a 06/05/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	4
Peso/Idade	2kg / 3(meses)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda Experimental da Escola de Veterinária da UFMG
*Espécie/linhagem	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	4
Peso/Idade	2kg / 3(meses)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda Experimental da Escola de Veterinária da UFMG
*Espécie/linhagem	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	4
Peso/Idade	2kg / 3(meses)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda Experimental da Escola de Veterinária da UFMG

Considerações posteriores:

07/05/2018	Aprovado na reunião do dia 07/05/2018. Validade: 07/05/2018 à 06/05/2023
------------	--

Belo Horizonte, 05/06/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO II

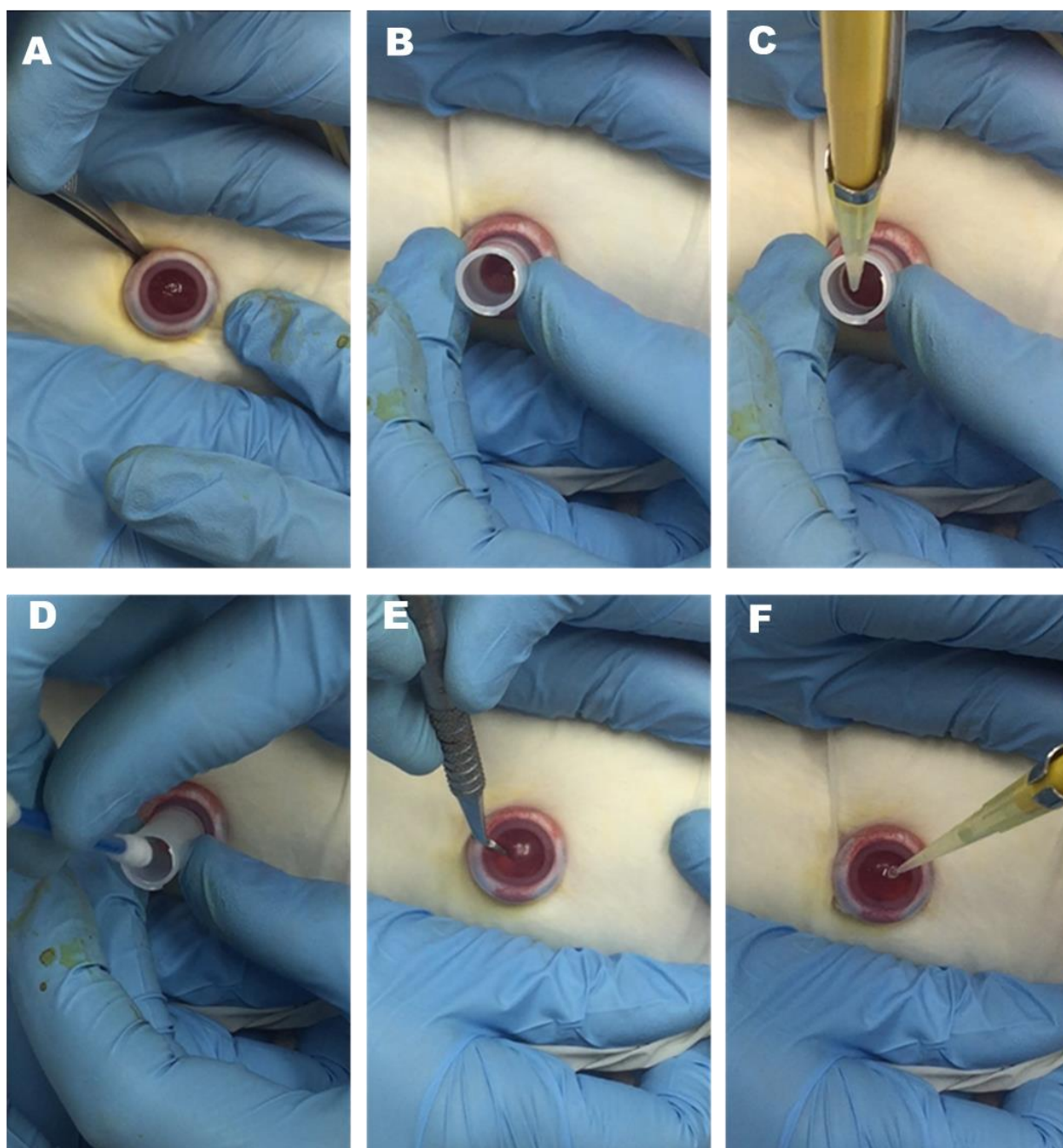


Figura 18: Metodologia da lesão de queimadura corneana (A) Exposição do globo ocular (B) Aplicador com 1cm de diâmetro para contenção do etanol na córnea (C) Exposição ao Etanol absoluto (D) Absorção do excesso de Etanol após 30 segundos de exposição (E) Desbridamento mecânico (F) Instilação de PBS a 0,5%.

ANEXO III

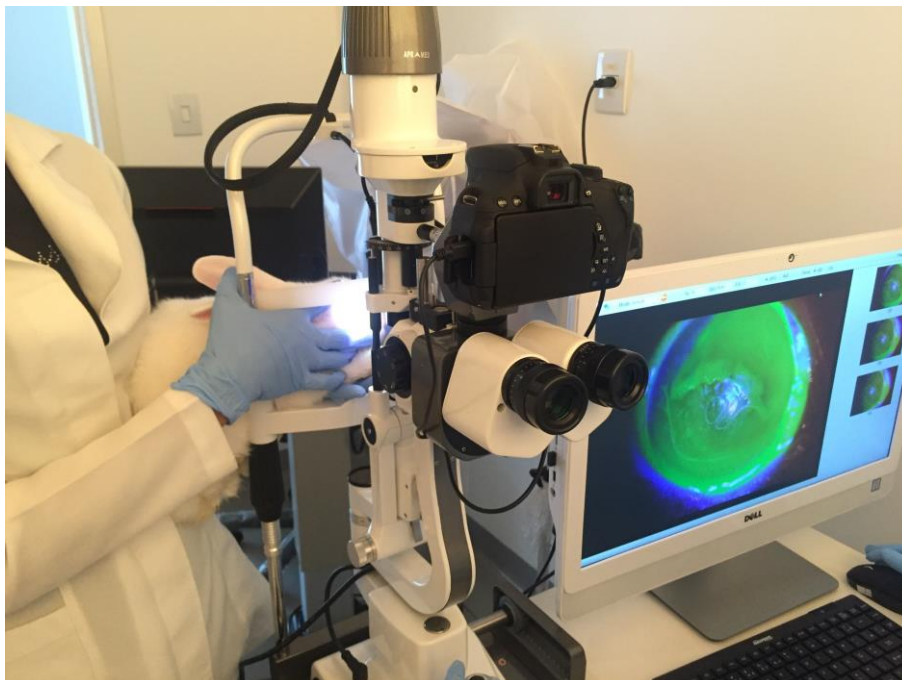


Figura 19: Posição do examinador para registro de imagem obtidas através do microscópio lâmpada de fenda.

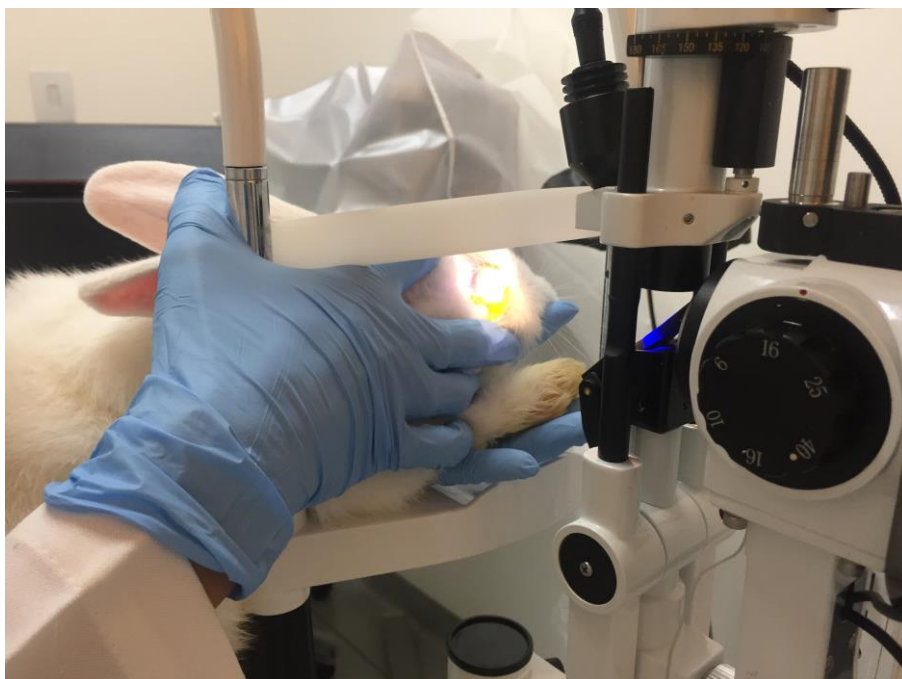


Figura 20: Posição do animal para obtenção da foto através do microscópio de lâmpada de fenda.

ANEXO IV



Figura 21: Corte para avaliação histológica do epitélio corneano