



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA E CIÊNCIAS VISUAIS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA OFTÁLMICA



Helder Luiz Bachiega

**ESTRUTURAÇÃO E PLANEJAMENTO DO
DESENVOLVIMENTO DE UM SUBSTITUTO DE HUMOR
VÍTREO, A PARTIR DE MATRIZES POLIMÉRICAS**

Trabalho de Produção Intelectual
apresentado à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, como requisito parcial para
obtenção do título de Tecnólogo
Oftálmico

São Paulo

2021

Helder Luiz Bachiega

**ESTRUTURAÇÃO E PLANEJAMENTO DO
DESENVOLVIMENTO DE UM SUBSTITUTO DE HUMOR
VÍTREO, A PARTIR DE MATRIZES POLIMÉRICAS**

Trabalho de Produção Intelectual
apresentado à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, como requisito parcial para
obtenção do título de Tecnólogo
Oftálmico

Orientadora:

Prof^a. Dra. Patrícia Alessandra Bersanetti

Supervisor:

Prof. Dr. Octaviano Magalhães Júnior

São Paulo

2021

Bachiega, Helder Luiz

Estruturação e planejamento do desenvolvimento de um substituto de humor vítreo, a partir de matrizes poliméricas / Helder Luiz Bachiega. – São Paulo, 2021.

XI, 43f.

Trabalho de conclusão de curso (graduação em Tecnologia Oftálmica) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 2021.

Structuring and planning the development of a vitreous humor substitute, based on polymeric matrices.

Helder Luiz Bachiega

**ESTRUTURAÇÃO E PLANEJAMENTO DO
DESENVOLVIMENTO DE UM SUBSTITUTO DE HUMOR
VÍTREO, A PARTIR DE MATRIZES POLIMÉRICAS**

Apresentada em 25 de fevereiro de 2021

Presidente da Banca

Prof^a. Dra. Norma Allemann

Banca Examinadora

Dedicatória

Eu dedico esse trabalho a minha mãe e irmã e a todas as pessoas que colaboraram para a realização deste trabalho de conclusão de curso. Muito grato.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Patrícia Alessandra Bersanetti, por conduzir o meu trabalho de pesquisa e essencial para o término do trabalho.

Ao meu supervisor Prof. Dr. Octaviano Magalhães Júnior, por aceitar o convite de supervisor e colaboração.

A Profa. Dra. Andreia de Araujo Morandim Giannetti do Centro Universitário FEI, pela colaboração na realização do trabalho.

A Paula de Araujo Silverio que foi primordial para a realização deste trabalho, e sempre esteve ao meu lado nas realizações dos projetos.

Ao aluno doutorado Ramon Antunes, por ceder os resultados do seu trabalho e ao aluno doutorando José Carlos Andrade Neto pela colaboração.

A todos os docentes do departamento de oftalmologia e ciências visuais que colaboraram com a minha formação acadêmica.

Ao laboratório LITS, todos que conheci e ao Prof. Dr. Vagner Rogerio do Santos.

Ao grupo PET Tecnologias e a Prof.^a Dra. Raquel Santos Marques de Carvalho.

Aos amigos que fiz durante todos esses anos na UNIFESP.

SUMÁRIO

Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
SUMÁRIO	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	iv
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Sistema Visual	12
1.2 Corpo Vítreo	13
1.2.1 Embriologia do corpo vítreo	14
1.2.2 Propriedades bioquímicas e físicas do corpo vítreo	16
1.2.3 Envelhecimento do corpo vítreo	17
1.2.4 Cirurgia de vitrectomia	18
1.3 Biomateriais	19
1.3.1 Polímeros e Hidrogéis	20
1.3.2 Hidrogéis como Substitutos Vítreos	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MÉTODOS	25
3.1 Obtenção dos hidrogéis	25
3.2 Planejamento experimental para síntese dos hidrogéis	25
3.3 Análise da viscosidade dos hidrogéis	28
3.4 Obtenção de filmes dos hidrogéis e caracterização por DSC	28
3.5 Ensaio de Citotoxicidade	29
4 RESULTADOS ESPERADOS	31
4.1 Obtenção de hidrogéis para serem testados como substituto vítreo em coelhos	31
4.2 Planejamento experimental para síntese dos hidrogéis	33
4.3 Análise da viscosidade dos hidrogéis	35
4.4 Ensaio de Citotoxicidade	35
5 CONCLUSÃO	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

Lista de Figuras

Figura 1: Sistema visual central.....	12
Figura 2: Estruturas anatômicas do olho humano.....	13
Figura 3: Delimitação do humor vítreo.....	14
Figura 4: Desenvolvimento ontogenético do olho vertebrados.....	15
Figura 5: Representação do vítreo primário e do vítreo secundário.....	15
Figura 6: Degeneração pela idade devido a liquefação do vítreo e agregação.....	18
Figura 7: Planejamento utilizado durante a realização dos experimentos.....	28
Figura 8: Viscosímetro de cone e placa Brookfield DV3T.....	30
Figura 9: Calorímetro exploratório diferencial Shimadzu DSC60.....	31
Figura 10: Retinografia do fundo do olho de coelho, mostrando opacidade pré-retinal, após 7 dias de aplicação de hidrogel de PVA reticulado com trimetafosfato.....	33
Figura 11: Histologia do tecido da retina do coelho após 30 dias de aplicação de hidrogel de PVA reticulado com trimetafosfato. A) Grupo controle. B) Grupo tratado evidenciando partículas de hidrogel intra retinianas. C) Grupo tratado evidenciando a presença de célula gigante.....	33
Figura 12. Alginato reticulado com ácido cítrico.....	34
Figura 13: Os valores máximo, mínimo e central da quantidade de cada elemento.....	35

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição do Humor Vítreo.....	16
Tabela 2: Características físicas do humor vítreo.....	17
Tabela 3: Exemplos de substitutos do humor vítreo utilizados na cirurgia de vitrectomia.....	19
Tabela 4: Valores das variáveis de entrada para cada condição experimental, proveniente do planejamento DCCR.....	28
Tabela 5: Valores das variáveis codificadas e não codificadas resultantes do planejamento para síntese do hidrogel de metilcelulose. A concentração de matriz polimérica está representada em % e do reticulante pela relação de massa de matriz / massa de reticulante (1 g de matriz /x g de reticulante).....	35
Tabela 6: Valores das variáveis codificadas e não codificadas resultantes do planejamento para síntese do hidrogel de alginato. A concentração de matriz polimérica está representada em % e do reticulante pela relação de massa de matriz / massa de reticulante (1 g de matriz /x g de reticulante).....	36

RESUMO

O campo dos biomateriais engloba o estudo biológico e físico-químico de materiais e suas interações, quando aplicados em sistemas biológicos. Os biomateriais podem ser sintéticos, como ácido polivinílico ou naturais, como colágeno, alginato, celulose, etc. No campo da Oftalmologia, alguns biomateriais na forma de hidrogéis aparecem como possíveis substitutos do humor vítreo, desde que apresentem propriedades físico-químicas semelhantes ao vítreo, sejam atóxicos e não provoquem problemas oculares, como no caso de materiais, como o óleo de silicone. Alguns hidrogéis sintetizados, a partir de matrizes como o PVA reticulado com trimetafosfato de sódio (STMP) apresentam algumas propriedades, como: densidade, viscosidade e índice de refração, compatíveis com o humor vítreo. No entanto, estudos de aplicação *in vivo* em coelhos mostraram alguns inconvenientes, como opacidade do material e formação de grânulos, visualizados por análise histológica. Deste modo, neste trabalho foi realizado o planejamento experimental por DOE para desenvolvimento de um substituto vítreo, a partir de matrizes poliméricas naturais de alginato de sódio e metilcelulose, reticuladas com ácido cítrico ou trimetafosfato de sódio. As variáveis de entrada a serem avaliadas foram: concentração da matriz, concentração do reticulante e pH, gerando através do planejamento fatorial composto central, 16 condições experimentais específicas para obtenção dos materiais, que será realizada sob agitação por 2 h a temperatura ambiente. A faixa de concentração de matriz polimérica será de 0,025 a 1,95%; da relação m/m de reticulante (1 g matriz / X g de reticulante) de 0,95 a 11,05 e o valor de pH de síntese de 3,3 a 11,7. A variável de saída para otimização da melhor condição experimental será a viscosidade dos hidrogéis, as quais serão avaliadas em velocidades rotacionais correspondentes a torques de 10 a 99%. Após o processamento desses resultados pelo programa *Statistica*, será definida a melhor condição de síntese para obtenção dos hidrogéis de alginato e metilcelulose reticulados. Posteriormente, esses materiais serão sintetizados em triplicata nas condições otimizadas e submetidos à caracterização térmica, reológica, etc. Assim, estes experimentos auxiliarão na obtenção de hidrogéis, visando o desenvolvimento de um substituto vítreo, os quais serão testados *in vivo*.

Palavras chaves: Hidrogéis, Planejamento de Experimentos, Polímeros, Reticulação, Substituto vítreo.

ABSTRACT

The field of biomaterials encompasses the biological and physicochemical study of materials and their interactions, when applied to biological systems. Biomaterials can be synthetic, such as polyvinyl acid or natural, such as collagen, alginate, cellulose, etc. In the field of ophthalmology, some biomaterials in the form of hydrogels appear as possible substitutes for vitreous humor, as long as they have physicochemical properties similar to vitreous, are non-toxic and do not cause eye problems, as in the case of materials, such as silicone oil. Some hydrogels synthesized from matrices such as PVA crosslinked with sodium trimetaphosphate (STMP) have some properties, such as: density, viscosity and refractive index, compatible with the vitreous mood. However, in vivo application studies in rabbits have shown some drawbacks, such as material opacity and granule formation, visualized by histological analysis. Thus, in this work, experimental planning by DOE was carried out to develop a vitreous substitute, based on natural polymeric matrices of sodium alginate and methylcellulose, cross-linked with citric acid or sodium trimetaphosphate. The input variables to be evaluated were: matrix concentration, crosslinker concentration and pH, generating through the central compound factorial design, 16 specific experimental conditions for obtaining the materials, which will be carried out under agitation for 2 h at room temperature. The concentration range of polymeric matrix will be from 0.025 to 1.95%; the m / m ratio of crosslinker (1 g matrix / X g crosslinker) from 0.95 to 11.05 and the synthesis pH value from 3.3 to 11.7. The output variable for optimization of the best experimental condition will be the viscosity of the hydrogels, which will be evaluated at rotational speeds corresponding to torques from 10 to 99%. After processing these results by the Statistica program, the best synthesis condition will be defined to obtain the crosslinked alginate and methylcellulose hydrogels. Subsequently, these materials will be synthesized in triplicate under optimized conditions and subjected to thermal, rheological, etc. Thus, these experiments will assist in obtaining hydrogels, aiming at the development of a vitreous substitute, which will be tested in vivo.

Keywords: Hydrogels, Experiment Planning, Polymers, Crosslinking, Vitreous Substitute

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Visual

Os seres humanos apresentam cinco sentidos sensoriais: visão, audição, gustação, tato e olfato, sendo que a visão é o mais importante e complexo dos sentidos (HUTMACHER, 2019).

A visão acontece quando a luz, originária de um objeto, atinge os olhos e atravessa todas estruturas transparentes do olho até atingir a retina. Na retina ocorre a transformação da luz em impulso elétricos, que são levados pelos nervos das vias ópticas até o córtex occipital, sendo decodificado em imagem (Figura 1) (SOUSA, 1997).

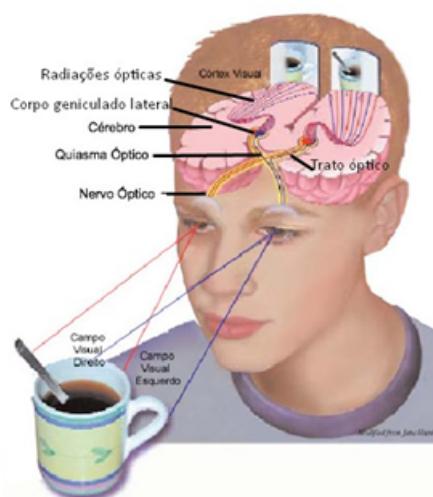


Figura 1: Sistema visual central

Fonte: https://www2.ibb.unesp.br/Museu_Escola/2_qualidade_vida_humana/Museu2_qualidade_corpo_sensorial_visao2.htm.

O aparelho óptico do sistema visual é o olho humano, que possui em média 24 mm de comprimento, sendo dividido em porções anterior e posterior do olho e em três túnicas sendo:

- Fibrosa a camada externa (esclera e córnea),
- Vascular a camada intermediária (coróide, corpo ciliar e íris),
- Interna (retina). (RIBEIRO, 2019)

Então, as estruturas oculares são (Figura 2):

- Córnea é um tecido transparente e avascular,
- Esclera ou esclerótica e é a parte branca do olho, sendo uma camada protetora do globo ocular,

- Cristalino é uma lente transparente, biconvexa, elíptica e convergente,
- Íris é composta por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e células pigmentadas, tendo um orifício central que é a pupila,
- Corpo ciliar é o responsável pela formação do humor aquoso através do processo ciliar e da acomodação visual pelo músculo ciliar,
- Coróide possui melanócitos pigmentados, sendo essencial para absorver a luz que chega à retina, evitando a reflexão da luz,
- Retina neurossensorial, contém células altamente especializadas em capturar a luz e processar os estímulos e transmitindo ao nervo óptico,
- Corpo vítreo é uma substância gelatinosa e transparente (MAIA, 2018)

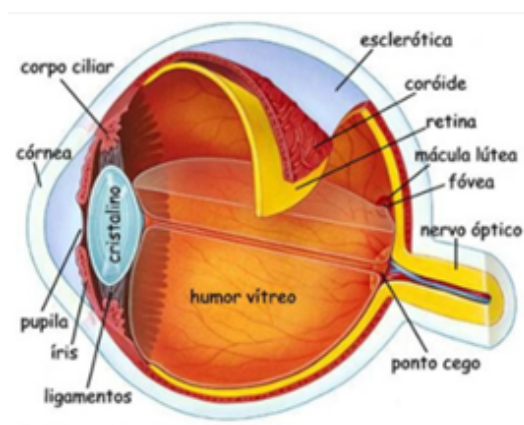


Figura 2: Estruturas anatômicas do olho humano.

Fonte: <https://phelcom.com.br/blog/como-funciona-o-olho-humano/>.

1.2 Corpo Vítreo

O vítreo é uma extensa matriz extracelular que encontra-se entre o cristalino e a retina. Quando os olhos são emétopes, o comprimento axial é de aproximadamente 16,5 mm e com um volume de 4 mL. Então, o corpo vítreo constitui aproximadamente 80% do volume do olho e, sendo, a maior estrutura individual do olho humano. (ALM E KAUFMAN, 2011)

A membrana hialóide é a estrutura mais externa do vítreo que apresenta uma condensação fibrilar, sendo a hialóide anterior limitada pela parte anterior se estendendo da ora serrata e à lente, formando a fossa patelar, tendo uma grande adesão na ora serrata. A hialóide posterior apresenta aderência peripapilar, macular e vascular (Figura 3). (PUTZ, 2017)

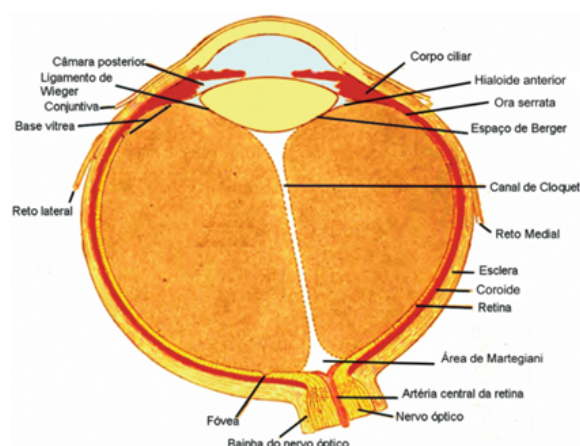


Figura 3: Delimitação do humor vítreo

Fonte: Putz, 2017.

O corpo vítreo tem funções para o desenvolvimentos do olho normal, que podem ser divididas em quatro grupos principais:

- Suporte para a retina e preenchimento da cavidade do corpo vítreo,
- Barreira de difusão entre os segmentos anterior e posterior do olho,
- Tamponamento metabólica,
- Sendo um meio que a luz não sofra desvios e mantendo a transparência devido à baixa concentração de macromoléculas estruturais. (LEVIN, L. et al., 2011)

1.2.1 Embriologia do corpo vítreo

No primeiro estágio do desenvolvimento fetal quando surge a vesícula óptica podemos distinguir a estrutura ocular. Na região do diencéfalo que desenvolve o escopo ocular e com o fechamento do tubo neural, os sulcos continuam a formar reentrâncias, formando as vesículas ópticas. (DANTAS E SALLUM, 2013)

No desenvolvimento ontogenético do olho (Figura 4) ocorre o aparecimento das cavidades ópticas na ectoderma dorsal (Figura 4A). Depois ocorre a invaginação da superfície da ectoderma com a área óptica para formar o tubo neural primitivo (Figura 4B). O processo de evaginação da vesícula óptica primária (Figura 4C) ocorre e posteriormente o início da invaginação secundária do epitélio neural com espessamento da superfície do epitélio (Figura 4D) e invaginação da superfície do

epitélio (Figura 4E) e finalizando o processo deslocamento do cristalino da superfície do epitélio (Figura 4F). (DANTAS E SALLUM, 2013)

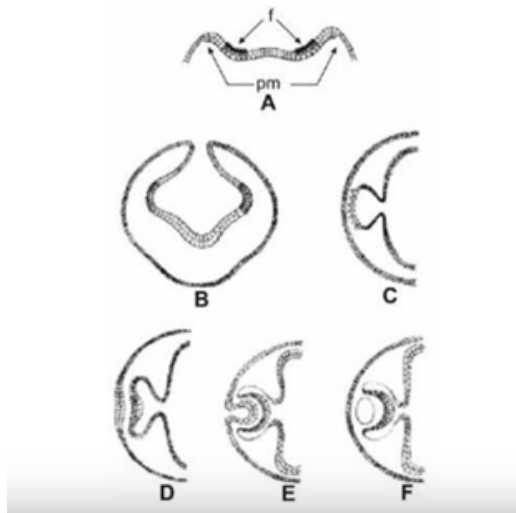


Figura 4: Desenvolvimento ontogenético do olho vertebrados.

Fonte: https://issuu.com/computadorseguro/docs/06_embriologia/82

O vítreo é dividido dependendo do estágio de desenvolvimento embrionário sendo distinguido em primário e secundário (Figura 5). (SANG, 1987)

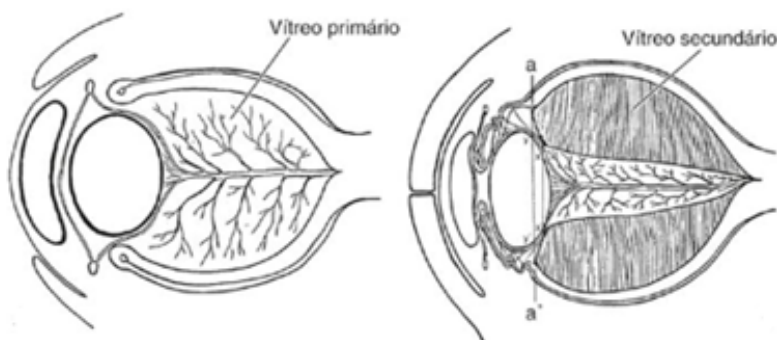


Figura 5: Representação do vítreo primário e do vítreo secundário.

Fonte: Barber, 1955, p. 129.

O vítreo primário ocupa a parte central da cavidade do vítreo, na terceira a quarta semana de gestação ocorre a penetração de ramos da artéria hialóide, formando uma rede de capilares (DANTAS E SALLUM, 2013).

O vítreo secundário se desenvolve no final da sexta semana embrionária com

a regressão do sistema vascular da hialóide, sendo a artéria hialóide permanecendo por mais algum tempo até deixar um tubo de vítreo primário rodeado por vítreo secundário sendo nomeado canal de Cloquet e o aumento do tamanho da cavidade vítrea. O canal de Cloquet é diferenciado do resto do corpo vítreo por ser um gel sem fibras de colágeno e o aumento do tamanho da cavidade vítrea. (LEVIN et al., 2011)

O termo vítreo terciário está relacionado ao material fibrilar, que se desenvolve como as fibrilas suspensoras, as zônulas, e as lentes. Durante a infância, o vítreo sofre um crescimento significativo. O comprimento do corpo vítreo do recém-nascido tem aproximadamente 10,5 mm e, aos 13 anos, o comprimento real do vítreo aumenta para 16,1 mm no masculino. Na ausência de alterações refrativas, o vítreo adulto médio é de 16,5 mm. (LEVIN et al., 2011; SANG, 2013)

1.2.2 Propriedades bioquímicas e físicas do corpo vítreo

O vítreo humano tem aproximadamente 4 ml de volume e contém, principalmente, água, sais, colágeno e ácido hialurônico (HA). A composição detalhada do humor vítreo humano é mostrada na (Tabela 1). (YADAV et al., 2020)

Tabela 1: Composição do Humor Vítreo.

Componentes	Funções
H ₂ O (98 - 99%)	Mantém a estabilidade do vítreo.
Proteínas (280 - 1.360 µg/ml) • Albumina • Colágenos (300 µg/ml; dia 10 - 25nm). Tipo II (60 - 70%), tipo IX (25%), tipo V / IX (10 - 25%) e tipo IV (<10%)	Protege contra pequenas hemorragias, reduzindo a toxicidade do ferro. Formação de estrutura. Fornece plasticidade e resistência à tração.
Glicosaminoglicanos • Ácido hialurônico (HA) (65 - 115 µg/mL) • Heparan sulfato • Condroitin sulfato	Promove viscosidade Forma rede reticulada com colágeno.
Metabólitos • Ácido láctico (12,0 mmol/kg H₂O)* e ácido ascórbico (0,46 mmol/kg H₂O)* • Glicose (3,0 mmol/kg H₂O)* • Aminoácidos e ácidos graxos insaturados (50 - 55%) • Prostaglandinas (100 pg/ml):	Apoio à atividade enzimática. Aumenta a proliferação de hialócitos Auxilia na manutenção e regulação das reações metabólicas.

PGE2, PGF2alfa, prostaciclina, tromboxano	
Células • Hialócitos • Fibroblastos • Macrófagos	Criação e manutenção do humor vítreo. Regulação e degradação do vítreo.
Eletrólitos • Sódio (146,7 mmol/L), • Cloreto (121,16 mmol/L), • Potássio (5,73 mmol/L), • Cálcio (1,128 mmol/L), • Magnésio (0,900 mmol/L) e • Fosfato	Auxilia na hidratação. Manutenção dos níveis de pH.

Fonte: Yadav; Purohi; Singh, 2020; Levin e al., 2011.

O olho é opticamente é comparado a uma máquina fotográfica comum, sendo constituído basicamente de um sistema de lentes de diafragma variável e pela retina que corresponde a um filme a cores, passando a luz pelas estruturas oculares dentro delas o corpo vítreo, apresentando suas propriedades, como mostrado na tabela 2 (OKUNO, 1984).

Tabela 2: Características físicas do humor vítreo

Característica	Valor
Massa	4 g
Densidade	1,0053 – 1,008 g/cm ³
Índice de refração	1,3345 – 1,3348
Viscosidade	300 – 2000 cP
pH	7,0 – 7,4

Fonte: Okuno, 1984

1.2.3 Envelhecimento do corpo vítreo

As mudanças no corpo vítreo devido ao envelhecimento corroboram para o surgimento de distúrbios vítreo-retinianas. As mudanças relacionadas com a idade no vítreo são de natureza reológica, bioquímica e estrutural (SEBAG, 1987).

O vítreo com o envelhecimento começa progressivamente se liquefazendo a partir do centro, formando lacunas vítreas liquefeito. Enquanto, o vítreo se liquefaz ocorre a agregação fibrilar, que associa lacunas e fibrilas de colágeno agrupadas

em feixes de fibras espessas (SPITZER et al., 2015).

A agregação das fibras vítreas é o resultado de uma interação disfuncional crescente entre o ácido hialurônico e as moléculas de colágeno, podendo ocorrer o descolamento do vítreo na retina posterior (YONEMOTO et al., 1994).

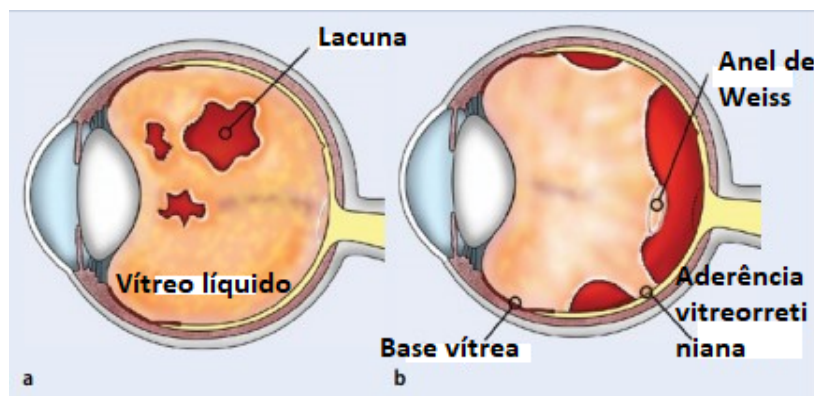


Figura adaptada 6: A – Degeneração pela idade devido a liquefação do vítreo. B – A agregação das fibras de colágenos resultando em um descolamento da retina posterior.

Fonte: Spitzer MS, Januschowski K. Gesunder Glaskörper und seine Alterung [Aging and age-related changes of the vitreous body]

1.2.4 Cirurgia de vitrectomia

A cirurgia de vitrectomia tem como principal objetivo a remoção de todas as opacidades vítreas, localizadas no eixo visual e trações vitreorretinianas significativas (SCHOR et al., 2004).

Então, com os avanços da cirurgia de vitreorretiniana, fez com que esse procedimento torna-se a segunda cirurgia intraocular mais realizada na oftalmologia, ficando atrás da cirurgia de catarata. Os progressos em duas áreas impulsionaram uma notável ampliação das técnicas cirúrgicas de vitreorretiniana que foram:

- A compreensão das alterações anatomopatológicas que afetam a retina e o vítreo;
- As novas tecnologias e instrumentais cirúrgicos (YANOFF et al., 2017).

As indicações da cirurgia de vitrectomia é quando existem algumas patologias que opacifica o vítreo e hemorragia vítrea sendo causada pela retinopatia diabética proliferativa, trauma, descolamento vítreo posterior, descolamento retinal (RD), tumores intra oculares e doenças vasculares da retina.

A cirurgia também é realizada quando tem regmatogênico, que ocorre quando uma ruptura ou ruptura da retina anterior que permite que o fluido do vítreo acesse o espaço sub-retiniano (OMARI E MAHMOUD, 2021).

Após a remoção do vítreo natural, o cirurgião escolhe um substituto para preencher a cavidade vítreo, sendo classificado em duas categorias gás e líquido (Tabela 3) (YADAV et al., 2020).

Tabela 3: Exemplos de substitutos do humor vítreo utilizados na cirurgia de vitrectomia.

Gás	Ar
	Hexafluoreto de Enxofre (SF_6)
	Perfluoropropano (C_3F_8)
Líquido	Solução Salina (BSS)
	Perfluorocarbono Líquido (PFCL)
	Alcanos Semifluorados (SFAs)
	Óleo de Silicone (SO)

Fonte: Yadav; Purohit; Singh, 2011.

Os substitutos vítreos atuais conseguem realizar o papel mecânico do vítreo, mas, são tóxicos a longo prazo para as estruturas oculares, portanto devem ser removidos (KLEINBERG et al., 2011).

Assim a pesquisa clínica para encontrar um substituto do vítreo tentou essencialmente reproduzir dois aspectos do vítreo original:

- Substância com a mesma estrutura molecular que consiga desempenhar a função de enchimento, controlar a elasticidade e pressão ocular,
- Propriedades químicas e fisiológicas que mantenha a difusão de metabólitos e gases, permitir a perfusão de fármacos e interagir com as estruturas intraoculares (DONATI E CAPRANI, 2014).

Portanto, a pesquisa com biomateriais para substituto vítreo são promissoras para a descoberta de um material que possa ser utilizado dentro da cavidade vítrea a longo prazo sem efeitos adversos devido ao material (ALOVISI et al., 2017).

1.3 Biomateriais

A medicina trata as propriedades dos materiais em (sintéticos e naturais) que são usados em contato com sistemas biológicos, e esses materiais são comumente chamados de biomateriais. A ciência dos biomateriais engloba o estudo físico, químico e biológico de materiais e suas interações com sistemas biológicos.

Sendo definido como “qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural em origem, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo. (HELMUS E TWEDEN, 1995)

Os biomateriais podem ser divididos em três grandes grupos, separados de acordo com a sua composição química.

- Materiais metálicos: por apresentarem resistência a fadiga e à fratura, conseguem um bom desempenho em estruturas que necessitam realizar atividades mecânicas. São usados para a fabricação de próteses ósseas, por exemplo.
- Biomateriais cerâmicos: podem ser empregados para diagnóstico, bem como para o desenvolvimento de biomateriais, por apresentarem uma boa compatibilidade com o meio biológico (inércia química). Existe uma grande variedade de compostos cerâmicos, os quais mostram propriedades e estrutura compatível com tecidos rígidos, podendo ser aplicados em instrumentos de diagnósticos, próteses ortopédicas e preenchimentos ósseos, por exemplo.
- Biomateriais poliméricos: apresentam grande aplicabilidade na área médica. As principais vantagens de sua utilização estão a possibilidade de produção de formas variadas, como: partículas, filmes, fios, etc; custo razoável e possibilidade de obter materiais com propriedades adequadas para a aplicação desejada (PIRES et al., 2015)

Um biomaterial deve apresentar características, que permitam que seja utilizado no sistema biológico, como:

- não produzir resposta biológica adversa local ou sistêmica,

- não apresentar toxicidade,
- não ser carcinogênico,
- não ser antigênico,
- não ser mutagênico.

1.3.1 Polímeros e Hidrogéis

Um polímero é formado pelo encadeamento de subunidades, os monômeros, os quais são conectados por ligações covalentes entre si. (CANEVAROLO Jr, 2002)

Os hidrogéis são estruturas poliméricas reticuladas e hidratadas pela água, contendo ligações covalentes produzidas pelo simples reação de um ou mais monômeros, ligações cruzadas físicas de emaranhados, ligações de associação, como ligações de hidrogênio ou fortes interações de van der Waals entre as muitas cadeias. (PEPPAS, 2019)

Os hidrogéis podem ser sintetizados via reticulação de polímeros por calor, produto químico, reações de fotopolimerização, radiações (raios X, raios gama, feixes de elétrons) (RATNER et al., 2004).

Sendo que os hidrogéis têm propriedades favoráveis, como transparência, biocompatibilidade e flexibilidade mecânica que levaram à sua ampla aplicação em oftalmologia como lentes de contato gelatinosas, lentes intraoculares, drogas, sistemas de entrega e adesão para reparo de feridas. (KIRCHHOF et al., 2015)

E existe os hidrogéis “smart hidrogéis.” são os hidrogéis inteligentes que podem criar um sistema de estrutura tridimensional em resposta a uma variedade de sinal incluindo pH variação, temperatura, luz, pressão, produtos químicos e elétricos. (CHATERJI et al., 2007)

1.3.2 Hidrogéis como Substitutos Vítreos

A pesquisa clínica para substitutos do vítreo tentou essencialmente reproduzir dois aspectos do vítreo original: por um lado, uma substância com a mesma estrutura molecular do vítreo (função de enchimento simples, para controlar a elasticidade e pressão do olho) e, por outro lado um estrutural molécula que apresenta suas propriedades químicas e fisiológicas (para garantir a

difusão de metabólitos e gases, permitir a perfusão de fármacos e interagir ativamente com as estruturas intraoculares). Esta abordagem conduziu pesquisas em direção à biomimética funcional: o uso de moléculas sintéticas que não apenas imitam a função reológica do vítreo, mas também podem interagir com a estrutura intraocular sem degeneração dependente do tempo ou perda de transparência óptica. (DONATI E CAPRANI, 2014)

Portanto, para que um substituto vítreo seja ideal existem características essenciais, como:

- Ter propriedades viscoelásticas;
- Manter a pressão intraocular normal para garantir as estruturas oculares em sua posição;
- Transparente antes e no pós-operatório;
- Índice de refração e densidade semelhante ao vítreo;
- Permitir a circulação de íons e eletrólitos;
- Atóxico para estruturas oculares;
- Biocompatível e inerte;
- Fácil manipulação e auto renovável evitando outras cirurgias. (DONATI E CAPRANI, 2014)

O vítreo natural é uma combinação do hidrogel polimérico, portanto, pesquisas para o desenvolvimento de um substituto vítreo de hidrogel a partir de componentes poliméricos. Os hidrogéis possuem algumas propriedades, incluindo porosidade, viscosidade, degradação controlável, boa resistência mecânica, permitem o transporte de células e fatores de crescimento via encapsulamento de drogas, o que os torna adequados para o desenvolvimento de agentes de tamponamento vítreo. Hidrogéis poliméricos de base líquida têm várias propriedades favoráveis, como transparência, biocompatibilidade e flexibilidade mecânica, o que levou à sua ampla aplicação em oftalmologia. Existem várias pesquisas para o desenvolvimento de diferentes tipos de hidrogéis poliméricos como substitutos do vítreo. (CHIRILA et al., 1994)

Yadav e cols. (2020) apresentaram em um artigo de revisão as vantagens de alguns hidrogéis que estão sendo pesquisados, sendo elas: transparência, biocompatibilidade, injetabilidade, viscosidade, hidrofília, capacidade de tamponamento, índice de refração, toxicidade, gelificação, capacidade de liberação de medicamentos, degradação e grau de hidratação.

De acordo com as informações anteriores é possível agrupar os hidrogéis de acordo com as características mencionadas:

- Hidrogéis transparentes: A base de ácido hialurônico, gelatina modificada, colágeno, acetato de polivinila (PVA),
- Hidrogéis Biocompatíveis: Healon®, Healaflow®, Ácido hialurônico modificado com grupos tiol, Seda de ácido hialurônico, PVP (acetato de polivinila) reticulado com DVG, PVP reticulado com dimetacrilato, PVA (Acetato de Polivinila) com ligação cruzada gama PVA (Acetato de Polivinila) reticulado com STMP,
- Hidrogéis que apresentaram capacidade de injeção em 22G ou 23G ou 25G ou 27G: Healon®, Healaflow®, Ácido hialurônico, gel de colágeno, PVA, Poligelina, Haemaccel, HEMA, PEG - PPG - PCL diol reticulado por ligação de uretano, (PHA) Polihidroxialcanoatos, Ácido hialurônico modificado,
- Hidrogéis que apresentaram viscosidade apropriada: Ácido hialurônico, Poligelina, reticulado HEMA, PVA, Hidroxipropilmetilcelulose, a base de Pluronic® F-127, Gelana,
- Hidrogéis com a capacidade de tamponamento da retina: Ácido hialurônico, Haemaccel, Colágeno, PEG - PPG - PCL, dialdeído de alginato,
- Hidrogéis com índice de refração compatível com o humor vítreo: Base de ácido hialurônico, Poligelina, Poli ácido acrilamida co-acrílico, copolímero de ácido acrílico e monômeros de acrilamida, Poliacrilamida, Glicol de polietileno, PEG - PPG - PCL,
- Hidrogéis com reologia apropriada: ADCON-L®, Poliacrilamida, Ácido hialurônico.
- Hidrogéis sem toxicidade: Gel de colágeno, Poli ácido acrilamida co-acrílico, copolímero de ácido acrílico e monômeros de acrilamida, Gellan Ácido hialurônico.
- Hidrogéis que apresentaram gelificação in situ: Polietileno glicol metacrilato, Poliacrilamida, PEG com grupos octadecil, Glicol de polietileno, Oligo-tetra-PEG, Gellan - Ácido hialurônico.
- Hidrogéis com a capacidade de liberação de medicamentos intraocular: PEG-amina e PEG succinimidil propionato,

- Hidrogéis que apresentaram um comportamento de degradação lenta: PVP com dimetacrilato, Poliacrilamida, Ácido hialurônico modificado.
- Hidrogéis que apresentaram alto grau de hidratação: PVP reticulado com DVG, PEG - PPG - PCL, Gelana com ácido metacrílico (MAA) e metacrilamida (MAm),
- Hidrogéis que apresentam fácil remoção da cavidade vítrea: Haemaccel,
- Hidrogéis que apresentam termossensibilidade: Ácido hialurônico, PEG, PPG, PCL e Pluronic® F-127.(YADAV et al., 2020).

Esses hidrogéis, apesar de mostrarem diversas vantagens, apresentam algumas desvantagens, sendo as principais:

- Aumento da pressão intraocular,
- Curto prazo in vivo, translúcido,
- Deslocamento da retina,
- Formação de catarata,
- Inflamação,
- Auto degradação ou biodegradabilidade,
- Toxicidade da retina,
- Formação de precipitados,
- Redução de cones e bastonetes. (YADAV et al., 2020)

Existem diferentes possibilidades para síntese de hidrogéis, com variação de matriz polimérica e reticulantes, que apresentam não apenas características estruturais diferentes como também diversas origens o que impacta no preço, Assim, podem ser sintetizadas blendas de polímeros ou mesmo materiais com matriz polimérica única, a serem testados como possíveis substitutos vítreos. Uma das vantagens dessa diversidade é . Além dos exemplos já citados alguns polímeros naturais como: quitosana, amido, alginato, celulose e seus derivados (hidroxipropilmetilcelulose, metilcelulose, carboximetilcelulose) (AMINABHAVI E EDESHMUKH, 2015) apresentam vantagem de serem polissacarídeos naturais e de relativo baixo custo em comparação, por exemplo, com colágeno e ácido hialurônico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma revisão bibliográfica pertinente à fundamentação teórica sobre biomateriais, hidrogéis, humor vítreo e vitrectomia e realizar o planejamento experimental para desenvolvimento de um substituto de humor vítreo, a partir de matrizes poliméricas, como alginato e metilcelulose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma revisão bibliográfica sobre hidrogéis e a possibilidade aplicação em vitrectomia;
- Verificar resultados de análise histológica e retinografia de coelhos submetidos a aplicação de um hidrogel de PVA reticulado com trimetafosfato de sódio em substituição ao humor vítreo;
- Realizar o planejamento experimental por DOE para otimização da síntese de hidrogéis de alginato e metilcelulose, a partir da sua reticulação com ácido cítrico ou trimetafosfato de sódio.

3 MÉTODOS

Em trabalhos publicados do grupo de pesquisa da UNIFESP, em parceria com a Prof^a Dra. Andreia de Araujo Morandim Giannetti do Centro Universitário FEI, foram sintetizados e caracterizados hidrogéis de PVA reticulados com trimetafosfato de sódio, glutaraldeído ou lacase (BERSANETTI et al., 2019; MORANDIM-GIANNETTI et al., 2017; 2015). O hidrogel reticulado produzido foi testado *in vivo* pela aplicação em coelhos por vitrectomia, em projeto de doutorado do aluno Ramon Antunes orientado pelo Prof. Dr. Octaviano Magalhães Júnior do Departamento de Oftalmologia e Ciências Visuais da EPM/UNIFESP.

3.1. Obtenção dos hidrogéis

A síntese dos hidrogéis é realizada, a partir da matriz polimérica como PVA, alginato de sódio e metilcelulose e utilizando agentes reticulantes, como ácido cítrico e trimetafosfato de sódio.

Para obtenção dos hidrogéis é realizada uma dissolução da matriz polimérica (alginato e metilcelulose) em 100 mL de água, para obter concentrações de 0,025% até 1,95%, mantendo sob agitação por 2 h a temperatura ambiente.

Nesse projeto são propostos dois tipos de reticulação do alginato e da metilcelulose:

- Ácido cítrico;
- Trimetafosfato de sódio 1% em pH inicial 10,0.

Para reticulação uma alíquota do controle será agitada com cada agente de reticulação apropriado (ácido cítrico ou trimetafosfato de sódio) em razões de 1 g de matriz para X g de reticulante, sendo X entre 0,95 e 11,05.

As diferentes condições de síntese, para obtenção do hidrogel com as características mais adequadas, para ser testado como substituto vítreo, podem ser determinadas através de planejamento experimental.

3.2 Planejamento experimental para síntese dos hidrogéis

O planejamento experimental por DOE (*Design of Experiments*) realizado neste projeto foi do tipo fatorial com pontos axiais, conhecido também como Planejamento Estrela ou delineamento composto central rotacional (DCCR), utilizado

com o objetivo de obtenção de condições específicas (concentração de matriz polimérica, concentração de reticulante e pH) para síntese dos hidrogéis, a fim de se obter uma condição ideal para o processo.

O design de experimentos (DOE) será utilizado para avaliar condições experimentais de síntese dos hidrogéis, pois é possível a análise de vários fatores, simultaneamente, com a finalidade de identificar interações importantes. Assim, o objetivo principal é um planejamento adequado da síntese de um produto, que envolve muitas variáveis, a fim de se chegar em respostas confiáveis e preliminares para a economia de materiais e tempo de reação de reticulação da matriz polimérica.

Assim, pretende-se avaliar nesse projeto a influência das seguintes variáveis (de entrada) para síntese de hidrogéis:

- concentração da matriz polimérica (alginato e metilcelulose)
- concentração do agente reticulador (ácido cítrico e trimetafosfato de sódio),
- pH

Os resultados serão avaliados utilizando-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^3 , com seis pontos axiais e dois centrais, totalizando dezesseis experimentos, conforme ilustrado na Figura 7.

Para o planejamento então são escolhidos: um valor máximo e um valor mínimo para cada variável de entrada. O valor médio é obtido pela média entre o valor máximo e o valor mínimo.

Cada ponto mostrado na (Figura 7) corresponde a uma condição experimental diferente. Na tabela 4 estão representados todos os pontos provenientes gerados pelo planejamento. Os valores +1 correspondem aos valores máximos, -1 valores mínimos, +1,68 corresponde ao valor máximo obtido após a rotação, -1,68 ao valor mínimo após a rotação, enquanto o valor 0 corresponde ao ponto médio.

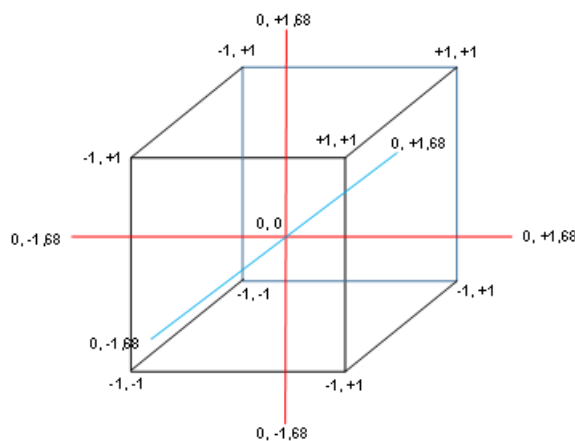


Figura 7: Planejamento utilizado durante a realização dos experimentos.

Fonte: Profª Dra. Andreia de Araujo Morandim Giannetti

Tabela 4: Valores das variáveis de entrada para cada condição experimental, proveniente do planejamento DCCR.

Amostr a	Concentração de matriz polimérica	Concentração de reticulante	pH
1	(0)	(0)	(-1,68)
2	(0)	(+1,68)	(0)
3	(0)	(-1,68)	(0)
4	(0)	(0)	(0)
5	(0)	(0)	(+1,68)
6	(0)	(0)	(0)
7	(+1)	(-1)	(+1)
8	(+1)	(+1)	(+1)
9	(+1)	(+1)	(-1)
10	(+1)	(-1)	(-1)
11	(-1)	(+1)	(-1)

12	(-1)	(-1)	(-1)
13	(-1)	(-1)	(+1)
14	(-1)	(+1)	(+1)
15	(+1,68)	(0)	(0)
16	(-1,68)	(0)	(0)

3.3 Análise da viscosidade dos hidrogéis

Todos os materiais poliméricos apresentam uma viscosidade (η) característica, cujo valor depende de fatores como: massa molecular, concentração do polímero, grau de crosslinking, pH, força iônica, temperatura, etc. (BRUNCHI et al., 2016). Assim, a viscosidade pode ser definida como a resistência que o fluido oferece ao escoamento, sendo uma das propriedades mais importantes a ser avaliada na análise e confirmação de reticulação numa matriz polimérica. Ao se aplicar uma força sobre um material (tensão de cisalhamento $-\tau$), verifica-se a ocorrência de uma deformação constante em relação ao tempo (taxa de cisalhamento $-\dot{\gamma}$), passível de ser analisada.

Assim, a viscosidade (η) pode ser definida como a resistência que o fluido oferece ao escoamento

$$(Eq. 1). \eta = \tau / \dot{\gamma}$$

Esse método é amplamente utilizado para caracterização de hidrogéis, para serem utilizados em diferentes aplicações (HOSPODIUK et al., 2017). Neste projeto, a viscosidade dos hidrogéis preparados (na presença ou ausência de reticulante) será caracterizada, empregando-se um viscosímetro Brookfield de cone e placa modelo DV3T com haste CP52 (Figura 8).



Figura 8: Viscosímetro de cone e placa Brookfield DV3T.

Fonte: <https://www.braseq.com.br/produtos/instrumento/dv3t>

Os ensaios são realizados a 36°C, sendo que as medidas de viscosidade serão determinadas em diferentes velocidades rotacionais, correspondentes a torques de 10 a 99%, as quais serão determinadas para cada hidrogel.

3.4 Obtenção de filmes dos hidrogéis e caracterização por DSC

Na técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) mede-se a diferença de energia absorvida ou liberada pelo material a ser analisado em relação a uma referência, enquanto submetidos a uma programação controlada de temperatura. Através da análise por DSC é possível verificar mudanças físicas ou químicas da amostra, como por exemplo: mudança de fase, desidratação e diferentes reações (dissociação, decomposição, óxido-redução, etc.) que levam a variações de calor. Exemplos de processos endotérmicos são: mudanças de fase, desnaturação de proteínas, desidratações, reduções, entre outros; enquanto eventos endotérmicos podem ser: cristalizações, oxidações, algumas reações de decomposição (IONASHIRO, 2004, p.44).

Através de secagem de alíquota dos hidrogéis, em temperatura ambiente, serão obtidos filmes, que serão, então, caracterizados por DSC em calorímetro Shimadzu DSC60 (Figura 9), nas seguintes condições experimentais: velocidade de aquecimento de 10°C/min, atmosfera inerte de nitrogênio de 50 ml/min, massa de amostra em torno de 2,0 mg e faixa de temperatura de 25°C a 350°C. Os valores de temperatura e entalpia dos processos físicos e químicos serão obtidos, a partir dos termogramas em programa específico do calorímetro.



Figura 9: Calorímetro exploratório diferencial Shimadzu DSC60.

Fonte: <https://cnso.nova.edu/undergraduate/chemistry/lab-equipment/dsc60.html>

3.5 Ensaio de Citotoxicidade

A verificação da citotoxicidade dos hidrogéis através de um ensaio de viabilidade celular, células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC – p8), MTT (Sigma Aldrich, Lote: MKCB8895 - Estoque: 5 mg/mL), soro fetal bovino Vitrocell (Gibco SFB, lote: 012/17); Meio RPMI (lote: 005/17); serão utilizados. Para a realização do ensaio, a Dra. Raquel Neves, pós-doutoranda do Departamento de Biofísica da UNIFESP irá colaborar.

O cultivo das células HUVEC será em meio DMEM (Sigma Aldrich – Darmstadt, Steinheim, Alemanha), com pH 7,4. Já a manutenção do cultivo celular com a utilização da solução de PBS durante as etapas de lavagem e, solução de tripsina/EDTA terá a finalidade de auxiliar na liberação das células dos frascos de cultura. As células são mantidas em temperatura de homeostase (37°C) dentro de uma estufa umidificada contendo uma concentração de 5% CO₂.

O ensaio de redução do sal MTT (3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), o qual possibilita a avaliação da atividade enzimática mitocondrial será empregado para esta análise. Com uma densidade de 5x10³ células/poço numa placa de 96 poços no período de 24 h, em triplicata, mantidas em estufa umidificada. Com a finalidade de garantir que após o período não haja a ocorrência de células mortas no sobrenadante, serão no microscópio para garantir que não haja. O meio de cultivo será, então, removido e adicionado os hidrogéis por 24 h. Esses tratamentos serão realizados com os hidrogéis de alginato puro, alginato/ácido cítrico, metilcelulose, metilcelulose/ácido cítrico,

metilcelulose/trimetafosfato com uma diluição apropriada no meio de cultivo (pH 7,6).

Após o período, o meio de cultura será removido e as células lavadas 2 vezes com PBS, seguida pela adição de MTT 5 mg/mL. Após 4 horas de incubação, o MTT é removido e as células tratadas com DMSO, para solubilizar os sais formados na reação de redução. A porcentagem da viabilidade celular será calculada, ajustando o grupo controle (sem tratamento) para 100%. A placa será analisada no leitor de placas Synergy H1 Hybrid Reader® (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA) em 595 nm.

4 RESULTADOS ESPERADOS

4.1 Obtenção de hidrogéis para serem testados como substituto vítreo em coelhos

Com a utilização de DOE, pretende-se otimizar e diminuir custos na síntese dos hidrogéis com as matrizes poliméricas de alginato e metilcelulose, juntamente com os agentes reticulantes ácido cítrico e trimetafosfato de sódio. Assim, produzindo biomateriais, que sejam viáveis para testes *in vivo* (aplicação em coelhos). Essa técnica já está sendo utilizada pelo grupo de pesquisa, a fim de dar prosseguimento ao desenvolvimento de um material passível de ser utilizado em cirurgia de vitrectomia. Esses estudos são importantes também para ampliar a gama de possíveis materiais para serem utilizados como substitutos vítreos, de modo a diminuir os problemas pós-operatórios, como por exemplo, catarata, opacidade do meio e inflamação.

O grupo de pesquisa tem trabalhado no desenvolvimento de hidrogéis com outras matrizes poliméricas, como por exemplo o PVA (álcool polivinílico) com trimetafosfato de sódio (STMP). No projeto de doutorado do aluno Ramon Antunes, orientado pelo Prof. Dr. Octaviano Magalhães Júnior, do Departamento de Oftalmologia da EPM/UNIFESP, esse hidrogel desenvolvido com reticulação do PVA com STMP (4,3067 g de PVA e uma razão STMP/PVA igual a 1 / 6,154) foi aplicado em coelhos, através de vitrectomia, e a retina analisada.

Nas imagens gentilmente cedidas pelo doutorando, é possível observar que houve opacidade na câmara posterior devido a uma precipitação do biomaterial, conforme observado na (Figura 10). Nas imagens histológicas da retina, obtidas por

coloração com HE e análise por microscopia óptica (Figura 11 A) é possível observar a presença de partículas do hidrogel no tecido intra-retiniano (Figura 11 B), além da presença de células gigantes multinucleadas (Figura 11 C).

Dessa forma, torna-se necessária a busca de outras matrizes poliméricas e/ou reticulantes para obtenção de outros hidrogéis.

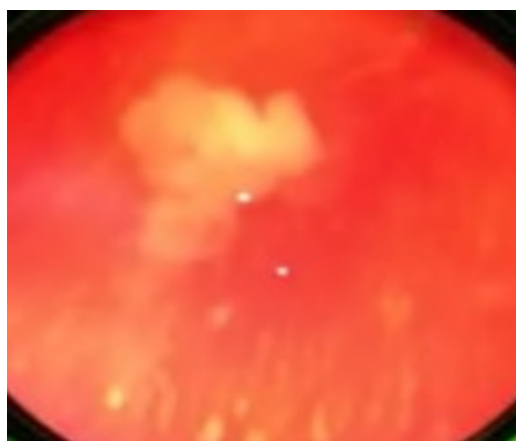


Figura 10: Retinografia do fundo do olho de coelho, mostrando opacidade pré-retinal, após 7 dias de aplicação de hidrogel de PVA reticulado com trimetafosfato.

Fonte: Ramón Antunes

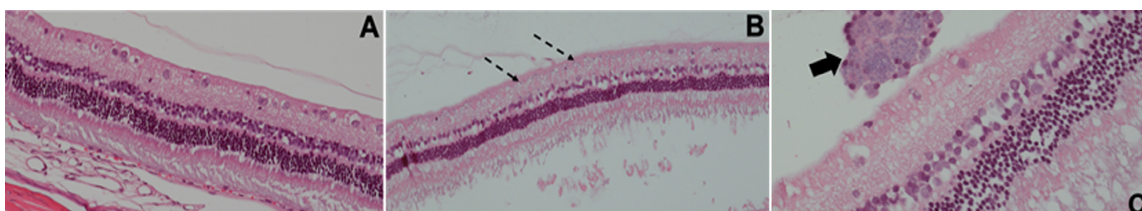


Figura 11: Histologia do tecido da retina do coelho após 30 dias de aplicação de hidrogel de PVA reticulado com trimetafosfato. A) Grupo controle. B) Grupo tratado evidenciando partículas de hidrogel intra-retinianas (setas tracejadas). C) Grupo tratado evidenciando a presença de célula gigante (seta preta).

Fonte: Ramón Antunes

Assim, o estudo da viabilidade de utilização de outras matrizes poliméricas para substituição do vítreo, foi iniciada no trabalho da aluna Paula de Araújo Silvério, empregando alginato reticulado com ácido cítrico (Figura 12). A citotoxicidade desse hidrogel foi testada *in vitro* com células HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana). Como resultado, o biomaterial obtido apresentou coloração adequada, boa

transparência, uma viscosidade compatível com humor vítreo (em torno de 1000 cP em 99% de torque), além de baixa citotoxicidade, mostrando-se um produto viável para aplicação in vivo.



Figura 12. Alginato reticulado com ácido cítrico.

Fonte: Paula de Araújo Silvério

Assim, este trabalho de TPI se propõe a acompanhar a investigação da utilização de alginato reticulado com ácido cítrico como substituto vítreo, a qual estava sendo realizada pela aluna Paula, entretanto a investigação foi interrompida pela pandemia, visando obter conhecimento prático das técnicas de síntese como também dos métodos de avaliação. Então, também propõe a investigação da viabilidade da utilização da metilcelulose como substituto vítreo.

4.2 Planejamento experimental para síntese dos hidrogéis

Para o planejamento foi utilizado o software STATISTICA versão 13.5. Então foi adotado o valor máximo, mínimo e central da quantidade de cada elemento que será utilizado. Na figura 13 estão mostrados os valores adotados no planejamento. Pretende-se, dessa forma, variar as concentrações da matriz, do reticulante, bem como o pH, fatores fundamentais durante a obtenção de um bom substituto vítreo.

Factor	Factor Name	Low Value	Low Label	Center Value	Center Label	High Value	High Label
A (1)	METIL	0,4	LOW	0,95	CENTERPT	1,5	HIGH
B (2)	Reticulante	3	LOW	6	CENTERPT	9	HIGH
C (3)	PH	5	LOW	7,5	CENTERPT	10	HIGH

Factor	Factor Name	Low Value	Low Label	Center Value	Center Label	High Value	High Label
A (1)	ALGINATO	0,4	LOW	0,8	CENTERPT	1,2	HIGH
B (2)	Reticulante	3	LOW	6	CENTERPT	9	HIGH
C (3)	PH	5	LOW	7,5	CENTERPT	10	HIGH

Figura 13: Os valores máximo, mínimo e central da quantidade de cada elemento.

Fonte: Próprio Autor

Tabela 5: Valores das variáveis codificadas e não codificadas resultantes do planejamento para síntese do hidrogel de metilcelulose. A concentração de matriz polimérica está representada em % e do reticulante pela relação de massa de matriz / massa de reticulante (1 g de matriz /x g de reticulante).

Variáveis codificadas			Variáveis não codificadas		
concentração matriz polimérica (%)	concentração reticulante (m/m)	pH	concentração matriz polimérica (%)	concentração reticulante (m/m)	pH
(0)	(0)	(-1,68)	0,95	6	3,30
(0)	(+1,68)	(0)	0,95	11,05	7,5
(0)	(-1,68)	(0)	0,95	0,95	7,5
(0)	(0)	(0)	0,95	6	7,5
(0)	(0)	(+1,68)	0,95	6	11,70
(0)	(0)	(0)	0,95	6	7,5
(+1)	(-1)	(+1)	1,5	3	10
(+1)	(+1)	(+1)	1,5	9	10

(+1)	(+1)	(-1)	1,5	9	5
(+1)	(-1)	(-1)	1,5	3	5
(-1)	(+1)	(-1)	0,4	9	5
(-1)	(-1)	(-1)	0,4	3	5
(-1)	(-1)	(+1)	0,4	3	10
(-1)	(+1)	(+1)	0,4	9	10
(+1,68)	(0)	(0)	1,87	6	7,5
(-1,68)	(0)	(0)	0,025	6	7,5

Tabela 6: Valores das variáveis codificadas e não codificadas resultantes do planejamento para síntese do hidrogel de alginato. A concentração de matriz polimérica está representada em % e do reticulante pela relação de massa de matriz / massa de reticulante (1 g de matriz /x g de reticulante).

Variáveis codificadas			Variáveis não codificadas		
concentração matriz polimérica (%)	concentração reticulante (m/m)	pH	concentração matriz polimérica (%)	concentração reticulante (m/m)	pH
(0)	(0)	(-1,68)	0,80	6	3,30
(0)	(+1,68)	(0)	0,80	11,05	7,5
(0)	(-1,68)	(0)	0,80	0,95	7,5
(0)	(0)	(0)	0,80	6	7,5
(0)	(0)	(+1,68)	0,80	6	11,70
(0)	(0)	(0)	0,80	6	7,5
(+1)	(-1)	(+1)	1,0	3	10

(+1)	(+1)	(+1)	1,0	9	10
(+1)	(+1)	(-1)	1,0	9	5
(+1)	(-1)	(-1)	1,0	3	5
(-1)	(+1)	(-1)	0,40	9	5
(-1)	(-1)	(-1)	0,40	3	5
(-1)	(-1)	(+1)	0,40	3	10
(-1)	(+1)	(+1)	0,40	9	10
(+1,68)	(0)	(0)	1,30	6	7,5
(-1,68)	(0)	(0)	0,29	6	7,5

Os resultados de viscosidade obtidos para cada hidrogel serão avaliados através da análise das superfícies de resposta da função de desejabilidade.

4.3 Análise da viscosidade dos hidrogéis

Pretende-se que a viscosidade do hidrogel produzido apresenta semelhanças com o humor vítreo natural devido às funções que são exercidas e que seja viável a implantação na cavidade vítreo pelo cirurgião com agulhas de pequeno calibre e que não ocorra deformação na estrutura do hidrogel. O óleo de silicone usado na vitrectomia tem viscosidade na faixa de 1000 a 5000 cP. Assim, após o processo de reticulação do alginato e metilcelulose pretende-se chegar em um valor de viscosidade por volta de 1000 cP.

A importância do substituto vítreo ter uma viscosidade específica é porque o vítreo absorve impactos, mantém o contato com a retina e colabora com o suporte às estruturas oculares. De uma maneira geral pode-se dizer que o material deve exercer uma função de tamponamento, da mesma forma que o corpo vítreo.

4.4 Ensaio de Citotoxicidade

Neste ensaio as células serão expostas diretamente aos hidrogéis que serão

sintetizados em concentrações variadas, para que seja analisada a citotoxicidade, o que implica num resultado preliminar adequado da biocompatibilidade. Essa técnica possibilita avaliações qualitativa e quantitativamente da gravidade dos efeitos citotóxicos do material nas células. Espera-se que os biomateriais sintetizados não apresentem citotoxicidade ao estar em contato com as células, sendo este ensaio fundamental para a continuidade do desenvolvimento do hidrogel.

5 CONCLUSÃO

No presente projeto, foi possível inicialmente realizar uma revisão bibliográfica sobre humor vítreo, sua substituição por vitrectomia, além de polímeros e hidrogéis como possíveis materiais para substituição vítrea.

Com base em resultados experimentais da aplicação de um hidrogel de PVA reticulado com trimetafosfato de sódio, em substituição ao humor vítreo in vivo em coelhos, gentilmente fornecidos para esse trabalho, propôs-se a síntese de outros materiais a base de alginato de sódio e metilcelulose por reticulação com ácido cítrico ou trimetafosfato de sódio.

Foi possível ainda realizar o planejamento experimental através de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2³, para otimização da síntese dos hidrogéis de alginato e metilcelulose reticulados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALOVISI, C.; PANICO, C.; de SANCTIS, U.; EANDI, C.M. Vitreous Substitutes: Old and New Materials in Vitreoretinal Surgery. **Journal of Ophthalmology**. v.2017, 3172138, 2017.
- AMINABHAVI, T. M.; DESHMUKH, A. S. Polysaccharide-Based Hydrogels as Biomaterials. In: **Polymeric Hydrogels As Smart Biomaterials**, Springer Cham, p. 45-71, 2015.
- BARBER, A. N. **Embryology of the Human eye**. St. Louis: Mosby, p. 129, 1955.
- BERSANETTI, P. A.; ESCOBAR, V. H.; NOGUEIRA, RR. F.; ORTEGA, F. S. SCHOR, P.; GIANNETTI, A. A. Enzymatically obtaining hydrogels of PVA crosslinked with ferulic acid in the presence of laccase for biomedical applications. **European Polymer Journal**, v. 112, p. 610-618, 2019.
- BRUNCHI, C.E.; BERCEA, M.; MORARIU, S.; DASCALU, M. Some properties of xanthan gum in aqueous solutions: effect of temperature and pH. **Journal of Polymer Research**, v.23, p.123, 2016.
- CANEVAROLO Jr., S. V. **Ciência dos polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros**, São Paulo: Artliber Editora, 2002.
- CHATERJI, S.; KWON, I. K.; PARK, K. Smart polymeric gels: redefining the limits of biomedical devices. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 1083–1122, 2007.
- CHIRILA, T.; TAHIJA, S.; HONG, Y.; VIJAYASEKARAN, S.; CONSTABLE, I. J.. Synthetic polymers as materials for artificial vitreous body: review and recent advances. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 9, n. 2, p. 121-137, 1994.
- DANTAS, A. M.; SALLUM, J. M. F. **Embriologia, genética e malformações**. 3ª Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- DONATI, S.; CAPRANI, S. M.; AIRAGHI, G.; VINCIGUERRA, R.; BARTALENA, L.; TESTA, F.; MARIOTTI, C.; PORTA, G.; SIMONELLI, F.; AZZOLINI, C.. Vitreous Substitutes: the present and the future. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-12, 2014.
- HELMUS, M.N.; TWEDEN, K. **Materials Selection**, In: Encyclopedic Handbook of

- Biomaterials and Bioengineering, Part A. Vol. 1, pp. 27-59, 1995.
- HOSPODIUK, M.; DEY, M.; SOSNOSKI, D.; OZBOLAT, I.. T. The bioink: a comprehensive review on bioprintable materials. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 2, p. 217-239, 2017.
- HUTMACHER, F. Why Is There So Much More Research on Vision Than on Any Other Sensory Modality? **Frontiers In Psychology**, v. 10, p. 10-29, 2019.
- IONASHIRO, M. **Giolito: Princípios Básicos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial/ Calorimetria Exploratória Diferencial**. Giz Editorial, 2004.
- KLEINBERG, T.T.; TZEKOV, R.T.; STEIN, L.; Ravi, N.; KAUSHAL, S. Vitreous substitutes: a comprehensive review. **Survey Ophthalmology**, v.14, n.1, p.300-323, 2019.
- KIRCHHOFF, S.; GOEPFERINC, A. M.; BRANDL, F. P. Hydrogels in ophthalmic applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 95, Part B, p. 227–238, 2015.
- LEVIN, L.; NILSSON, S.; VER HOEVE, J.; WU, S.; KAUFMAN, P.; ALM, A. **Adler's Physiology of the Eye**. 11. ed. Erlangen: Saunders, 2011.
- MAIA, N.C.F.; CAMPOS, A.C.; OLIVEIRA, C.R.J.; DANTAS, D.B.G.; PEREIRA JÚNIOR, E. V.; PEREIRA, G.S.; RODRIGUES, J.G.S.; VIEIRA, L.A.; FONSECA, L.C.N.; BRITO, M.L.S; MEIRELES, N.F.G.; MOURA, S.K.; MEIRELES, L.F.G., PAULA, R. M. (ed.). **Fundamentos Básicos da Oftalmologia e suas Aplicações**. Palmas: Eduft, 2018.
- MORANDIM-GIANNETTI, A.A.; RUBIO, S.R.; NOGUEIRA, R. F.; ORTEGA, F. S.; MAGALHÃES J.O.; SCHOR, Paulo; BERSANETTI, P. Characterization of PVA/glutaraldehyde hydrogels obtained using Central Composite Rotatable Design (CCRD). **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 106, n. 4, p. 1558-1566, 2017.
- MORANDIM-GIANNETTI, A.A.; SILVA, R.C.; MAGALHÃES, J.O.; SCHOR, P.; BERSANETTI, P.A. Conditions for obtaining polyvinyl alcohol/trisodium trimetaphosphate hydrogels as vitreous humor substitute. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 104, n. 7, p.

1386-1395, 2015.

OKUNO, E.; CALDAS, I. L.; CHOW, C. **Física para ciências biológicas e biomédicas**. São Paulo: Harbra, 1986.

OMARI, A.; MAHMOUD, T. H. **Vitrectomy**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551668/>. Acesso em: 18 fev. 2021.

PEPPAS, N.A. **Hydrogels in Medicine and Pharmacy**, v. 1, CRC Press, 2019.

PIRES, A.L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A.M. BIOMATERIAIS: TIPOS, APLICAÇÕES E MERCADO. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015 .

PUTZ, C. **Oftalmologia: Embriologia, Genética e Malformações do Aparelho**. Rio de Janeiro: Gen Guanabara Koogan, 2017.

RATNER, B. D.; Hoffman, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials Science**. 2ª ed. Elsevier, 2004.

RIBEIRO, J. C. M. L.; Alves, A. P. X.; Ferreira, J. L. M.; Andrade Neto, L. **Oftalmologia para a graduação**. Fortaleza: Edunichristus, 2019.

SANG, D. N. **Embryology of the Vitreous. Congenital and Developmental Abnormalities. The Vitreous and Vitreoretinal Interface**. Nova Iorque: Springer. p. 11–35, 1987.

SCHOR, P.; CHAMON, W.; BELFORT Jr. **Guia de Oftalmologia**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2003.

SEBAG, J. Ageing of the vitreous. **Eye**. v. 1, n. 2, p. 254-262, 1987.

SOUSA, S. J. F. Fisiologia e desenvolvimento da visão. **Medicina (Ribeirão Preto)**. v. 30, n. 1, p. 16-19, 1997.

SPITZER M.S.; JANUSCHOWSK, K.; GESUNDER, G. Alterung Aging and age-related changes of the vitreous body. **Der Ophthalmologe**. v.112, n.7, 554-558, 2015.

YADAV, I.; PUROHIT, S.D.; SINGH, H.; BHUSHAN, S.; YADAV, M.K.; VELPANDIAN, T.; CHAWLA, R.; HAZRA, S.; MISHRA, N.C. Vitreous substitutes: an overview of the properties, importance, and development. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, 2020.

YONEMOTO, J.; IDETA, H.; SASAKI, K.; TANAKA, S.; HIROSE, A.; OKA, C. The age of onset of posterior vitreous detachment. **Graefe's Archives for Clinical and Experimental Ophthalmology**. v.232, p.67–70, 1994.