

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NANOEMULSÃO DE GELIFICAÇÃO *IN SITU* CONTENDO CLORIDRATO DE
MOXIFLOXACINO E BETAMETASONA PARA USO TÓPICO NO PÓS-OPERATÓRIO
DE CIRURGIAS OCULARES

Orientada: Camila Oliveira Cardoso
Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Brasília - DF
2021

CAMILA OLIVEIRA CARDOSO

**Nanoemulsão de gelificação *in situ* contendo cloridrato de moxifloxacino e betametasona
para uso tópico no pós-operatório de cirurgias oculares**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da UnB para obtenção do Título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins
Gelfuso

Brasília - DF

2021

CAMILA OLIVEIRA CARDOSO

**NANOEMULSÃO DE GELIFICAÇÃO *IN SITU* CONTENDO CLORIDRATO DE
MOXIFLOXACINO E BETAMETASONA PARA USO TÓPICO NO PÓS-
OPERATÓRIO DE CIRURGIAS OCULARES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade de Brasília para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins
Gelfuso

Brasília, 16 de agosto de 2021.

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (Presidente)

Prof. Dr. Luís Alexandre Muehlmann (Examinador interno)

Prof^ª. Dr^ª. Renata Fonseca Vianna Lopez (Examinadora externa)

Prof^ª. Dr^ª. Taís Gratieri (Examinadora suplente)

Dedico aos meus pais, Eldeberto e Vilma; à minha
irmã, Larissa; aos meus avós, Valentim e Alzira e, em
memória dos meus avós, Olavo e Josina

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus**, por todas as graças e bênçãos que me acalmam e me confortam nos momentos de atribulações, que mesmo em meio à pandemia, me permitiu concluir esse trabalho. E à Nossa Senhora por toda intercessão.

Aos meus pais, **Eldeberto Cardoso Silva** e **Maria Vilma de Oliveira**, por todo o incentivo e suporte que sempre me deram; por toda compreensão que sempre impulsionou; por priorizarem meus estudos e me ajudarem a alcançar meus objetivos. Vocês são exemplos de dedicação na minha vida, obrigada por serem os melhores modelos que eu poderia ter para seguir.

À minha querida irmã, **Larissa Oliveira Cardoso**, por ser meu exemplo de determinação e persistência e por ser meu refúgio nas horas mais difíceis. Obrigada por me ensinar as minhas maiores virtudes, por moldar minha personalidade para melhor, por ser sempre calma e por acompanhar não só minha jornada da vida, como a acadêmica.

Aos meus avós maternos, **Alzira Francisca de Oliveira** e **Valentim Joaquim de Oliveira**, por serem a base da minha família, e por terem criado as oportunidades que me permitiram alcançar o que alcancei. E aos meus avós paternos, **Josina Cardoso Silva** e **Olavo Gomes da Silva**, que de longe intercedem por mim.

Aos meus tios, por todo o suporte e carinho durante essa jornada. Aos meus primos, em especial, **Felipe de Oliveira Fonseca**, **Fernanda de Oliveira Fonseca** e **Samara Oliveira Fonseca**, por todos os momentos de pareceria e distração, e por todo o carinho.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso**, por toda dedicação e acompanhamento; por ser um verdadeiro “pai científico”, sempre presente, disponível, prestativo e atencioso. Obrigada por sempre me incentivar e impulsionar no meio acadêmico.

Aos meus queridos colegas e amigos de laboratório, **Luma de Lira**, **Seila Tolentino**, **Ana Clara Brathwaite**, **Felipe Pires**, **Jéssika Rocha**, **Rayssa Ferreira**, **Wanessa Quintão**, **Geisa Barbalho**, **Breno Noronha**, **Paula Martins**, **Amanda Malini** e **Giselly Almeida**, agradeço por dividirem todas as frustrações e todas as conquistas, por me ensinarem e compartilharem experiências, por deixarem sempre o ambiente alegre e cheio de energia. Em especial, à minha querida amiga, **Ana Luiza Lima**, que sempre se disponibilizou para o que eu precisasse, obrigada por toda ajuda e por ter sido uma grande companheira durante essa jornada, aprendi muito com você e espero ter te ensinado muito também.

Ao meu querido amigo, **Ricardo Ferreira Nunes**, por toda a parceira, pelos ensinamentos, por me acompanhar até o último experimento, pela amizade, pelas brincadeiras e distrações, pelo carinho, e por se tornar um grande amigo que sempre me impulsiona e que eu tanto admiro. Obrigada por me ajudar a trilhar a vida acadêmica desde o PIBIC até o mestrado, vou sempre guardar com carinho tudo o que você me ensinou.

À minha primeira orientadora de PIBIC da UnB, **Dra. Sarah Christina Caldas Oliveira**, por ter me introduzido ao mundo científico, por ser sempre tão carismática e solícita, por me receber no seu laboratório como se eu ainda fizesse parte dele.

Aos professores **Dr. Marcílio Cunha Filho** e **Dra. Taís Gratieri**, pelas grandes contribuições acadêmicas e por dividirem tanto conhecimento.

À minha querida amiga, **Aléxia Ventura de Oliveira**, pelos nossos longos anos de amizade, por incentivar sempre a minha vida acadêmica, por todos os momentos de distração, por todos os conselhos e por estar sempre por perto para o que eu precisar.

Às minhas queridas amigas, **Mariana Alcântara Araújo Vieira**, **Heidi Luise Shulte** e **Dominique Sternadt Alexandre Ramos**, por estarem presentes em todos os momentos desde a graduação. Obrigada por serem meus maiores incentivos e meu ponto de apoio.

À **Universidade de Brasília** por ter sido minha segunda casa nos últimos oito anos, por ter aberto tantas portas e ter me possibilitado grandes oportunidades, contribuindo com meu conhecimento acadêmico e pessoal.

À **Coordenação de Apoio a Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa e bolsa durante o mestrado.

RESUMO

Os procedimentos cirúrgicos oftálmicos podem gerar uma reação de infecção e inflamação no pós-operatório imediato, o que torna essencial o manejo com antibióticos e corticosteroides. Contudo, a baixa biodisponibilidade ocular de fármacos aplicados topicamente exige que haja uma aplicação frequente desses dois tipos de medicamentos, resultando em danos à córnea e em reações adversas. Assim, este estudo busca reduzir a frequência de aplicação de medicamentos e absorção sistêmica por meio do desenvolvimento, caracterização e avaliação de nanoemulsões de gelificação *in situ* contendo uma associação de dipropionato de betametasona (BET) e cloridrato de moxifloxacino (MOX), visando a uma alternativa terapêutica mais cômoda, segura e eficiente para o uso pós-operatório de cirurgias intraoculares. Foram desenvolvidos dois métodos analíticos, por cromatografia líquida de alta eficiência, capazes de quantificar os fármacos MOX e BET em meio aos possíveis interferentes da formulação e da córnea. A compatibilidade química entre os fármacos e excipientes da formulação foi demonstrada por análise térmica e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, que revelaram que a mistura dos componentes da formulação não promoveu degradação dos fármacos e nem dos demais excipientes. Foram desenvolvidas nanoemulsões de gelificação *in situ* contendo MOX e BET, por técnica de emulsificação espontânea seguida de ultrassonificação. A nanoemulsão de geleificação *in situ* apresentou tamanho de gotícula igual a $28,0 \pm 0,1$ nm (PDI = $0,11 \pm 0,01$), potencial zeta igual a $-10,3 \pm 0,1$ mV, pH de $7,1 \pm 0,1$ e osmolaridade igual a $579,0 \pm 9,4$ mOsmol/kg, sendo que esses últimos parâmetros garantem a tolerabilidade ocular da formulação. Com auxílio de um reômetro oscilatório, foi avaliada a temperatura de transição solução-gel ou temperatura de gelificação e a viscosidade da nanoemulsão de gelificação *in situ* contendo MOX e BET. A temperatura avaliada foi ideal para gelificação na superfície ocular ($32,0 \pm 0,9$ °C), apresentando-se no estado líquido quando armazenada à temperaturas mais baixas, podendo ser instilada no olho com precisão da dose, e quando em contato com a superfície ocular, essa formulação inicia seu processo de gelificação, aumentando assim a sua viscosidade, que permite liberação controlada dos fármacos e aumento do tempo de contato da formulação com a córnea. Ainda, as nanoemulsões obtidas foram avaliadas quanto à estabilidade, em que as formulações armazenadas em temperatura de $30^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ apresentaram sinais de instabilidade química a partir do 30º dia de armazenamento, enquanto as formulações acondicionadas em $5^\circ \pm 3^\circ\text{C}$ se mantiveram estáveis ao longo dos 90 dias de análise. A liberação dos fármacos foi determinada *in vitro* durante um período de 2 h, utilizando uma membrana sintética de celulose acoplada a uma célula de difusão do tipo Franz. As formulações apresentaram um perfil controlado de liberação dos fármacos, exercendo um controle ainda mais prologado para o fármaco lipofílico (BET) do que para o MOX. Os ensaios de penetração *ex vivo* foram realizados em córnea de suínos, por um período de 1 h, em condições estáticas e simulando o fluxo lacrimal. Em condições estáticas, as formulações nanoemulsionadas aumentaram a penetração do MOX na córnea, contudo, reduziram a penetração do BET. No ensaio simulando o fluxo lacrimal, a penetração de MOX a partir da nanoemulsão diminuiu 8 vezes em comparação com o teste estático, mas ainda foi 2-3 vezes superior ao fornecido pelo controle, enquanto a penetração de BET na córnea foi mantida no nível do ensaio estático. Assim, a nanoemulsão de gelificação *in situ* associando BET e MOX aumentou a penetração do fármaco hidrofílico (MOX) na córnea e permitiu um maior tempo de residência do fármaco lipofílico (BET) em contato a superfície ocular, sugerindo ser alternativa terapêutica além de mais cômoda, mais eficiente para o uso no pós-operatório de cirurgias intraoculares.

Palavras-chave: betametasona, moxifloxacino, nanoemulsão, gelificação *in situ*, cirurgia ocular.

ABSTRACT

Ophthalmic surgical procedures can generate an infection and inflammation reaction in the immediate postoperative period, making management with antibiotics and corticosteroids essential. However, the low ocular bioavailability of topically applied drugs requires frequent application of these two types of formulations, resulting in damage to the cornea and adverse reactions. Thus, this study aims to reduce the frequency of drug application and systemic absorption through the development, characterization, and evaluation of *in situ* gelling nanoemulsions containing an association of betamethasone dipropionate (BET) and moxifloxacin hydrochloride (MOX), focusing on a more convenient, safe, and efficient therapeutic alternative for the postoperative use after intraocular surgeries. Two analytical methods by high-performance liquid chromatography, capable of quantifying the drugs MOX and BET among possible interferences in the formulation and the cornea, were developed. The chemical compatibility between drugs and formulation excipients was demonstrated by thermal analysis and Fourier transform infrared spectroscopy, which revealed that the mixture of formulation components did not cause degradation of drugs or other excipients. *In situ* gelling nanoemulsions containing MOX and BET were developed using spontaneous emulsification followed by ultrasonication. The *in situ*-gelling nanoemulsion had a droplet size equal to 28.0 ± 0.1 nm (PDI = 0.11 ± 0.01), zeta potential equal to -10.3 ± 0.1 mV, pH = 7.1 ± 0.1 , and osmolarity equal to 579.0 ± 9.4 mOsmol/kg, in which these last parameters guarantee ocular tolerability of the formulation. With the aid of an oscillating rheometer, the solution-gel transition temperature or gelation temperature and the viscosity of the *in situ*-gelling nanoemulsion containing MOX and BET were evaluated. The temperature evaluated was ideal for gelling on the ocular surface (32.0 ± 0.9 °C), appearing in a liquid state when stored at lower temperatures, which can be instilled in the eye with dose precision, and when in contact with the ocular surface, this formulation starts its gelling process, thus increasing its viscosity, which allows controlled release of drugs and increased contact time of the formulation with the cornea. Still, the nanoemulsions obtained were evaluated for stability, in which the formulations stored at a temperature of $30^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ showed signs of chemical instability from the 30th day of storage, while the formulations stored at $5^\circ \pm 3^\circ\text{C}$ remained stable over the 90 days of analysis. Drug release was determined *in vitro* over 2 h, using a synthetic cellulose membrane coupled to a Franz-type diffusion cell. The formulations presented a controlled drug release profile, exerting an even longer control for the lipophilic drug (BET) than the MOX. The *ex vivo* penetration tests were carried out on porcine corneas, for 1 h, under static conditions and simulating tear flow. Under static conditions, nanoemulsified formulations increased MOX penetration in the cornea; however, they reduced BET penetration. In the test simulating tear flow, MOX penetration from the nanoemulsion decreased 8-fold compared to the static test but was still 2-3 times higher than that provided by the control, while BET penetration into the cornea was maintained at the level of the static testing. Thus, the *in situ*-gelling nanoemulsion combining BET and MOX increased the penetration of the hydrophilic drug (MOX) in the cornea and allowed a longer residence time of the lipophilic drug (BET) in contact with the ocular surface, suggesting that it is a therapeutic alternative in addition to being more comfortable and more efficient for use in the postoperative period of intraocular surgeries.

Keywords: betamethasone, moxifloxacin, nanoemulsion, *in situ* gel, ophthalmic surgery.

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Estrutura anatômica do segmento anterior do olho e posterior do olho.....	5
Figura 2. Camadas da córnea: epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio.	6
Figura 3. Fórmula estrutural do cloridrato de moxifloxacino (MOX - massa molecular: 437,9 g/mol e log P: -0,280).	14
Figura 4. Fórmula estrutural do dipropionato de betametasona (BET - massa molecular: 504,6 g/mol e log P: 3,97).....	14
Figura 5. Barreiras enfrentadas pelo fármaco após administração tópica ocular.	16
Figura 6. Nanoemulsões bifásicas do tipo A/O e O/A, indicando a orientação do tensoativo na interface água e óleo, em que a cabeça polar se orienta para a fase aquosa, enquanto a cauda apolar, para a fase oleosa.....	20
Figura 7. Mecanismo de funcionamento do ultrassom de ponta para produção de nanoemulsões pela geração de alta energia sonora	21
Figura 8. Representação esquemática do método de emulsificação espontânea.	22
Figura 9. Esquema da célula de difusão vertical do tipo Franz montada com membrana sintética separando o compartimento doador do receptor para realização dos ensaios <i>in vitro</i> de liberação.	34
Figura 10. Remoção da córnea do globo ocular. Com auxílio do bisturi e da tesoura, é realizado um corte no local indicado pela linha vermelha tracejada, separando a córnea.	35
Figura 11. Esquema da célula de difusão do tipo Franz montada com córnea suína separando o compartimento doador do receptor para realização dos ensaios <i>ex vivo</i> de penetração ocular.	35
Figura 12. Modelo ocular <i>ex vivo</i> para simulação do fluxo lacrimal através de uma bomba peristáltica, mantendo um fluxo de 20 µL/min de tampão fosfato isotônico pH = 7,4.	36
Figura 13. Sobreposição dos cromatogramas das diferentes amostras para análise da seletividade do método analítico. (A) Cromatograma do MOX em metanol comparado aos interferentes isolados de nanoemulsão, extrato da córnea e meio receptor; e (B) cromatograma do BET em metanol comparado aos interferentes isolados de nanoemulsão, extrato da córnea, e meio receptor BET – dipropionato de betametasona; MOX – cloridrato de moxifloxacino; NE – nanoemulsão.	39
Figura 14. Seletividade para os métodos de quantificação de (A) MOX (10 µg/mL) e de (b) BET (10 µg/mL) em metanol e frente aos interferentes: NE, córnea e propilenoglicol 40%,	

analisados em termos de diferenças entre as áreas dos picos. Análise estatística por ANOVA, (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$. BET – dipropionato de betametasona; MOX – cloridrato de moxifloxacino; NE – nanoemulsão. 40

Figura 15. Representação gráfica da curva analítica, na faixa de concentração de 1,25 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$, obtida por HPLC para quantificação de (A) MOX, equação da reta: $y = 161115x - 20393$, $r^2 = 0,9999$ e (B) BET, equação da reta: $y = 36330x + 1015,5$, $r^2 = 0,9999$. BET – dipropionato de betametasona; MOX – cloridrato de moxifloxacino. 41

Figura 16. Correspondência entre as curvas analíticas em metanol (solvente), em solução metanólica contaminada com a córnea para ambos os fármacos e as curvas em solução aquosa de propilenoglicol 40% (v/v). (A) MOX – equação da reta para solução metanólica da córnea: $y = 131672x + 163225$, $r^2 = 0,9996$; equação da reta para em solução aquosa de propilenoglicol 40% (v/v): $y = 129178x - 209237$, $r^2 = 0,9965$. (B) BET – equação da reta para solução metanólica da córnea: $y = 38188x + 44689$, $r^2 = 0,9992$; equação da reta para em solução aquosa de propilenoglicol 40% (v/v): $y = 35940x - 6563$, $r^2 = 0,9997$. BET – dipropionato de betametasona; MOX – cloridrato de moxifloxacino. 42

Figura 17. Análise das curvas de DSC do BET, do MOX e das misturas físicas. O pico de fusão de cada fármaco foi sombreado, o mais claro indica a fusão do BET e o mais escuro do MOX. BET – dipropionato de betametasona; MOX – cloridrato de moxifloxacino. 48

Figura 18. Primeira derivada de TGA das misturas M1 à M10 e dos fármacos isolados. Análises referentes ao MOX e às misturas físicas contendo MOX (A) e análises referentes ao BET e às misturas físicas contendo BET (B). Cada evento de perda de massa está indicado nas figuras como porcentagem (%). BET – dipropionato de betametasona; MOX – cloridrato de moxifloxacino. 50

Figura 19. Espectros de FTIR e estruturas químicas dos fármacos BET e MOX sozinhos ou em mistura física (BET + MOX). BET – dipropionato de betametasona; FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier; MOX – cloridrato de moxifloxacino. 51

Figura 20. Espectros de FTIR do MOX sozinho ou em mistura física (M2, M3, M4, M5) e estrutura química do MOX. FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier; MOX – cloridrato de moxifloxacino. 52

Figura 21. Espectros de FTIR do BET sozinho ou em mistura física (M6, M7, M8, M9) e estrutura química do BET. BET – dipropionato de betametasona; FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. 53

Figura 22. Diagrama de fases pseudoternário mostrando as regiões de formação de nanoemulsões gel e líquida, em vermelho, está indicada a região escolhida para o preparo da

nanoemulsão. O diagrama foi composto por Cremophor[®] EL e o Plurol[®] oleique na proporção 4:1 (p/p), como tensoativos, oleato de etila, como fase oleosa e água, como fase aquosa. 56

Figura 23. Nanoemulsões O/A: (NEC1) sem os fármacos e sem o P407, (NE1) com os fármacos e sem o P407, (NEC2) sem os fármacos e com o P407, (NE2) com os fármacos e com o P407..... 57

Figura 24. Representação gráfica da caracterização das nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2 quanto ao tamanho da gotícula (nm) e ao PDI. Análise estatística por ANOVA, (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,01$, (****) $p \leq 0,0001$. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer. 59

Figura 25. Imagens obtidas por MET das formulações: NEC1 (A), NE 1 (B), NEC2 (C) e NE2 (D). Aumento de 50.000 (A) e 30.000 (B, C e D) vezes. Nanoemulsões identificadas pelas setas vermelhas. MET – microscopia eletrônica de transmissão. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer..... 62

Figura 26. Gráfico referente à região visco-elástica linear da formulação à temperatura de 15°C (A) e 50°C (B). 63

Figura 27. Módulo elástico (G') e módulo dissipativo (G'') em função da temperatura da formulação NE2. NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer. 64

Figura 28. NEC1 e NE1 armazenadas à temperatura de $30^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ durante o período de 90 dias. Após o 30º dia de armazenamento é possível identificar alteração na coloração da NE1. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona..... 65

Figura 29. NEC1 e NE1 armazenadas à temperatura de $5^\circ \pm 3^\circ\text{C}$ durante o período de 90 dias. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona..... 66

Figura 30. NEC2 e NE2 armazenadas à temperatura de $30^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ durante o período de 90 dias. Após o 30º dia de armazenamento é possível identificar alteração na coloração da NE2. NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer..... 66

- Figura 31.** NEC2 e NE2 armazenadas à temperatura de $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante o período de 90 dias. NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer. 67
- Figura 32.** Tamanho de gotícula das nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2 armazenadas à $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 90 dias. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer. 68
- Figura 33.** PDI das nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2 armazenadas à $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 90 dias. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer. 69
- Figura 34.** PDI das nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2 armazenadas à $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 90 dias. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer.70
- Figura 35.** pH das nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2 armazenadas à $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 90 dias. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer. 71
- Figura 36.** Perfis de liberação de MOX (A) e BET (B) a partir das formulações NE1, NE2 ou controle contendo os fármacos livres em solução na mesma concentração (1% de BET e 5% de MOX). Resultados apresentados como média \pm desvio padrão. BET – dipropionato de betametasona; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer; MOX – cloridrato de moxifloxacino. 72
- Figura 37.** Quantificação de MOX (A) e de BET (B) recuperados da córnea após ensaios *ex vivo* de penetração ocular em condição estática (sem fluxo lacrimal) e em condição simulando o fluxo lacrimal, a partir das formulações NE1, NE2 ou controle contendo os fármacos livres em solução na mesma concentração (1% de BET e 5% de MOX). Análise estatística por ANOVA, (*) $p \leq 0,05$, (****) $p \leq 0,0001$. BET – dipropionato de betametasona; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer; MOX – cloridrato de moxifloxacino. 74

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Eluição por gradiente e vazão para análise cromatográfica do BET.....	25
Tabela 2. Sumário da composição das misturas físicas dos fármacos e dos excipientes para verificação da compatibilidade química da formulação.....	29
Tabela 3. Cálculo do efeito matriz na curva de cada fármaco (MOX e BET) na presença da solução metanólica contaminada com a córnea e da solução aquosa de propilenoglicol 40% (v/v). BET – dipropionato de betametasona; MOX – cloridrato de moxifloxacino.....	43
Tabela 4. Precisão, mensurada em termos de repetibilidade, dos métodos analíticos do MOX e do BET. BET – dipropionato de betametasona; CV – coeficiente de variação; MOX – cloridrato de moxifloxacino.	44
Tabela 5. Precisão, mensurada em termos de precisão intermediária, dos métodos analíticos do MOX e do BET. BET – dipropionato de betametasona; CV – coeficiente de variação; MOX – cloridrato de moxifloxacino.	45
Tabela 6. Valores de recuperação do MOX e do BET da córnea por extração metanólica, após 24 h em repouso. BET – dipropionato de betametasona; CV – coeficiente de variação; MOX – cloridrato de moxifloxacino.	46
Tabela 7. Dados referentes aos LD e LQ teóricos dos métodos de quantificação do MOX e do BET em metanol. BET – dipropionato de betametasona; LD – limite de detecção; LQ – limite de quantificação; MOX – cloridrato de moxifloxacino.	47
Tabela 8. Faixa de decomposição e perda de massa em porcentagem dos excipientes da formulação.....	49
Tabela 9. Caracterização das nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2 quanto ao tamanho da gotícula (nm) e ao PDI. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasona com poloxamer; PDI – índice de polidispersão.....	58
Tabela 10. Resultado da avaliação do potencial zeta (mV) das formulações NEC1, NE1, NEC2, NE2. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasona com poloxamer.	60
Tabela 11. Avaliação do pH das formulações NEC1, NE1, NEC2, NE2 produzidas tanto com a fase aquosa composta por água ultrapura, quanto com a fase aquosa composta por tampão fosfato pH 7,4. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de	

moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer;
NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer. 61

Tabela 12. Resultados referentes à osmolaridade das formulações NEC1, NE1, NEC2, NE2.

NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e
betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 –
nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer. 61

Tabela 13. Resultados de viscosidade das formulações NE1 e NE2, nas temperaturas de 15°,

25° e 35°C. NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NE2 – nanoemulsão
O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer..... 64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

A/O	Água em óleo
A/O/A	Água em óleo em água
BET	Dipropionato de betametasona
CXL	<i>Crosslinking</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
DTA	Análise térmica diferencial
ECCE	Extração extracapsular da catarata
FLACS	Cirurgia de catarata assistida por laser de femtosegundo
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
ICRS	Implante de anel corneano intraestromal
IFC	Inversão de fase catastrófica
IFT	Inversão de fase transicional
LASIK	Ceratomileuse assistida por excimer laser <i>in situ</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MOX	Cloridrato de moxifloxacino
NE1	Nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasona
NE2	Nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasona com poloxamer
NEC1	Nanoemulsão O/A controle
NEC2	Nanoemulsão O/A controle com poloxamer
O/A	Óleo em água
O/A/O	Óleo em água em óleo
P407	Poloxamer 407
PDI	Índice de polidispersão
PKP	Ceratoplastia anterior lamelar ou penetrante
SMILE	Extração de lenticulas de pequena incisão
TGA	Análise termogravimétrica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS.....	4
2.1	Objetivo Geral.....	4
2.2	Objetivos específicos.....	4
3	REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1	Segmento anterior e posterior do olho.....	5
3.2	Cirurgias intraoculares.....	8
3.2.1	<i>Cirurgia de catarata</i>	9
3.2.2	<i>Cirurgias refrativas</i>	9
3.2.3	<i>Cirurgia de ceratocone</i>	10
3.2.4	<i>Cirurgia de glaucoma</i>	10
3.2.5	<i>Vitrectomia</i>	11
3.2.6	<i>Retinopexia</i>	11
3.3	Aplicação tópica ocular de colírios utilizados no tratamento pós-operatório de cirurgias intraoculares	13
3.4	Barreiras da permeação ocular após administração tópica	15
3.5	Nanoemulsões de geleificação <i>in situ</i>	18
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Material.....	24
4.2	Métodos analíticos para quantificação de BET e MOX	24
4.3	Validação dos métodos analíticos	25
4.3.1	<i>Seletividade</i>	25
4.3.2	<i>Linearidade</i>	26
4.3.3	<i>Precisão</i>	27
4.3.4	<i>Exatidão</i>	27
4.3.5	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	28
4.4	Estudo da compatibilidade química entre o BET, o MOX e componentes da nanoformulação	28
4.4.1	<i>Análise térmica</i>	29
4.4.2	<i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	29
4.5	Obtenção das nanoemulsões líquidas e de gelificação <i>in situ</i>	30
4.5.1	<i>Construção do diagrama de fases pseudoternário</i>	30

4.5.2	<i>Seleção da formulação</i>	30
4.5.3	<i>Incorporação dos fármacos e do gel na nanoemulsão</i>	30
4.6	Caracterização das nanoemulsões	31
4.6.1	<i>Diâmetro da gotícula e PDI</i>	31
4.6.2	<i>Potencial Zeta</i>	31
4.6.3	<i>Mensuração do pH</i>	31
4.6.4	<i>Osmolalidade</i>	32
4.6.5	<i>Morfologia</i>	32
4.7	Estudo reológico da nanoemulsão de geleificação <i>in situ</i>	32
4.8	Estudo de estabilidade das nanoemulsões	33
4.9	Perfil de liberação <i>in vitro</i> das nanoemulsões.....	33
4.10	Estudos <i>ex vivo</i> da penetração ocular	34
4.10.1	<i>Experimento estático</i>	35
4.10.2	<i>Experimento simulando o fluxo lacrimal</i>	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Validação dos métodos analíticos	38
5.1.1	<i>Desenvolvimento dos métodos analíticos</i>	38
5.1.2	<i>Seletividade</i>	38
5.1.3	<i>Linearidade</i>	40
5.1.4	<i>Precisão</i>	43
5.1.5	<i>Exatidão</i>	46
5.1.6	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	46
5.2	Estudo da compatibilidade química entre o BET, o MOX e componentes da nanoformulação	47
5.2.1	<i>Análise térmica</i>	47
5.2.2	<i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	51
5.3	Obtenção das nanoemulsões líquidas e gel <i>in situ</i>	54
5.3.1	<i>Diagrama de fases pseudoternário</i>	55
5.3.2	<i>Seleção da formulação</i>	56
5.3.3	<i>Incorporação dos fármacos e do poloxamer na nanoemulsão</i>	57
5.4	Caracterização das nanoemulsões líquida e de gelificação <i>in situ</i>	58
5.4.1	<i>Diâmetro da gotícula e PDI</i>	58
5.4.2	<i>Potencial Zeta</i>	59
5.4.3	<i>Mensuração do pH</i>	60

5.4.4	<i>Osmolaridade</i>	61
5.4.5	<i>Morfologia</i>	61
5.5	Estudos reológicos da nanoemulsão.....	62
5.6	Estudo de estabilidade das nanoemulsões.....	65
5.7	Perfil de liberação <i>in vitro</i> dos fármacos.....	72
5.8	Estudos <i>ex vivo</i> da penetração ocular.....	73
6	CONCLUSÕES	76
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1 INTRODUÇÃO

Cirurgias intraoculares podem levar a infecções e inflamações no local (LYSENG-WILLIAMSON, 2013; TEWELDEMEDHIN et al., 2017). O trauma cirúrgico na superfície do olho induz uma resposta inflamatória, resultando em sinais e sintomas clínicos clássicos de inflamação ocular, como reação da câmara anterior, vermelhidão, dor, inchaço, fotofobia, lacrimejamento, diminuição da acuidade visual e prurido. A inflamação pós-operatória, quando não tratada, pode levar a complicações como edema macular cistoide e perda temporária ou permanente da visão (JACOBS, 2017; LYSENG-WILLIAMSON, 2013). A outra complicação pós-cirúrgica, a infecção ocular, tem como a endoftalmite pós-operatória uma das dificuldades mais devastadoras da cirurgia ocular, que leva a uma acentuada perda de visão em mais de 80% dos pacientes afetados (FERREIRA et al., 2018; RAM et al., 2001).

Com o objetivo de acelerar a recuperação e prevenir as complicações pós-cirúrgicas, os pacientes comumente recebem a prescrição de pelo menos duas formulações na forma de colírios, sendo um antibiótico, um corticosteroide e/ou um anti-inflamatório não esteroideal (ÁVILA; MUCCIOLI; HÖFLING-LIMA, 2008; THOMPSON; LAKHANI, 2015).

A seleção de um antibiótico oftalmológico eficaz depende da resistência bacteriana, da eficácia clínica, do local da infecção e da toxicidade. Assim, nenhum agente anti-infeccioso é capaz de fornecer cobertura ideal para todos os patógenos em todos os locais infectados. O cloridrato de moxifloxacino (MOX), no entanto, é um antibiótico único, que apresenta um amplo espectro de atividade e uma taxa de sucesso clínico moderada a alta contra patógenos oculares comuns (MILLER, 2008). É, assim, um fármaco muito utilizado para reduzir os riscos de endoftalmite pós-operatória (SHOSS; TSAI, 2013).

No caso de anti-inflamatórios, várias categorias de medicamentos estão disponíveis no mercado global. Contudo, os mais utilizados são os corticosteroides. Embora os corticosteroides tenham efeitos colaterais bem documentados comparados aos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), ainda são considerados os melhores agentes anti-inflamatórios para o tratamento de inflamações oculares (SURESH; SAH, 2014). Neste trabalho propõe-se o uso do dipropionato de betametasona (BET), um corticosteroide amplamente utilizado como anti-inflamatório ou imunossupressor para uso tópico e sistêmico (HANNA; GHORAB; GAD, 2019). Alguns estudos já testaram o uso tópico do BET para aplicação tópica ocular em ratos (TSUJI et al., 1997a) e em cobaias (TSUJI et al., 1997b). O estudo em ratos avaliou o efeito anti-inflamatório da BET e dos seus derivados na uveíte induzida por endotoxinas. Ao contrário do esperado, o BET demonstrou um efeito inibitório fraco da infiltração celular após instilação no olho (TSUJI et al., 1997a). Contudo, outro estudo

conduzido pelo mesmo grupo realizou experimentos para avaliação do efeito anti-inflamatório do BET em cobaias. Foi observado que após instilação do BET no olho, houve uma inibição maior da infiltração celular e da produção de prostaglandinas quando comparada à instilação da betametasona, sugerindo que em cobaias o BET é um potente glicocorticoide (TSUJI et al., 1997b).

Devido à anatomia complexa e às barreiras fisiológicas do olho, a liberação de fármacos nesse local é um desafio (MAHOR et al., 2016) e em consequência dessa baixa biodisponibilidade ocular, os medicamentos requerem quantidades concentradas do princípio ativo, o que pode resultar em dano da córnea e em reações adversas causadas pela absorção sistêmica dos medicamentos pelo ducto nasolacrimal (LALU et al., 2017; SOUZA et al., 2014). Ainda, a aplicação desses medicamentos é realizada com frequência muito alta durante a terapia, sendo os antibióticos tópicos utilizados por um período de uma a duas semanas no pós-operatório até a incisão cicatrizar completamente (HARIPRIYA, 2017) e os corticoides, por um período de até quatro meses (MOHAMMADI et al., 2018), com aplicações feitas normalmente a cada duas horas. Assim, a aplicação de dois agentes terapêuticos em formulações separadas pode resultar em uma baixa adesão ao tratamento, devido tanto ao custo elevado dos medicamentos quanto ao grande número de aplicações necessárias no tratamento. Assim, a terapia combinada tópica do agente antibacteriano e do agente anti-inflamatório pode beneficiar pacientes que se submeteram à cirurgias oculares (GOMES et al., 2017).

Considerando as várias barreiras fisiológicas e anatômicas que restringem a chegada de fármacos ao segmento anterior do olho, tornando o tempo de contato do fármaco com os tecidos da superfície ocular relativamente curto (aproximadamente dois minutos), as formas convencionais de fármacos (soluções ou suspensões) são rapidamente eliminadas pelo ducto nasolacrimal e absorvidas pela circulação sistêmica (AGRAHARI et al., 2016; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2016). Nesse contexto, este trabalho irá explorar a potencialidade terapêutica de nanoemulsões de gelificação *in situ*, uma vez que são formulações que aumentam a consistência em temperaturas corporais, o que aumenta o tempo de permanência de fármacos junto à mucosa ocular e estimula a penetração corneal de fármacos, de modo a melhorar tanto a biodisponibilidade quanto o perfil farmacocinético de medicamentos (AMMAR et al., 2010).

A escolha pelo sistema nanoemulsionado deu-se pelo fato de ser um sistema líquido, transparente, estável, capaz de solubilizar fármacos de diferentes polaridades e, sobretudo, capaz de promover a penetração de fármacos através de barreiras biológicas complexas, como é o caso da córnea (SINGH et al., 2017). Assim, é potencialmente capaz de permitir o alcance

mais rápido de uma ação terapêutica, e reduzir efeitos adversos sistêmicos (AMMAR et al., 2010; KAUR; KAKKAR, 2014).

Géis *in situ* são soluções poliméricas administradas como líquidos que passam por uma transição de fase para géis semissólidos após exposição a ambientes fisiológicos, como a superfície ocular. Um dos principais materiais responsivos à temperatura, com propriedades únicas de gelificação termorreversível, é o poloxamer 407 (P407). As propriedades de gelificação *in situ* desse polímero permitem que formulações que o contenham sejam instiladas no olho na sua forma líquida em gota e, em contato com a superfície ocular, essa formulação altera suas características físicas tornando-se um gel no fundo do saco conjuntival. Essa particularidade torna possível a administração de quantidades precisas e reprodutíveis em contraste com as formulações gelificadas já existentes e, além disso, suas características de gel na superfície ocular promovem a retenção pré-corneana, tornando a formulação capaz de sustentar a liberação do fármaco em condições fisiológicas (AMMAR et al., 2010; GRATIERI et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi, portanto, desenvolver, caracterizar e avaliar nanoemulsões de gelificação *in situ* contendo uma associação de BET e o MOX para aplicação tópica ocular como alternativa para o tratamento pós-operatório de cirurgias intraoculares. O foco é tornar a aplicação mais cômoda por diminuir tanto a frequência de aplicação quanto o número de medicamentos utilizados, assim como reduzir absorção sistêmica dos fármacos pelo ducto nasolacrimal, aumentando, conseqüentemente, a adesão medicamentosa e o sucesso terapêutico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar nanoemulsões de geleificação *in situ* contendo uma associação de BET e MOX, além de avaliar seu efeito na penetração ocular dos fármacos visando a uma alternativa terapêutica mais cômoda e eficaz para o uso pós-operatório de cirurgias intraoculares.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar métodos analíticos para quantificar o BET e o MOX extraídos da córnea de suínos;
- Verificar a compatibilidade química entre o BET e o MOX e os excipientes utilizados no preparo das nanoemulsões;
- Obter nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A) adicionadas de P407 para geleificação *in situ*;
- Incorporar o BET e o MOX aos sistemas nanoemulsionados desenvolvidos e caracterizá-los quanto ao tamanho de gotícula, índice de polidispersividade (PDI), potencial zeta, pH e osmolaridade.
- Verificar o comportamento reológico dos nanossistemas desenvolvidos;
- Avaliar a estabilidade das nanoemulsões desenvolvidas por um período de 90 dias;
- Determinar *in vitro* o perfil de liberação dos fármacos a partir das nanoemulsões;
- Avaliar *ex vivo* a penetração ocular dos fármacos a partir das nanoemulsões levando-se em consideração o fluxo lacrimal existente em condições fisiológicas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Segmento anterior e posterior do olho

O olho é um órgão sensível protegido por sua anatomia complexa, contendo um epitélio impermeável, secreção lacrimal e vias de drenagem capazes de eliminar objetos estranhos (AGRAHARI et al., 2016). É composto por três camadas: (i) tecido conjuntivo, constituído pela córnea e pela esclera; (ii) tecido vascular compreendido pela coroide, pelos corpos ciliares e pela íris e (iii) tecido neural formado pela retina e pelo nervo óptico (AGRAHARI et al., 2016).

Anatomicamente, o globo ocular é dividido em segmento anterior e posterior, sendo que medicamentos administrados topicamente são capazes de atingir concentrações terapêuticas apenas no segmento anterior do olho (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2016). Nesse segmento encontram-se o corpo ciliar, a íris, o humor aquoso, a conjuntiva, a córnea e o cristalino, enquanto o segmento posterior do olho é formado pela esclera, coroide, retina, nervo óptico, mácula lútea e humor vítreo (Figura 1) (IMPERIALE; ACOSTA; SOSNIK, 2018).

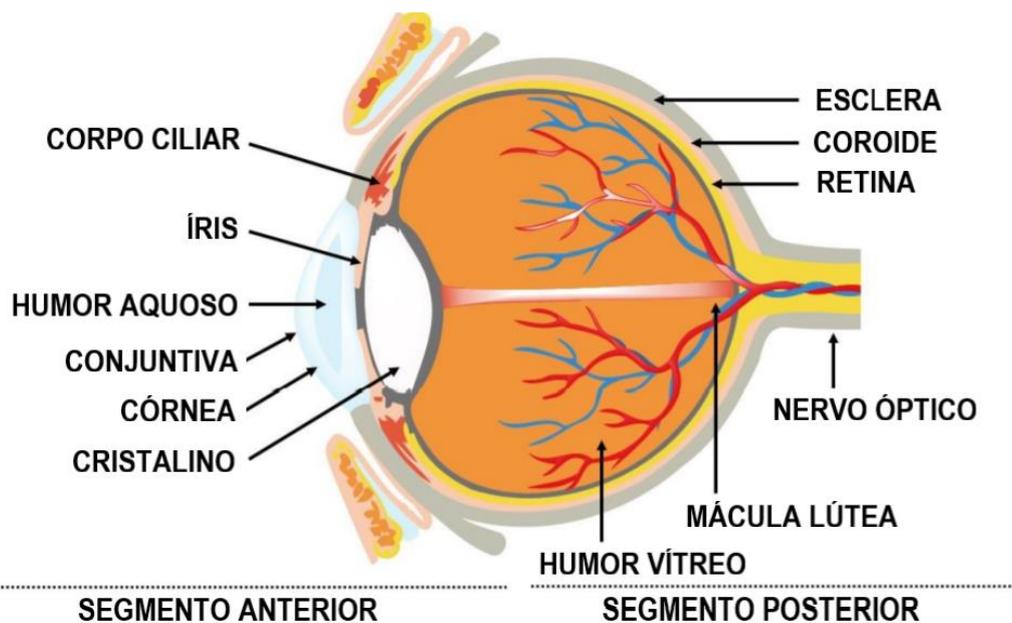


Figura 1. Estrutura anatômica do segmento anterior e posterior do olho (adaptado de IMPERIALE; ACOSTA; SOSNIK, 2018).

O corpo ciliar está localizado na ponta periférica do copo óptico, apresenta as funções de secretar humor aquoso, glicoproteínas, enzimas antioxidantes e neuropeptídeos, e de controlar a acomodação do cristalino por meio de contrações musculares, no foco à distância (MIESFELD; BROWN, 2019).

Conectada ao corpo ciliar pela raiz, está a íris, com as funções de regular a quantidade de luz que passa através do cristalino para a retina, de auxiliar a focar o cristalino em objetos próximos e de auxiliar a regulação da pressão intraocular através da circulação do humor aquoso (MIESFELD; BROWN, 2019).

O humor aquoso, produzido pelo corpo ciliar, preenche a câmara posterior (espaço atrás da íris e na frente do cristalino) e a câmara anterior (espaços entre a córnea e a íris). Dentre suas várias finalidades estão: o fornecimento de biomoléculas essenciais (eletrólitos, micromoléculas, cofatores de glicose e vitaminas) aos tecidos intraoculares, a remoção dos restos metabólicos celulares e a manutenção da pressão intraocular (HUANG; FRANCIS; WEINREB, 2018).

A conjuntiva é uma membrana mucosa que cobre a esclera anterior do olho e a superfície posterior das pálpebras. Possui células caliciformes que produzem a camada de mucina do filme lacrimal que está em contato direto com o epitélio da córnea (KELS; GRZYBOWSKI; GRANT-KELS, 2015).

Localizada na camada externa do globo ocular, atuando como uma barreira estrutural capaz de proteger as estruturas internas do olho contra infecções, e como a primeira superfície refrativa para focalizar a luz na retina, está um conjunto de tecidos transparentes avasculares chamado a córnea (Figura 2) (SRIDHAR, 2018). Essa estrutura consiste em cinco camadas: três tecidos (epitélio, estroma, endotélio) e duas interfaces (membrana de Bowman e membrana de Descemet) (DELMONTE; KIM, 2011).

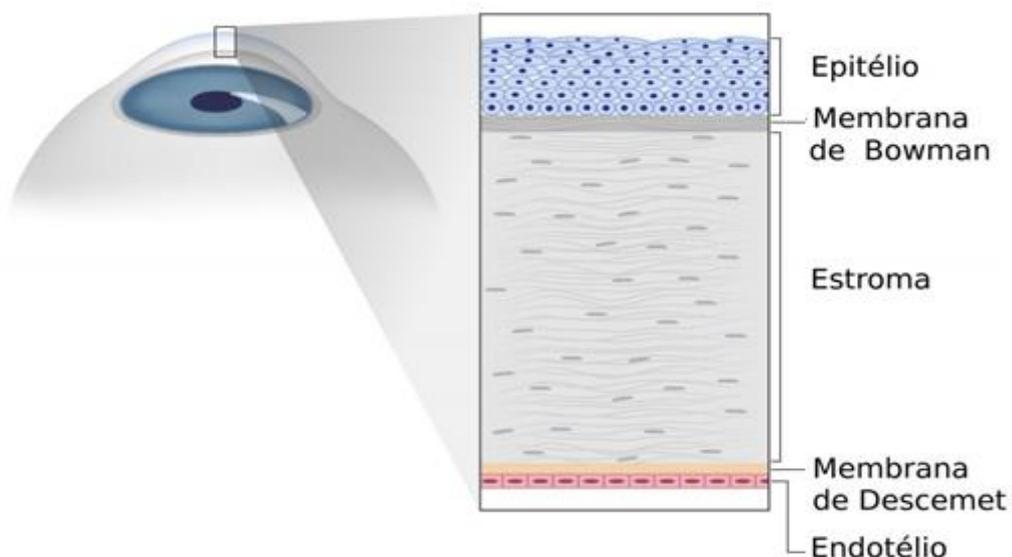


Figura 2. Camadas da córnea: epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio (adaptado de DESTRUDEL et al., 2017).

A superfície da córnea é protegida pelo filme lacrimal, uma camada trilaminar que consiste em uma camada lipídica anterior, uma fase aquosa média e uma camada posterior de mucina (KELS; GRZYBOWSKI; GRANT-KELS, 2015). Fazendo interface com o filme lacrimal está a superfície epitelial da córnea, camada essencial para o poder de refração do olho. Essa é a primeira barreira contra o ambiente externo, importante para prevenção da entrada de patógenos. É uma camada escamosa estratificada e não queratinizada, caracterizada por extrema uniformidade e alta capacidade de regeneração (DELMONTE; KIM, 2011; EGHRARI; RIAZUDDIN; GOTTSCH, 2015).

A membrana de Bowman está localizada logo após o epitélio e acima do estroma. Não é uma membrana verdadeira, mas sim um condensado acelular formado por fibras de colágeno. Essa camada tem aproximadamente 15 μm de espessura e ajuda a córnea a manter sua forma. Quando rompida, não se regenera, podendo formar uma cicatriz (DELMONTE; KIM, 2011; EGHRARI; RIAZUDDIN; GOTTSCH, 2015).

O estroma da córnea fornece a maior parte da sua estrutura, compreendendo aproximadamente 80% a 90% de sua espessura. É uma camada organizada em fibrilas de colágeno, empacotadas em lamelas paralelas, e em uma matriz extracelular composta de água, sais inorgânicos, proteoglicanos e glicoproteínas, produzida pela célula majoritária do estroma, os queratócitos. Essa camada avascular permite a transparência da córnea, facilitando a passagem da luz através das fibrilas de colágeno, sem que haja dispersão. Alterações no padrão dessas lamelas perturbam a transparência e resultam em perda de visão (DELMONTE; KIM, 2011; EGHRARI; RIAZUDDIN; GOTTSCH, 2015).

A membrana Descemet é a membrana basal do endotélio da córnea. Formada por fibrilas de colágeno, mede aproximadamente 3 μm de espessura em crianças, atingindo gradualmente a espessura de até 10 μm em adultos. Como membrana basal do endotélio da córnea, a membrana de Descemet auxilia na manutenção da desidratação corneal (DELMONTE; KIM, 2011; EGHRARI; RIAZUDDIN; GOTTSCH, 2015).

A última camada da córnea é a endotelial, uma estrutura de camada única, com 5 μm de espessura, que apresenta células hexagonais metabolicamente ativas. Esse ambiente é mantido relativamente desidratado, através de uma bomba de sódio e potássio endotelial, que regula o teor de água e de junções estreitas entre as células endoteliais. A deturgescência garante a transparência da córnea, maximizando a fidelidade da luz que atravessa a córnea. Ao contrário do epitélio, as células endoteliais não demonstram mitose *in vivo* e, quando há dano celular, ocorre uma migração de células para substituí-las (DELMONTE; KIM, 2011; EGHRARI; RIAZUDDIN; GOTTSCH, 2015).

Por fim, após a córnea, fica localizado o cristalino, uma lente transparente que funciona como a segunda superfície refrativa no olho. Essa lente realiza um processo chamado acomodação, em que muda de forma para focalizar a luz na retina e, assim, conseguir visualizar objetos em diferentes profundidades com nitidez. Estruturalmente, o cristalino é composto pela cápsula, pelo epitélio e pelas fibras. A cápsula é a camada mais externa que o envolve completamente. Essa membrana basal transparente participa da sua acomodação e o protege contra agentes patogênicos externos. A camada epitelial regula a pressão osmótica do cristalino, através de bombas de sódio e potássio. Além disso, é composta por células progenitoras que se dividem lentamente e de forma contínua ao longo da vida e, posteriormente, se diferenciam em fibras do cristalino. As fibras do cristalino diferenciadas produzem grandes quantidades de proteínas estruturais e, eventualmente, perdem seu núcleo e organelas para facilitar a transparência do tecido (MIESFELD; BROWN, 2019).

No segmento posterior está a esclera, composta por um tecido branco, fibroso e hidratado, que reveste todo o olho; essa estrutura é coberta por uma fina camada vascular, chamada episclera. Logo abaixo está a coroide, constituída por um tecido fibroso e altamente vascularizado. A parte mais interna do olho é formada pela retina, região vascular e inervada, responsável por converter os estímulos luminosos em sinal elétrico que será transmitido para o cérebro através do nervo óptico. Na retina, há uma região chamada mácula lútea, com concentração relativamente alta de cones, sendo que essa região permite a formação da imagem com maior nitidez. Por último, entre o cristalino e a retina, está o humor vítreo, uma estrutura semissólida que ajuda a manter a estrutura da retina, e consiste em 99% de água, colágeno residual e ácido hialurônico (NAYAK; MISRA, 2018).

3.2 Cirurgias intraoculares

Um órgão tão complexo como o olho pode ser acometido por diferentes doenças, dentre as quais muitas necessitam de correção cirúrgica, como catarata, erros refrativos, ceratocone, descolamento de retina, entre outros. Vários procedimentos cirúrgicos oftálmicos têm passado por melhorias tecnológicas para a correção dessas doenças.

3.2.1 *Cirurgia de catarata*

A catarata é uma doença ocular caracterizada pela perda da transparência do cristalino devido à sua opacificação, que leva a um déficit progressivo da capacidade visual (LIU et al., 2017). Essa doença é a causa de 40 a 60% dos casos de cegueira no mundo, e o seu aparecimento está relacionado à idade (CETINEL; MONTEMAGNO, 2015). A única forma disponível para o tratamento da catarata é através da remoção cirúrgica da lente opaca, o cristalino, e sua substituição por uma lente artificial (CETINEL; MONTEMAGNO, 2015).

Existem diferentes abordagens cirúrgicas para remoção do cristalino opaco, dentre elas: extração extracapsular da catarata (ECCE), facoemulsificação e cirurgia de catarata assistida por laser de femtosegundo (FLACS) com implante de lente intraocular. Quando comparada às outras técnicas, a ECCE apresenta desvantagens significativas, como maiores danos aos tecidos devido à sua grande incisão, maior tempo de operação e pior acuidade visual, por isso tem se tornando menos utilizada (LI; JIE, 2019). Atualmente, a facoemulsificação é amplamente empregada, sua técnica consiste em fazer uma microincisão na córnea, emulsificar ou microfragmentar o cristalino, através de um aparelho com ultrassom, e aspirá-lo para fora do olho (LI; JIE, 2019). A FLACS, por sua vez, demonstrou ter algumas vantagens em comparação com a cirurgia convencional de catarata, especialmente para a implantação de alguns dos novos tipos de lentes artificiais (LI; JIE, 2019). Sua técnica permite automatizar muitas etapas da cirurgia, incluindo a incisão na córnea, capsulotomia e fragmentação da lente (DAY et al., 2018).

3.2.2 *Cirurgias refrativas*

A cirurgia refrativa é um método para corrigir ou melhorar o erro refrativo, como miopia, hipermetropia, astigmatismo ou presbiopia (YESILIRMAK; DAVIS; YOO, 2016). Resumidamente, a miopia ocorre quando objetos distantes não são vistos em foco, uma vez que o foco se forma na frente da retina, fazendo como que a imagem fique borrada na fóvea. O contrário ocorre na hipermetropia, em que há dificuldade de focar objetos próximos, neste caso a imagem se foca atrás da retina. Já o astigmatismo ocorre devido à diferença do poder de refração em diferentes meridianos (direções), o que resulta em uma imagem distorcida. E a presbiopia, por sua vez, ocorre quando há uma progressiva diminuição na capacidade de focalizar objetos próximos, devido à perda de elasticidade do cristalino e à alterações estruturais na área das fibras do cristalino e do músculo ciliar (SCHIEFER et al., 2016).

Existem diversos procedimentos cirúrgicos, que evoluem continuamente, para correção desses erros refrativos. Amplamente, os procedimentos se caracterizam em corneano ou intraocular. Os procedimentos corneanos incluem técnicas como: incisional, ablação a laser ou ceratomileuse assistida por excimer laser *in situ* (LASIK). Essas técnicas envolvem processos como aplicação de laser na superfície ocular, dissecação do estroma da córnea, extração de tecido através de pequena incisão na córnea (DEL BARRIO et al., 2017; GANESH; BRAR; ARRA, 2017; TITIYAL et al., 2018), remoção do epitélio da córnea, e ablação a laser da camada de Bowman e do estroma da córnea (KIM et al., 2019; KURYAN; CHEEMA; CHUCK, 2017; YESILIRMAK; DAVIS; YOO, 2016). Já os procedimentos de refração intraocular incluem implantação de lente intraocular fática ou troca de lente refrativa (YESILIRMAK; DAVIS; YOO, 2016). Nesses procedimentos é realizada a implantação de uma lente intraocular, que dependendo da técnica pode ocorrer sem ou com remoção do cristalino (KIM et al., 2019).

Cada técnica apresenta vantagens e desvantagens e, assim, cada paciente deve ser avaliado individualmente no pré-operatório para que seja selecionada a que melhor o corresponda (YESILIRMAK; DAVIS; YOO, 2016).

3.2.3 *Cirurgia de ceratocone*

O ceratocone é um distúrbio corneano bilateral não-inflamatório, no qual o afinamento do estroma torna o formato da córnea cônico, resultando em astigmatismo e miopia (PARK; TSENG; LEE, 2019; RABINOWITZ, 1998).

As opções disponíveis para o tratamento do ceratocone incluem lentes de contato, crosslinking (CXL), implante de anel corneano intraestromal (ICRS) e ceratoplastia anterior lamelar ou penetrante (PKP) (PARK; TSENG; LEE, 2019). O CXL é um tratamento cirúrgico que visa a enrijecer a córnea usando uma combinação de luz ultravioleta-A e um cromóforo (vitamina B2, riboflavina) (SAAD et al., 2020). O ICRS, por sua vez, é um implante de uma prótese de acrílico que altera a curvatura da córnea, achatando a parte central e engrossando a periferia dessa estrutura ocular (PARK; TSENG; LEE, 2019). Contudo, em casos de ceratocone avançado, o paciente precisa realizar o transplante de córnea, cuja técnica cirúrgica é conhecida como PKP (ZIAEI et al., 2020).

3.2.4 *Cirurgia de glaucoma*

O glaucoma é caracterizado pelo aumento da pressão intraocular, resultante de uma neuropatia óptica ocasionada pela degeneração progressiva das células ganglionares da retina

(WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014). Os principais objetivos do tratamento do glaucoma são retardar a progressão da doença e preservar a qualidade de vida. O único método comprovado para o tratamento da doença é feito pela redução da pressão intraocular, de forma que a pressão desejada deve ser adquirida com o mínimo de medicamentos e o mínimo de efeitos adversos. Quando o tratamento medicamentoso não atinge a redução adequada da pressão intraocular com efeitos adversos aceitáveis, as cirurgias a laser ou incisionais são indicadas (WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014).

A trabeculoplastia a laser reduz a pressão intraocular induzindo alterações biológicas na malha trabecular, resultando em aumento do fluxo aquoso. O procedimento cirúrgico incisional mais comumente realizado para diminuir a pressão intraocular é a trabeculectomia, consiste na excisão de uma pequena porção da rede trabecular e tecido adjacente, com o objetivo de fornecer uma rota de drenagem do humor aquoso de dentro do olho para a conjuntiva, onde é absorvido (WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014).

3.2.5 Vitrectomia

A Vitrectomia Pars Plana é uma técnica cirúrgica dominante usada para cirurgia ocular do segmento posterior, que pode ser considerada para uma variedade de cenários clínicos, pois permite ao cirurgião acessar o humor vítreo e a retina (KOPECKY; NEMCANSKY, 2019; OMARI; MAHMOUD, 2019). Dentre as patologias que apresentam essa indicação cirúrgica estão: opacificação do humor vítreo; deslocamento da retina; remoção de hemorragia submacular ou inflamação intraocular (OMARI; MAHMOUD, 2019).

3.2.6 Retinopexia

O descolamento de retina ocorre quando há sua separação do epitélio subjacente, alterando o funcionamento normal da retina, o que pode ocasionar uma perda profunda de visão no olho afetado. Dentre as opções cirúrgicas, está a retinopexia, cuja técnica resumidamente é a aplicação de uma injeção de gás na cavidade vítrea para fechamento de rupturas da retina, seguida da remoção do líquido sub-retiniano, e aplicação de laser nas rupturas da retina (HILLIER et al., 2019; STEEL, 2014).

O **Quadro 1** resume as cirurgias comuns dos segmentos anterior e posterior do olho, trazendo uma breve descrição de cada doença e apresentando os princípios cirúrgicos.

Quadro 1. Cirurgias comuns do segmento anterior e posterior do olho, descrição da doença e princípio cirúrgico.

Cirurgia	Descrição da doença	Princípio cirúrgico
Cirurgia de Catarata	Perda da transparência do cristalino devido à sua opacificação (LIU et al., 2017)	Microfragmentação e remoção do cristalino opaco (LI; JIE, 2019)
Cirurgia refrativa	Método para corrigir ou melhorar o erro refrativo, como miopia, hipermetropia, astigmatismo ou presbiopia (YESILIRMAK; DAVIS; YOO, 2016)	Alteração da curvatura da córnea (KIM et al., 2019)
Cirurgia de Ceratocone	Condição na qual a córnea assume uma forma cônica como resultado do afinamento não-inflamatório do seu estroma (RABINOWITZ, 1998)	Regularizar a deformação da córnea pela implantação de anéis intraestromais (PARK; TSENG; LEE, 2019)
Cirurgia de Glaucoma	Neuropatia óptica caracterizada pela degeneração progressiva das células ganglionares da retina, esse dano ao nervo óptico leva a um aumento da pressão intraocular (WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014)	Aplicação de laser para realizar drenagem do humor aquoso e permitir a diminuição da pressão intraocular (WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014)
Vitrectomia	Opacificação do humor vítreo; deslocamento da retina; remoção de hemorragia submacular ou inflamação intraocular (OMARI; MAHMOUD, 2019)	Remoção do humor vítreo (OMARI; MAHMOUD, 2019)
Retinopexia	Descolamento de retina (STEEL, 2014)	Injeção de gás na cavidade vítrea para fechamento de rupturas da retina, remoção do líquido sub-retiniano, aplicação de laser nas rupturas da retina (STEEL, 2014)

Apesar de toda tecnologia, cirurgias oculares são um processo invasivo que envolvem a manipulação e incisão do tecido ocular, em que o processo de regeneração do epitélio e a cicatrização da superfície ocular levam algum tempo, período durante o qual os pacientes podem sentir dor e flutuações visuais (JONES; NEVILLE, 2013; KIM et al., 2019; KURYAN; CHEEMA; CHUCK, 2017; NAGPAL et al., 2014). Semelhante à maioria dos outros procedimentos cirúrgicos, os procedimentos cirúrgicos oftálmicos apresentam uma reação

fisiológica comum de inflamação e de infecção no período pós-operatório imediato. Portanto, os agentes terapêuticos oftálmicos corticoide e antibiótico são essenciais para o manejo pós-operatório em cirurgias oculares (MOHAMMADI et al., 2018).

3.3 Aplicação tópica ocular de colírios utilizados no tratamento pós-operatório de cirurgias intraoculares

O uso de antibióticos e corticoides é uma medida preventiva comum no pós-operatório de cirurgias intraoculares. O antibiótico controla a proliferação de bactérias potencialmente patogênicas, além de ser usado profilaticamente para reduzir a flora bacteriana na conjuntiva lesada, diminuindo o risco de contaminação intraocular. Enquanto isso, o uso de corticoide suprime a dor e a inflamação ocular pós-operatória, uma vez que o trauma cirúrgico resulta em sinais e sintomas clássicos da inflamação, como reação da câmara anterior, vermelhidão, dor, inchaço, fotofobia, lacrimejamento, diminuição da acuidade visual e prurido (HARIPRIYA, 2017; LYSENG-WILLIAMSON, 2013; SHOKOOHI-RAD et al., 2018).

Com o intuito de acelerar a recuperação e prevenir as complicações pós-cirúrgicas, portanto, os pacientes devem utilizar colírios, sendo um antibiótico, um corticosteroide e/ou um anti-inflamatório não esteroideal (ÁVILA; MUCCIOLI; HÖFLING-LIMA, 2008; THOMPSON; LAKHANI, 2015). A aplicação tópica de soluções oftálmicas de antibióticos e corticoesteroides é segura e eficaz (GOMES et al., 2017). Os antibióticos tópicos são frequentemente aplicados, por um período de 1 a 2 semanas no pós-operatório até a incisão cicatrizar completamente (HARIPRIYA, 2017) e os corticoides, também usados com frequência, são aplicados por um período de até 4 meses (MOHAMMADI et al., 2018).

O MOX (Figura 3) é uma fluoroquinolona de quarta geração, cuja ação antibiótica provém da inibição da topoisomerase II – ácido desoxirribonucleico (DNA) girase e topoisomerase IV. A primeira é uma enzima que atua na replicação, transcrição e reparação do DNA da bactéria, enquanto a segunda atua na divisão do DNA cromossômico durante a divisão bacteriana. É utilizado para reduzir os riscos de endoftalmite pós-operatória, uma complicação que pode levar à perda de visão (HARIPRIYA, 2017; RAM et al., 2001; SHOSS; TSAI, 2013). Esse fármaco se tornou o antibiótico de escolha para muitos cirurgiões oftalmológicos, devido às suas propriedades altamente bactericidas e amplo espectro de ação contra organismos gram-positivos e gram-negativos (DA CUNHA et al., 2013; GOMES et al., 2017).

A terapia combinada tópica do agente antibacteriano e do agente anti-inflamatório pode beneficiar pacientes que se submeteram a cirurgias oculares (GOMES et al., 2017). Assim, esses pacientes poderiam reduzir o número total de gotas administradas no dia e número de frascos com os quais iria lidar. Isso poderá resultar numa melhor adesão ao tratamento e, portanto, em uma melhor eficácia terapêutica (GOMES et al., 2017; SINHA et al., 2019), além de limitar os efeitos colaterais quando comparados com a administração sistêmica dos fármacos (IMPERIALE; ACOSTA; SOSNIK, 2018).

O tratamento tópico combinado de esteroides e de antibióticos é amplamente utilizado para controlar a inflamação e infecção após procedimentos cirúrgicos do segmento anterior do olho (GOMES et al., 2017). Contudo, a anatomia complexa e as barreiras fisiológicas do olho dificultam a entrada e a liberação de fármacos aplicados topicamente nesse sítio de ação. O olho apresenta diversos mecanismos de defesa contra agentes externos que reduzem o tempo de permanência do medicamento no olho (MAHOR et al., 2016), fazendo com que sejam necessárias repetidas aplicações.

3.4 Barreiras da permeação ocular após administração tópica

Existem várias barreiras fisiológicas e anatômicas que restringem a permeação de fármacos aplicados topicamente até o segmento anterior do olho (Figura 5). Essas barreiras podem ser dinâmicas (lacrimejamento, drenagem nasolacrimal, fluxo sanguíneo conjuntival, fluxo linfático), metabólicas e estáticas (epitélio da córnea e estroma da córnea) (AGRAHARI et al., 2016; GOTE et al., 2019; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2016).

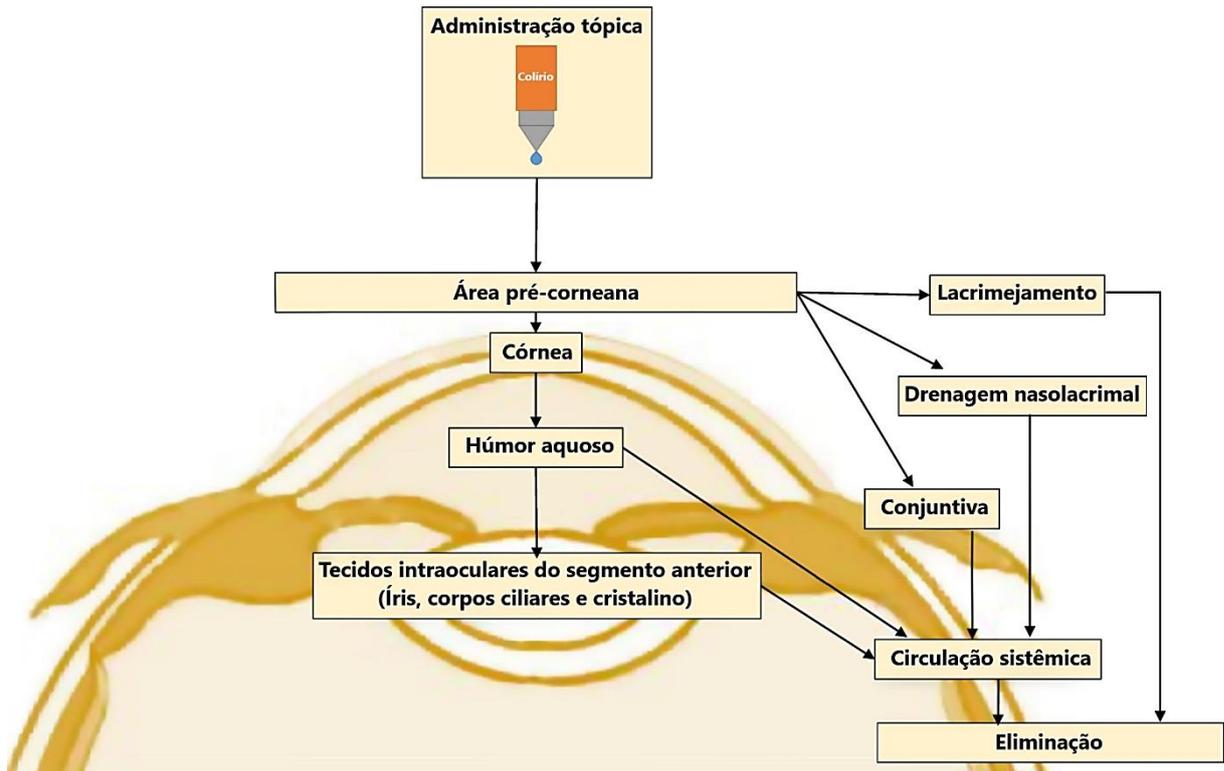


Figura 5. Barreiras enfrentadas pelo fármaco após administração tópica ocular (Adaptado de JANAGAM; WU; LOWE, 2017).

As lágrimas mantêm a conjuntiva e a córnea úmidas e saudáveis, por isso são produzidas continuamente pelas glândulas lacrimais e através do reflexo de piscar são distribuídas na superfície dos olhos, para posteriormente serem drenadas para o nariz. Além disso, formam o filme lacrimal, um fluido aquoso tamponado (pH 7,4), contendo eletrólitos, lipídios e proteínas (lisozima, albumina ou glicoproteínas, como a mucina) (KELS; GRZYBOWSKI; GRANT-KELS, 2015; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2016). Após a administração ocular de medicamentos, o fármaco é acumulado no saco conjuntival e misturado com a lágrima. Ele pode se ligar à proteínas ou ser parcialmente hidrolisado por enzimas do filme lacrimal, reduzindo a biodisponibilidade ocular. Ainda, devido à produção permanente e à rotatividade das lágrimas, o tempo de contato do fármaco com os tecidos da superfície ocular é relativamente curto, de aproximadamente 2 minutos, fazendo com que em formas convencionais de medicamentos os fármacos sejam rapidamente eliminados pelo ducto nasolacrimal e absorvidos pela circulação sistêmica (AGRAHARI et al., 2016; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2016).

Existem diversos fatores que influenciam a taxa de drenagem de fármacos para o ducto nasolacrimal, entre eles (AGRAHARI et al., 2016):

- Volume instilado: quanto maior o volume instilado, maior será a taxa de drenagem da solução do saco conjuntival;
- Viscosidade: o aumento da viscosidade de uma dose instilada pode prolongar o tempo de permanência da solução no saco conjuntival;
- pH: O pH fisiológico do líquido lacrimal é 7,4. Quando uma solução ácida ou alcalina é instilada, ocorre uma secreção excessiva de lágrimas e perda de fármaco. As preparações oftálmicas são geralmente ajustadas ao pH na faixa de 6,6 a 7,8;
- Tipo de fármaco: o fármaco pode alterar o processo fisiológico ocular normal, como inibir a produção lacrimal;
- Tonicidade: A formulação oftálmica para administração tópica deve ser isotônica com lágrima, pois pode ocorrer, por exemplo, a imediata diluição de formulações hipertônicas pelas lágrimas.

Assim, após a instilação, aproximadamente 80 a 90% do volume instilado é drenado para o ducto nasolacrimal e atinge a via sistêmica. Essa drenagem é um mecanismo de proteção natural que permite sempre manter o volume de líquido pré-corneano em torno de 7 a 10 μL (AGRAHARI et al., 2016; BACHU et al., 2018).

Uma outra via de perda de fármacos pela absorção sistêmica ocorre na conjuntiva do olho, que apresenta um estroma com barreiras dinâmicas como as circulações sanguínea e linfática, constituindo um obstáculo à entrada de fármacos. Ainda, as junções estreitas das células epiteliais externas impedem a permeação paracelular de fármacos. Os fármacos que conseguem permear mais facilmente essa barreira são hidrofílicos e apresentam baixo peso molecular (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2016). Além disso, a conjuntiva expressa proteína de efluxo, como a P-glicoproteína 1, que promove o efluxo de fármacos do citoplasma celular (BACHU et al., 2018).

A córnea é a maior barreira anatômica estática que impede o transporte de fármacos para o olho. O epitélio da córnea controla seletivamente a penetração dos fármacos - seu caráter lipofílico contribui como barreira para 90% dos fármacos hidrofílicos e para 10% dos fármacos lipofílicos. O transporte dos fármacos pode ocorrer pela via paracelular e transcelular. A via paracelular é a via predominante para fármacos hidrofílicos ou de baixo peso molecular, enquanto a via transcelular, para fármacos lipofílicos. Após o epitélio lipofílico existe o estroma com caráter hidrofílico resultante da presença de fibras colágenas, evitando a difusão de agentes altamente lipofílicos. Por último, o endotélio da córnea é mais uma camada lipofílica, que consiste em uma monocamada de células que expressam bombas de fluido de membrana que

movem ativamente o fluido do estroma de volta para a câmara anterior do olho, mantendo uma barreira eficaz entre o estroma e o humor aquoso (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2016). A córnea atua como um reservatório do fármaco, liberando-o lentamente no humor aquoso, onde os níveis diminuem gradualmente. Em seguida, o fármaco é distribuído do humor aquoso para os tecidos intraoculares e é eliminado principalmente por meio da renovação do humor aquoso e do fluxo sanguíneo (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2016).

Os fármacos que conseguem permear a córnea enfrentam ainda a barreira hemato-aquosa, composta pelas camadas celulares da íris e dos corpos ciliares. Essa barreira controla a travessia de solutos entre a câmara anterior (situada entre a córnea e a íris) e posterior (situada entre a íris e o cristalino). As paredes da câmara anterior, diferentemente da câmara posterior, são altamente permeáveis e permitem a livre troca de macromoléculas entre o humor aquoso e os espaços do tecido conjuntivo da íris e córnea (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2016). A permeabilidade dos medicamentos através dessa barreira é determinada pela pressão osmótica e pelas características físico-químicas das moléculas do fármaco (GOTE et al., 2019).

Portanto, em consequência da baixa biodisponibilidade ocular, que advém da estrutura e das propriedades biofisiológicas da córnea, além dos limites de volume do fármaco que pode ser acomodado no olho, os medicamentos instilados topicamente necessitam de uma aplicação frequente e de quantidades concentradas do princípio ativo, o que pode resultar em dano da córnea e em reações adversas causadas pela absorção sistêmica dos medicamentos pelo ducto nasolacrimal (AWWAD et al., 2017; PAULSAMMY et al., 2018). Ainda, essa baixa biodisponibilidade restringe o uso de administração tópica para tratar distúrbios da câmara anterior do olho, enquanto outras vias de administração são necessárias para atingir o segmento posterior (IMPERIALE; ACOSTA; SOSNIK, 2018). Todas essas características motivam a proposta de promoção de administração tópica por meio de nanoemulsões de gelificação *in situ* contendo BET e MOX, de modo a contornar os problemas de frequência de aplicação de medicamentos tópicos oculares em pacientes submetidos às cirurgias oculares e diminuir as reações adversas ocasionadas pela absorção sistêmica do ducto nasolacrimal.

3.5 Nanoemulsões de geleificação *in situ*

A ciência e tecnologia das aplicações de diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças e intervenções médicas de alto grau de especificidade utilizando as ferramentas de nanotecnologia, é conhecida como nanomedicina. Tal ciência tem como objetivo compreender melhor as bases fisiopatológicas das doenças de modo que se possa trabalhar em nível

molecular, utilizando nanoestruturas capazes de produzir terapias mais eficazes (CHANG et al., 2015).

Devido à sua alta estabilidade e capacidade transportadora, à capacidade de incorporação de substâncias tanto hidrofóbicas como hidrofílicas e à sua versatilidade em relação às formas de administração, os produtos nanotecnológicos têm se tornado uma ferramenta importante para o desenvolvimento científico de sistemas de liberação de fármacos (GUPTA et al., 2014).

Nanoemulsões consistem em dois líquidos imiscíveis (uma fase aquosa e uma oleosa) nos quais um líquido é disperso como nanogotículas no outro, sendo estabilizadas pelo uso de concentrações definidas de tensoativos – moléculas anfifílicas capazes de reduzir a tensão interfacial e prevenir a agregação das gotículas (ALI et al., 2017). Dependendo dos constituintes, as nanoemulsões podem ser denominadas bifásicas (Figura 6) – água em óleo (A/O), em que a fase aquosa é dispersa na fase oleosa ou óleo/água (O/A), em que a fase oleosa é dispersa na fase aquosa – ou múltiplas – água em óleo em água (A/O/A) ou óleo em água em óleo (O/A/O). As nanoemulsões apresentam diâmetro médio de gotículas que varia entre 20 a 600 nm, o que lhes confere uma aparência transparente, translúcida ou levemente opaca (SINGH et al., 2017; SOOD; JAIN; GOWTHAMARAJAN, 2014; YUKUYAMA et al., 2016).

Assim como as nanoemulsões, as microemulsões são dispersões coloidais fabricadas a partir de tensoativo, água e óleo. Contudo, por serem sistemas termodinamicamente estáveis, podem ser formadas espontaneamente, sem que qualquer energia externa seja fornecida. Em contraste, as nanoemulsões sempre requerem a aplicação de alguma energia externa para converter os componentes separados em uma dispersão coloidal, por serem sistemas termodinamicamente instáveis. A forma como a energia externa é aplicada para formar uma nanoemulsão varia amplamente, dependendo do método de preparação utilizado (MCCLEMENTS, 2012).

Frequentemente, é difícil distinguir entre esses dois tipos de dispersões coloidais simplesmente olhando para o sistema, medindo a distribuição de diâmetro das gotículas, ou com base nos métodos usados para fabricá-las. Por exemplo, o método de emulsificação espontânea, uma dispersão coloidal opticamente transparente é formada quando uma mistura de surfactante e óleo é adicionada a uma solução aquosa com agitação suave. Essas dispersões formadas por esta abordagem podem ser microemulsões ou nanoemulsões dependendo da razão surfactante para óleo (SOR): em SOR mais alto uma microemulsão é formada, mas em SOR baixo uma nanoemulsão é formada (MCCLEMENTS, 2012). Pela definição, o sistema desenvolvido neste trabalho se trata de uma microemulsão, contudo considerando o diâmetro

das gotículas obtido e que alguns autores já não fazem essa distinção nos trabalhos, a formulação produzida será chamada de nanoemulsão.

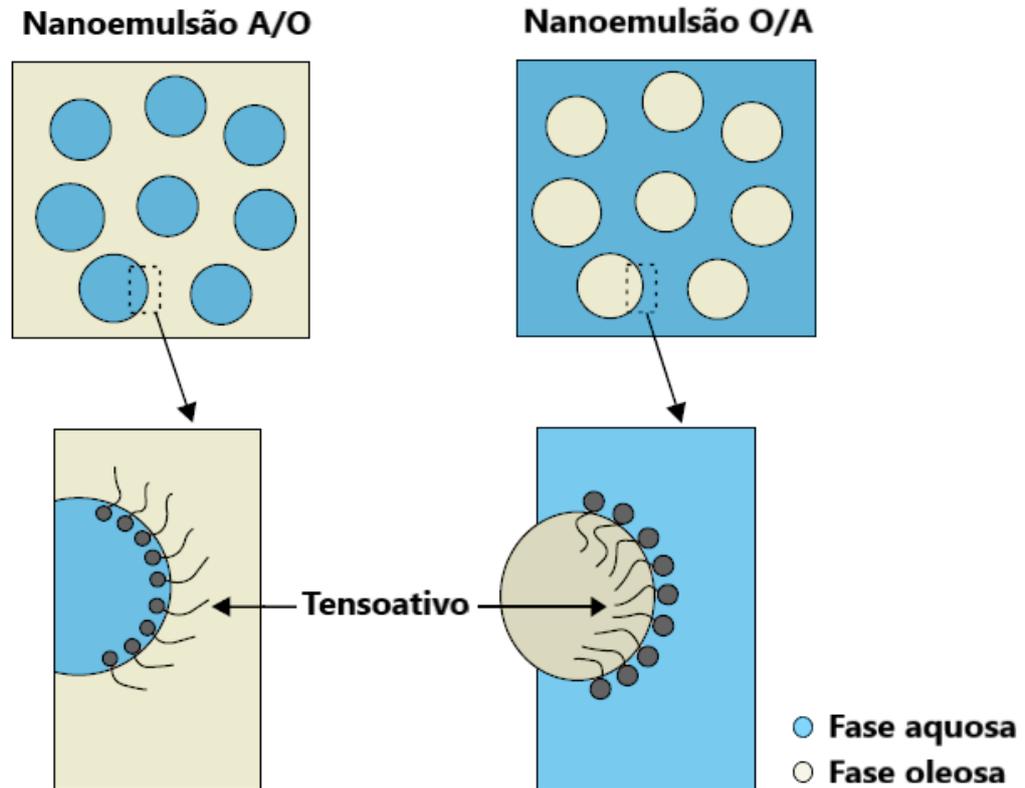


Figura 6. Nanoemulsões bifásicas do tipo A/O e O/A, indicando a orientação do tensoativo na interface água e óleo, em que a cabeça polar se orienta para a fase aquosa, enquanto a cauda apolar, para a fase oleosa (Adaptado de KUMAR et al., 2019).

As nanoemulsões podem ser preparadas por métodos de alta energia, como homogeneização à alta pressão, microfluidização e ultrassonificação; e de baixa energia, como inversão de fase e emulsificação espontânea. Enquanto nos métodos de alta energia os aparelhos utilizam fortes forças disruptivas, capazes de quebrar gotículas grandes em gotículas de tamanho nano; os métodos de baixa energia usam a energia química interna dos sistemas e requerem apenas agitação suave para a produção das nanoemulsões, o que os tornam mais eficientes em termos energéticos (KUMAR et al., 2019).

Na homogeneização à alta pressão há uma turbulência intensa e em fluxo de cisalhamento que mistura a fase oleosa e a fase aquosa sob alta pressão. A turbulência severa leva formação de pequenas gotículas, formando nanoemulsões de tamanho inferior à 100 nm (RAI et al., 2018). Já na técnica de microfluidização, a emulsificação ocorre através da colisão de correntes de dois fluidos imiscíveis que se deslocam em um microcanal sob alta pressão, e a

nanoemulsão é submetida à várias passagens pelo aparelho para garantir uma uniformidade de tamanho (RAI et al., 2018).

Comparado a esses métodos de alta energia, o ultrassom (Figura 7) é o que requer menos gasto energético. Esse método depende de ondas sonoras. O sonicador de ponta é um equipamento que contém um cristal de quartzo piezoelétrico que gera uma intensa força disruptiva em sua ponta. As ondas ultrassônicas produzem bolhas de cavitação que crescem continuamente até implodirem. Essa implosão gera o colapso das bolhas, que são causados pelas flutuações de pressão da onda ultrassônica, reduzindo o seu tamanho. Esse método pode ser usado para formar nanoemulsão ou reduzir o tamanho de uma emulsão pré-formada. Uma forma de reduzir o tamanho das gotículas é aumentando o tempo de sonicação e da potência (SINGH et al., 2017). O processo consiste no preparo de uma emulsão que é submetida ao ultrassom de ponta em diferentes amplitudes por curtos ciclos de tempo até que as propriedades desejadas da nanoemulsão sejam obtidas (SINGH et al., 2017).

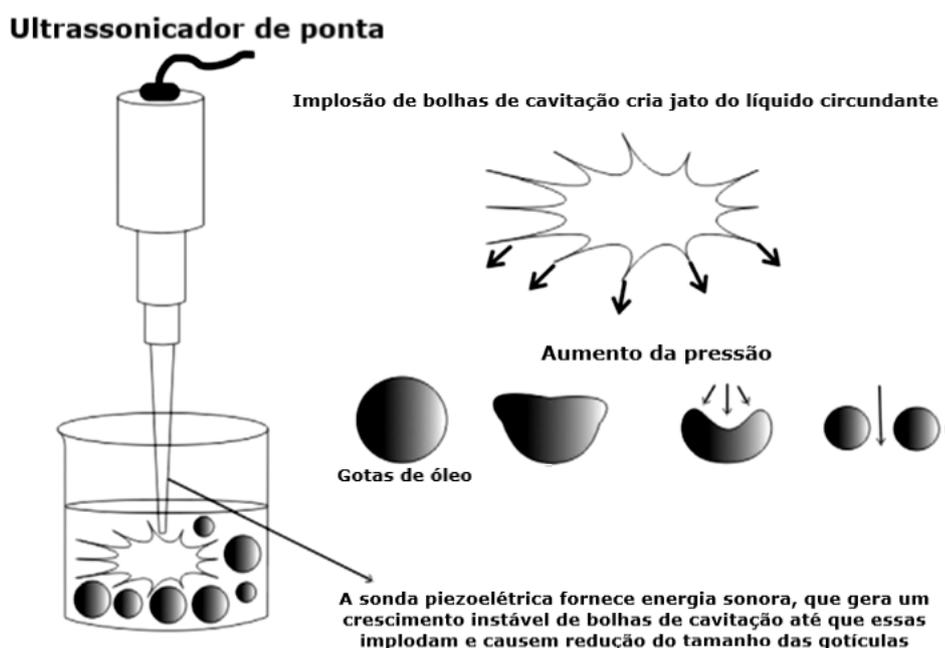


Figura 7. Mecanismo de funcionamento do ultrassom de ponta para produção de nanoemulsões pela geração de alta energia sonora (Adaptado de SINGH et al., 2017).

Em relação às técnicas de baixa energia, no método de inversão de fase a formação de nanoemulsões pode ocorrer por inversão de fase transicional (IFT) e por inversão de fase catastrófica (IFC). Na IFT as nanoemulsões se formam explorando alterações na solubilidade de tensoativos em resposta à flutuação da temperatura ou da composição da formulação. Dessa forma, subdivide-se em dois tipos: temperatura de inversão de fase e inversão da composição

de fase. Na temperatura de inversão de fase, a solubilidade do tensoativo é invertida pela mudança de temperatura, permitindo a produção da nanoemulsão; na inversão de composição de fase, ao invés de alterar a temperatura, altera-se a composição da formulação (KUMAR et al., 2019; SINGH et al., 2017). A IFC, por sua vez, ocorre quando a fase dispersa é adicionada continuamente até que se formem fases estruturais lamelares. A catástrofe significa uma mudança repentina no comportamento de um sistema, devido a mudanças nas condições. Diferente da IFT, na IFC não ocorre alteração na solubilidade do tensoativo (KUMAR et al., 2019).

Pelo método de emulsificação espontânea (Figura 8), as moléculas de tensoativo se difundem rapidamente da fase dispersa para a fase contínua, causando turbulência e criando gotículas de emulsão de tamanho nano (KUMAR et al., 2019). O procedimento envolve o preparo de duas fases: uma aquosa contendo um tensoativo hidrofílico e outra oleosa, contendo tensoativo lipofílico. A fase oleosa é adicionada gota a gota à fase aquosa sob agitação, da mesma forma, a fase aquosa pode ser adicionada à oleosa, para formar emulsões em nanoescala (SINGH et al., 2017).

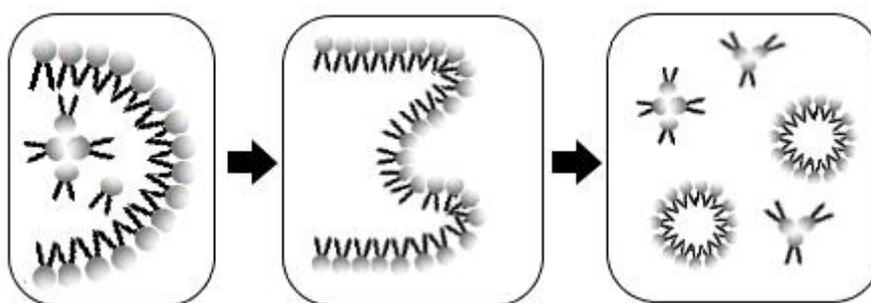


Figura 8. Representação esquemática do método de emulsificação espontânea (Adaptado de RAI et al., 2018).

Entre as grandes vantagens desses sistemas nanoemulsionados para a administração de fármaco está a versatilidade de vias de administração, como tópica, oral, intravenosa, nasal e ocular (SINGH et al., 2017). Por proporcionarem boa permeabilização de membranas, entrega direcionada de fármacos, facilidade de esterilização e capacidade de acomodar fármacos hidrofílicos e lipofílicos, elas são muito promissoras no campo de fármacos oftalmológicos. Dessa forma, são capazes de promover uma ação terapêutica mais rápida com uma dose menor de fármaco aplicado, resultando em menos efeitos adversos oculares e sistêmicos (AMMAR et al., 2010; KAUR; KAKKAR, 2014). Contudo, por ser líquido, esse sistema não é o mais adequado para a liberação ocular prolongada de fármacos (AL-HALAFI, 2014), já que, assim como os colírios convencionais, seriam drenados facilmente em um curto espaço de tempo.

Assim, uma forma de contornar essa situação é através da adição de um polímero de gelificação *in situ*.

Géis *in situ* referem-se a soluções poliméricas administradas como líquidos que passam por uma transição de fase para géis semissólidos após exposição à ambientes fisiológicos. O P407 apresenta propriedades únicas de gelificação termorreversível, o que o tornou um dos materiais responsivos à temperatura mais amplamente investigado. Suas propriedades gelificantes *in situ* permitem que seja instilado no olho na forma líquida (gota), passando para uma fase de gel no fundo do saco conjuntival. A principal vantagem de formulações contendo esse polímero é a possibilidade de administrar quantidades precisas e reprodutíveis em contraste com as formulações gelificadas já existentes. Além disso, a viscosidade da formulação *in situ* favorece a retenção pré-corneana, tornando-a capaz de sustentar a liberação do fármaco em condições fisiológicas (AMMAR et al., 2010; GRATIERI et al., 2010).

Desta forma, fármacos hidrofóbicos como o BET (SONAWANE et al., 2014), que são difíceis de formular como gotas aquosas para entrega ocular (KAUR; KAKKAR, 2014), e hidrofílicas como o MOX (KHURANA et al., 2018; SHUKLA et al., 2014), que apresentam baixa permeabilidade através dos tecidos oculares (IMPERIALE; ACOSTA; SOSNIK, 2018; KAUR; KAKKAR, 2014), incorporadas em nanoemulsões de gelificação *in situ* podem ter seus perfis farmacocinéticos melhorados, evitando assim sua degradação física, química e biológica; além disso, podem apresentar uma melhora significativa da sua biodisponibilidade, permitindo que haja uma redução da dosagem do fármaco e com isso uma eficaz minimização das reações adversas (AKO-ADOUNVO et al., 2014; AL-HALAFI, 2014; SOUZA et al., 2014).

Portanto, a administração tópica de nanoemulsões de gelificação *in situ* contendo BET e MOX foram desenvolvidas e investigadas neste estudo para verificar sua capacidade de melhorar a biodisponibilidade, promover uma liberação prolongada e melhorar as propriedades físico-químicas dos fármacos, como solubilidade e estabilidade. Conseqüentemente, espera-se diminuir a frequência de aplicação desses medicamentos, reduzir as reações adversas e, além disso, permitir que uma única formulação seja capaz de atender diferentes aspectos de um tratamento, por apresentar dois princípios ativos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O BET foi gentilmente fornecido pela Aché (São Paulo, Brasil). O MOX foi gentilmente fornecido pela Eurofarma (São Paulo, Brasil). Os padrões analíticos de ambos os fármacos (BET e MOX > 99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Para o preparo das nanoemulsões, o oleato de etila e o Cremophor[®] EL foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o PluroI[®] oleique foi gentilmente fornecido pela Gatefossè (Saint-Priest, França). O P407 foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Para as análises em *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), foram utilizados acetonitrila e metanol grau HPLC, adquiridos da J.T Barker (Philisburg, EUA), e ácido fosfórico adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Todas as análises foram realizadas com água ultrapura (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França). Para preparo do tampão fosfato pH 7,4, o fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio monohidratado foram fornecidos pela Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), e as adequações de pH foram realizadas com ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil). A membrana sintética de celulose (*dialysis tubing cellulose membrane*) utilizada em ensaios de liberação foi adquirida da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

4.2 Métodos analíticos para quantificação de BET e MOX

A quantificação do BET e do MOX foi realizada em um HPLC, modelo Shimadzu LC 20-AD, composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um injetor automático (modelo 9SIL-20AD) e forno de coluna (modelo CTO-20AS), acoplados a um detector espectrofotométrico DAD (modelo SPD M20A) e a um computador equipado com o programa de análise cromatográfica Shimadzu LC. Foram desenvolvidos dois métodos analíticos, com o objetivo de quantificar adequadamente cada fármaco, e separar esses analitos de interesse dos possíveis interferentes contidos na formulação, na matriz biológica e no meio receptor utilizado nos estudos de penetração ocular.

Para a análise cromatográfica do BET foi utilizada uma coluna de fase reversa C₈ (150 mm x 4,6 mm) da Zorbax Eclipse Plus (Santa Clara, EUA). A fase móvel foi composta pelo solvente A (água ultrapura) e solvente B (acetonitrila) seguindo o gradiente de eluição e vazão descritos na Tabela 1. O volume de injeção das amostras foi de 25 µL, o forno foi utilizado à temperatura de 45°C e a detecção no UV foi realizada em 245 nm.

Tabela 1. Eluição por gradiente e vazão para análise cromatográfica do BET.

Tempo (min)	Solvente B (%)	Vazão (mL/min)
0-8	47	1,0
8-12	55	1,2
12-18	47	1,0

Para a análise cromatográfica do MOX foi utilizado uma coluna de fase normal μ porasil (10 μ m, 125Å, 3,9 mm x 300 mm) (Cambridge, EUA). A fase móvel foi composta pela mistura na proporção de 24:76 (v/v) do solvente A (ácido fosfórico 0,01 M) e do solvente B (metanol). A vazão foi de 0,8 mL/min, o volume de injeção das amostras foi de 25 μ L, o forno foi utilizado à temperatura de 40° C e a detecção no UV foi realizada em 290 nm.

4.3 Validação dos métodos analíticos

Os métodos foram validados conforme as diretrizes do *International Council for Harmonisation* (ICH) e da RDC N° 166, de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em termos de linearidade, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação.

4.3.1 Seletividade

A avaliação da seletividade tem como objetivo garantir a quantificação adequada dos fármacos em meio aos interferentes (ANVISA, 2017; ICH, 2005). Para avaliação, foram injetadas no HPLC amostras de MOX e BET contaminadas com 7 μ L da nanoemulsão contendo, Cremophor® EL, Plurol® oleique, oleato de etila e P407, com uma solução metanólica do extrato de córnea suína, preparada conforme descrito abaixo no item 4.3.4; e com meio receptor (solução de propilenoglicol a 40%) utilizado no estudo de penetração. As análises foram realizadas em sextuplicata (n=6), em que seis soluções-estoque dos fármacos em metanol foram preparadas, na concentração de 100 μ g/mL, em seguida, foram diluídas a uma concentração de 10 μ g/mL contendo ou não os contaminantes, para a análise em HPLC. Comparou-se as áreas obtidas aos picos referentes à cada fármaco entre as amostras com e sem contaminantes.

Os dados quantitativos foram apresentados em uma Figura como média \pm desvio padrão da média das 6 replicatas. A análise estatística dos dados foi realizada com a utilização do programa *GraphPad Prism 8.0*. Diferenças significativas entre conjuntos de dados foram

verificadas por análise de variância *one way ANOVA*, seguido de teste de Tukey com comparação múltipla dos dados. O nível de significância estatística foi aceito como ($p \leq 0,05$).

4.3.2 Linearidade

Curvas analíticas foram construídas, em triplicata para cada concentração, a partir de soluções estoque de MOX e BET em metanol, na concentração de 100 µg/mL. A partir das soluções estoque foram preparadas 3 curvas de calibração, com uma faixa de concentração dos fármacos variando entre 1,25 e 20,0 µg/mL.

A análise da linearidade em HPLC foi avaliada a partir da regressão linear da curva obtida plotando-se concentração *versus* área do pico cromatográfico, obtendo-se uma equação do tipo $y = ax + b$, onde (a) corresponde ao coeficiente angular e (b) ao coeficiente linear. As faixas lineares foram calculadas utilizando-se o coeficiente de correlação linear (r), em que o valor mínimo aceitável foi igual a 0,990 (ANVISA, 2017).

Considerando que o efeito matriz é uma alteração da resposta do analito devido a componentes interferentes na matriz da amostra (ICH, 2019), durante a validação do método foi necessário avaliar se a curva de linearidade dos fármacos sofria alguma alteração frente aos possíveis interferentes das matrizes utilizadas nos estudos de liberação e penetração corneal dos fármacos. Assim, seguindo a mesma metodologia das curvas preparadas em metanol, também foram realizadas curvas dos fármacos em solução aquosa de propilenoglicol 40% (v/v) (que servirá de meio receptor para os ensaios de liberação e penetração corneal) e em extrato metanólico da córnea.

O efeito matriz que os contaminantes poderiam gerar sobre as análises de cada fármaco foi determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com os fármacos em metanol e com os fármacos nas matrizes (ANVISA, 2017; OLIVEIRA et al., 2020), seguindo a seguinte equação:

$$Efeito\ matriz = \frac{a_{matriz} - a_{solvente}}{a_{solvente}} \times 100$$

(Equação I),

onde: a_{matriz} é o coeficiente angular da curva de calibração dos fármacos na matriz e $a_{solvente}$ é o coeficiente angular da curva de calibração dos fármacos em metanol.

4.3.3 Precisão

A precisão avalia a proximidade entre os resultados repetidos na análise (ANVISA, 2017). Neste trabalho, a precisão medida foi expressa em termos de repetibilidade e precisão intermediária. Para avaliação da repetibilidade, foram analisadas 3 concentrações (1,25; 10,00 e 20,00 µg/mL), em triplicata, com um único analista. Para avaliação da precisão intermediária, foram preparadas amostras em três níveis da curva de calibração (1,25; 10,00 e 20,00 µg/mL), em triplicata, por dois operadores distintos, analisadas em dois dias diferentes.

Os resultados foram expressos por meio do coeficiente de variação (CV), calculado segundo a equação:

$$CV (\%) = \left(\frac{\sigma}{m\acute{e}dia} \right) \times 100$$

(Equação II),

onde: CV corresponde ao coeficiente de variação; σ é o desvio padrão da média dos resultados obtidos; e média é a média das medidas em triplicata para cada concentração analisada.

4.3.4 Exatidão

A determinação da exatidão foi avaliada em termos de recuperação da concentração conhecida de cada fármaco (MOX e BET) a partir de solução extrativa da córnea. Para isso, nove fragmentos de córnea suína foram previamente picotados e colocados em frascos de vidro, onde foram adicionadas quantidades conhecidas de cada fármaco (6,25; 50,0 e 100,0 µg) dentro do intervalo linear das curvas de calibração. O experimento foi realizado em triplicata para cada concentração. Após total evaporação do volume de solvente volátil adicionado nos frascos, foram adicionados 5 mL de metanol em cada amostra. Essas amostras foram mantidas em repouso por 24 h em temperatura ambiente com os frascos vedados, para garantir a extração dos fármacos.

Após o período de extração, as amostras foram filtradas e analisadas seguindo-se os métodos analíticos propostos para cada fármaco em HPLC. A recuperação foi determinada a partir do cálculo da razão entre a concentração mensurada dos fármacos e a concentração teórica:

$$Recupera\c{c}\tilde{a}o (\%) = \left(\frac{Concentra\c{c}\tilde{a}o_{mensurada}}{Concentra\c{c}\tilde{a}o_{te\acute{o}rica}} \right) \times 100$$

(Equação III)

4.3.5 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito na amostra que pode ser detectada, contudo não necessariamente quantificado como um valor exato (ANVISA, 2017). Para definição do LD, foi utilizada a seguinte equação:

$$LD = \frac{(3,3 \times s)}{S}$$

(Equação IV),

onde: s é o desvio padrão dos valores de intercepção no eixo Y da curva de calibração e S é o coeficiente angular da curva de calibração.

Limite de quantificação (LQ), por sua vez, é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis considerando as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2017). Para definição do LQ, foi utilizada a seguinte equação:

$$LQ = \frac{(10 \times s)}{S}$$

(Equação V),

onde: s é o desvio padrão dos valores de intercepção no eixo Y da curva de calibração e S é o coeficiente angular da curva de calibração.

4.4 Estudo da compatibilidade química entre o BET, o MOX e componentes da nanoformulação

Para análise da compatibilidade entre os fármacos (BET e MOX) e os excipientes (oleato de etila, Cremophor[®] EL e Plurol[®] oleique), inicialmente foram obtidas misturas cujas composições estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Sumário da composição das misturas físicas dos fármacos e dos excipientes para verificação da compatibilidade química da formulação.

MISTURAS	COMPOSIÇÃO (% p/p)					
	MOX	BET	Oleato de etila	Cremophor® EL	Plurol® oleique	P407
M1	50	50	-	-	-	-
M2	50	-	50	-	-	-
M3	50	-	-	50	-	-
M4	50	-	-	-	50	-
M5	50	-	-	-	-	50
M6	-	50	50	-	-	-
M7	-	50	-	50	-	-
M8	-	50	-	-	50	-
M9	-	50	-	-	-	50
M10	25	25	12,5	12,5	12,5	12,5

4.4.1 *Análise térmica*

As análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizadas em equipamento DSC-60 (Shimadzu®, Tóquio, Japão), usando como atmosfera inerte o nitrogênio, com vazão de 50 mL min⁻¹. Aproximadamente 3 mg de cada uma das 10 amostras foram pesadas e colocadas em painéis de alumínio. As amostras foram analisadas sob uma taxa de aquecimento de 10° C min⁻¹, com faixa de temperatura entre 25 e 300° C.

As análises térmicas diferencial (DTA) e termogravimétrica (TGA) foram realizadas de forma simultânea pelo DTG-60H (Shimadzu®, Tóquio, Japão), operando sob atmosfera de nitrogênio, com vazão de 50 mL min⁻¹. Aproximadamente 3 mg das amostras foram analisadas em painéis de platina, sob uma taxa de aquecimento de 10° C min⁻¹, com faixa de temperatura entre 25 e 500° C.

4.4.2 *Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)*

A análise de FTIR utilizando um acessório de imagem por reflectância total atenuada (ATR), foi avaliada através do espectrômetro Varian 640 FTIR (Agilent Technologies, EUA). Foram registrados espectros variando entre 4000 cm⁻¹ e 600 cm⁻¹ com uma resolução óptica de 4 cm⁻¹. A estabilidade e compatibilidade química entre amostras foram analisadas com base nos padrões espectrais característicos dos fármacos e dos excipientes.

4.5 Obtenção das nanoemulsões líquidas e de gelificação *in situ*

Para o desenvolvimento das nanoemulsões O/A foi utilizado o método de emulsificação espontânea. Tal processo permite formar nanoemulsão com baixa energia através da simples mistura da fase aquosa com a oleosa (contendo óleo, tensoativo e cotensoativo) (KUMAR et al., 2019; SINGH et al., 2017).

4.5.1 Construção do diagrama de fases pseudoternário

O diagrama de fases pseudoternário foi construído pela técnica de titulação (PATEL et al., 2016; SHAH et al., 2019), misturando os tensoativos (Cremophor[®] EL e Plurol[®] oleique), os componentes da fase oleosa (oleato de etila) e da fase aquosa (água ultrapura). Esse método permite identificar em quais faixas de concentração há formação de nanoemulsões à temperatura de 25°C.

Uma mistura do tensoativo e do cotensoativo, respectivamente Cremophor[®] EL e Plurol[®] oleique foi preparada previamente na proporção 4:1 (p/p), proporção que deve permitir a obtenção de sistemas O/A. Foram realizadas misturas do óleo (oleato de etila) com os tensoativos variando nas proporções (1:9), (2:8), (3:7), (4:6), (5:5), (6:4), (7:3), (8:2) e (9:1), p/p. Então, a fase aquosa foi adicionada gota a gota ao sistema em cada proporção sob agitação contínua à 1000 rpm à temperatura de 25°C. Os sistemas foram classificados quanto à aparência, como: nanoemulsão, floculação, turvo, leitoso e separação de fases, e quanto à fluidez, como: líquido e gel. Os pontos correspondentes aos componentes da mistura que resultaram em nanoemulsão foram marcados em uma região do diagrama de fases, utilizando o programa *Origin Pro*[®] 8.0 (OriginLab Corporation, USA).

4.5.2 Seleção da formulação

A partir da construção do diagrama, na maior área em que se obteve sistemas transparentes, a formulação com a menor concentração de tensoativos e com a maior proporção de fase aquosa foi escolhida.

4.5.3 Incorporação dos fármacos e do gel na nanoemulsão

Após selecionada a nanoformulação, foi utilizado o método de emulsificação de alta energia através do ultrassonicador de ponta (KUMAR et al., 2019) para o seu preparo e incorporação dos fármacos.

Em um béquer foi pesada a fase oleosa, 5 mg/mL de MOX e 1 mg/mL de BET, em seguida, foi adicionada lentamente a fase aquosa (tampão fosfato pH 7,4), sob ação do

ultrassom de ponta, operando com amplitude de 40%, pulsos de 30 em 10 s, por 10 min, e mantido sob banho de gelo. Essa nanoemulsão contendo os fármacos e sem o P407, foi chamada de NE1. Do mesmo modo, foram preparadas nanoemulsões sem os fármacos usadas como controle nos estudos de estabilidade, essa nanoemulsão O/A sem os fármacos e sem o P407 foi chamada de NEC1.

Para formação da nanoemulsão gel *in situ*, as nanoemulsões obtidas foram refrigeradas e, sob agitação magnética à 500 rpm, o P407 foi adicionado na concentração de 5% (p/p) na fase aquosa. Para análise, as nanoemulsões foram mantidas em repouso por 24 h. A nanoemulsão O/A preparada com os fármacos e com o P407 foi chamada de NE2 e a nanoemulsão O/A preparada sem os fármacos e com o P407 foi chamada de NEC2.

4.6 Caracterização das nanoemulsões

As nanoemulsões NE1, NE2, NEC1 e NEC2 foram caracterizadas considerando-se os parâmetros tamanho da gotícula, PDI, potencial zeta, pH, osmolaridade e morfologia das nanogotículas à temperatura ambiente.

4.6.1 Diâmetro da gotícula e PDI

Tanto o diâmetro hidrodinâmico das gotículas quanto o PDI foram obtidos por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico. As análises feitas no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA), e foram realizadas através uma diluição aquosa das nanoemulsões O/A, na proporção de 1:50 (v/v).

4.6.2 Potencial Zeta

O potencial zeta foi analisado pela determinação da mobilidade eletroforética das gotículas. As análises feitas no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA), e foram realizadas através uma diluição aquosa das nanoemulsões O/A, nas proporções 1:50 (v/v).

4.6.3 Mensuração do pH

O pH das nanoformulações O/A foi mensurado pela inserção direta do eletrodo próprio para amostras semissólidas acoplado ao potenciômetro digital (Digimed, modelo DM-22), previamente calibrado com as soluções tampão pH 4,00 e 7,00 à temperatura de 25°C.

4.6.4 Osmolalidade

A osmolalidade das formulações foi analisada pela técnica de pressão de vapor, através da injeção de 10 μL das amostras em um osmômetro (Wescor 5520), previamente calibrado com as soluções de NaCl de 100, 290 e 1000 mOsmol/kg.

4.6.5 Morfologia

A morfologia das gotículas nanoemulsões foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando um equipamento JEM-1011 (JEOL, Japão) do Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM) do IB/UnB. Para o preparo as amostras, as nanoemulsões foram diluídas numa proporção de 1:1000 (v/v) em água destilada. Alíquotas de 3 μL foram depositadas sobre os suportes para análise.

Para análise no MET, as amostras diluídas foram depositadas em grades de cobre revestidos de resina “formvar”, e deixadas em temperatura ambiente por 3 min para secar. O excesso das formulações foi retirado com papel filtro. Em seguida foram adicionados 3 μL de acetato de uranila (0,5%) e após 3 min em temperatura ambiente para secar, o excesso foi removido com papel filtro. As nanoestruturas foram então levadas ao equipamento e analisadas em magnitudes de até 30.000 vezes.

4.7 Estudo reológico da nanoemulsão de geleificação *in situ*

A temperatura de transição solução-gel ou temperatura de gelificação (T_{gel}) da formulação NE2 foi medida através de um reômetro Discovery HR-2 (TA Instruments, Delaware, EUA), acoplado a um cone de 50 mm de diâmetro e a uma placa de ângulo de 1 grau, com espaço de 50 μm entre os dois. As análises foram realizadas em três replicatas. As amostras foram cuidadosamente aplicadas à placa inferior do reômetro, garantindo que o cisalhamento da formulação fosse minimizado. Todos os procedimentos ficaram em equilíbrio térmico por 5 min antes das análises. Inicialmente, foi realizado o experimento para verificação da região visco-elástica linear das amostras, identificada como a região onde a tensão é diretamente proporcional à deformação (GRATIERI et al., 2010). Após identificada a região visco-elástica linear, foram realizados testes de cisalhamento oscilatório de pequena deformação em regime de taxa de aquecimento constante, para verificar a T_{gel} da formulação. A amplitude de deformação foi obtida a partir da região visco-elástica linear da formulação analisada à 15° C e 40° C. Foi aplicada uma tensão constante de 1%, frequência de 1,59 Hz, taxa de aquecimento de 10° C/min e uma rampa de aquecimento de 15°-40° C. Foram determinados os módulos

elástico (G') e dissipativo (G''). A T_{gel} foi considerada a temperatura na qual os dois módulos eram iguais (*crossover* G' e G'').

A avaliação da viscosidade das formulações NE1 e NE2 foi realizada nas temperaturas de 15° (temperatura inicial do experimento), 25°C (temperatura ambiente) e 35°C (temperatura do olho) (KRTALIC et al., 2018), seguindo o mesmo protocolo de avaliação da T_{gel} .

4.8 Estudo de estabilidade das nanoemulsões

Os estudos de estabilidade foram conduzidos conforme preconizam as diretrizes do ICH (ICH, 2003) e a resolução nº 1 de 29 de julho de 2005, referente ao guia para a realização de estudos de estabilidade da ANVISA (ANVISA, 2005).

As nanoemulsões O/A contendo BET e MOX foram avaliadas sem e com a adição do P407 (NE1 e NE2), e como controle, foram analisadas nanoemulsões sem os fármacos, sem e com o P407 (NEC1 e NEC2). As amostras foram acondicionadas em eppendorfs fechados e protegidos da luz com papel alumínio. Foram submetidas, por um período de 90 dias, à duas condições diferentes de temperaturas, de $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e de $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. As análises ocorreram nos tempos 0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias, em triplicata para cada formulação e condição.

As nanoemulsões foram avaliadas quanto ao diâmetro da gotícula, ao PDI, ao potencial zeta, ao pH e às alterações macroscópicas. Para avaliação macroscópica das formulações foram analisadas as características organolépticas (aspecto e cor) e homogeneidade das nanoemulsões, com o intuito de observar alterações na sua aparência por instabilidade.

Os dados quantitativos estão apresentados nas figuras como média \pm desvio padrão da média de, no mínimo, 3 replicatas. A análise estatística dos dados foi realizada com a utilização do programa *GraphPad Prism 8.0*. Diferenças significativas entre conjuntos de dados foram verificadas por análise de variância *two way ANOVA*, seguido de teste de Tukey com comparação múltipla dos dados. O nível de significância estatística foi aceito como ($p \leq 0,05$).

4.9 Perfil de liberação *in vitro* das nanoemulsões

O perfil de liberação *in vitro* dos fármacos MOX e BET a partir das nanoemulsões foi determinado através do uso de células de difusão modificadas do tipo Franz (Figura 9).

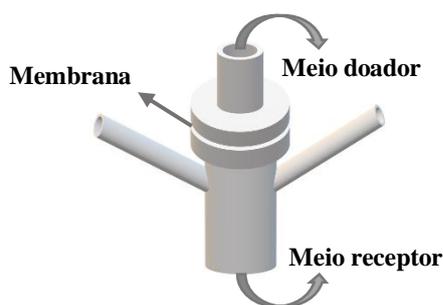


Figura 9. Esquema da célula de difusão vertical do tipo Franz montada com membrana sintética separando o compartimento doador do receptor para realização dos ensaios *in vitro* de liberação.

O ensaio foi realizado com uma membrana sintética de celulose (*dialysis tubing cellulose membrane*, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) posicionada entre o compartimento doador e receptor da célula de Franz. No compartimento receptor foram colocados 15 mL de solução aquosa de propilenoglicol 40%, e no compartimento doador foram pipetados 500 μ L das formulações NE1, NE2 ou controle contendo os fármacos livres em solução aquosa de propilenoglicol 50% na mesma concentração (1% de BET e 5% de MOX).

Amostras de 1 mL da solução receptora foram coletadas em intervalos de tempos definidos ao longo de 2 h e quantificadas em HPLC. O mesmo volume de solução aquosa de propilenoglicol 40% coletado era repostado no compartimento receptor. O experimento foi conduzido em banho aquecido (32 ± 2 °C), a solução receptora foi mantida sob agitação magnética constante a 500 rpm. Cada amostra foi testada em cinco replicatas. Para avaliação a foi calculada a porcentagem de fármaco liberada em relação ao total de fármaco colocado no compartimento doador para cada amostra em função do tempo (min).

Os dados quantitativos estão apresentados na figura como média \pm desvio padrão da média de, no mínimo, 3 replicatas. A análise estatística dos dados foi realizada com a utilização do programa *GraphPad Prism 8.0*. Diferenças significativas entre conjuntos de dados foram verificadas por análise de variância *two way ANOVA*, seguido de teste de Tukey com comparação múltipla dos dados. O nível de significância estatística foi aceito como ($p \leq 0,05$).

4.10 Estudos *ex vivo* da penetração ocular

Para os estudos *ex vivo* da penetração ocular foram utilizados olhos suínos gentilmente fornecidos pelos frigoríficos Via Carnes (Formosa, Brasil) e Sabugy (Planaltina, Brasil). Para o experimento estático, a córnea foi removida do globo ocular e os estudos foram conduzidos

apenas com a córnea suína (Figura 10). Já para realização do experimento simulando o fluxo lacrimal, o globo ocular inteiro foi utilizado.

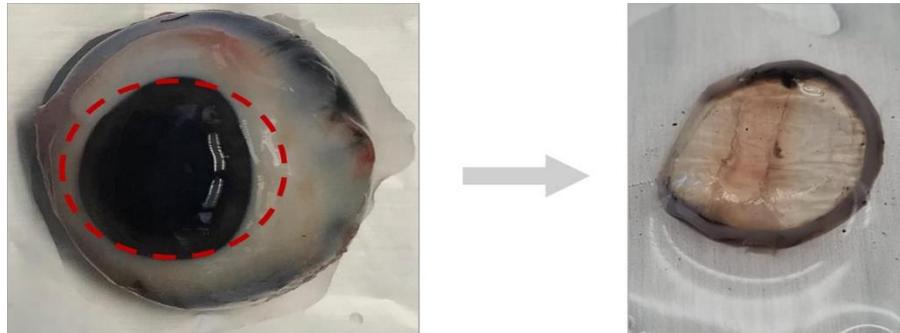


Figura 10. Remoção da córnea do globo ocular. Com auxílio do bisturi e da tesoura, é realizado um corte no local indicado pela linha vermelha tracejada, separando a córnea do restante do olho.

4.10.1 Experimento estático

Os estudos estáticos da penetração ocular *ex vivo* foram conduzidos em células de difusão do tipo Franz. Para esses experimentos, entre o meio doador e o receptor foram inseridas córneas suínas retiradas do animal no dia de abate e levadas sob refrigeração ao laboratório (Figura 11).

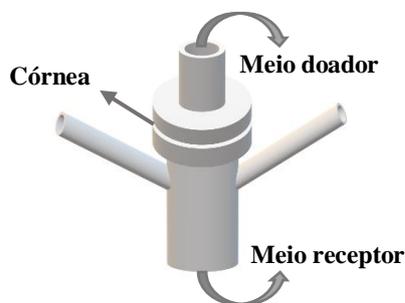


Figura 11. Esquema da célula de difusão do tipo Franz montada com córnea suína separando o compartimento doador do receptor para realização dos ensaios estáticos *ex vivo* de penetração ocular.

Amostras de 500 μL das formulações NE1, NE2 ou controle contendo os fármacos livres em solução aquosa de propilenoglicol 50% na mesma concentração (1% de BET e 5% de MOX) foram colocadas no compartimento doador. No compartimento receptor foram colocados 15 mL de solução aquosa de propilenoglicol 40%. A solução receptora foi mantida sob agitação magnética constante a 500 rpm em banho aquecido ($32 \pm 2^\circ \text{C}$). Cada amostra foi testada em cinco replicatas. As análises foram realizadas em banho de aquecimento a 35°C .

Após 1 h de experimento, foram coletadas amostras da solução receptora para análise em HPLC e as córneas foram retiradas das células de Franz. Para retirar o excesso de fármaco

da superfície da córnea, as córneas foram limpas com água ultrapura, em seguida, foram picotadas e inseridas em frascos de vidro, onde foram adicionados 5 mL de metanol para recuperação dos fármacos. A extração dos fármacos foi realizada por 24 h sob repouso e em temperatura ambiente. Após, foi realizada a coleta e filtração (em membrana de 0,45 μm) de cada amostra para análise em HPLC.

4.10.2 Experimento simulando o fluxo lacrimal

Para esse experimento, o globo ocular inteiro foi utilizado e colocado sob o meio receptor, e apenas a córnea foi mantida em contato direto com a formulação – Modelo *Whole Eye Globe* (Figura 12). O compartimento doador do sistema foi projetado e construído para ser conectado a uma bomba peristáltica (MINIPLUS evolution, Gilson, Middleton, EUA), mantendo uma vazão de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ de tampão fosfato isotônico pH 7,4, com o objetivo de mimetizar o fluxo lacrimal sobre a superfície do olho (DOS SANTOS et al., 2020). As análises foram realizadas em banho de aquecimento a 35°C.

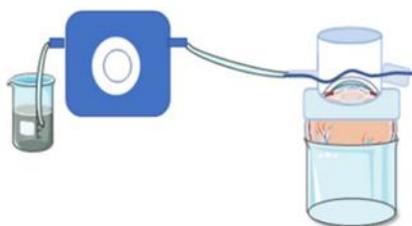


Figura 12. Modelo de permeação ocular *ex vivo* para simulação do fluxo lacrimal (*Whole Eye Globe*) através de uma bomba peristáltica, mantendo um fluxo de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ de tampão fosfato isotônico pH = 7,4 (DOS SANTOS et al., 2020).

Assim, o compartimento doador foi preenchido 500 μL das formulações NE1, NE2 ou controle contendo os fármacos livres em solução aquosa de propilenoglicol 50% na mesma concentração (1% de BET e 5% de MOX). Imediatamente após a instilação de cada formulação, a bomba peristáltica foi ligada e o fluxo de solvente iniciado. Supondo que a taxa de produção de lágrimas seja 1,3 $\mu\text{L}/\text{min}$, esse parâmetro foi aumentado por um fator de 15 vezes, fixando o fluxo lacrimal de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ (DOS SANTOS et al., 2020; GIANNOLA et al., 2008).

Após 1 h de experimento, o globo ocular foi removido do dispositivo e as córneas foram separadas para extração dos fármacos (Figura 10). Para retirar o excesso de fármaco da superfície da córnea, as córneas foram limpas com água ultrapura e, em seguida, foram picotadas e inseridas em frascos de vidro, onde foram adicionados 5 mL de metanol para recuperação dos fármacos. A recuperação foi realizada durante 24 h sob repouso e temperatura

ambiente. Após, foi realizada a coleta e filtração (em membrana de 0,45 μm) de cada amostra para análise em HPLC.

Os dados quantitativos das análises de penetração corneal estão apresentados na figura correspondente como média \pm desvio padrão da média de 5 replicatas. A análise estatística dos dados foi realizada com a utilização do programa *GraphPad Prism 8.0*. Diferenças significativas entre conjuntos de dados foram verificadas por análise de variância *two way ANOVA*, seguido de teste de Tukey com comparação múltipla dos dados. O nível de significância estatística foi aceito como ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação dos métodos analíticos

5.1.1 *Desenvolvimento dos métodos analíticos*

Para avaliação do desempenho da nanoformulação desenvolvida, é necessário o uso de métodos analíticos capazes de identificar e quantificar adequadamente os fármacos (BET e MOX), separando-os dos interferentes contidos na formulação, na matriz biológica (córnea) e no meio receptor utilizado nos estudos de penetração ocular.

A literatura apresenta diversos artigos que descrevem metodologias para quantificação de MOX em matrizes biológicas (KHAN et al., 2016; KUMAR et al., 2011; LABAN-DJURDJEVIĆ; JELIKIĆ-STANKOV; DJURDJEVIĆ, 2006; RESPAUD et al., 2012) e de BET em formulações farmacêuticas (BHOSALE; RAJPUT, 2011; JOHNSTON et al., 2010; NAM; KWON; LEE, 2011; VAIRALE; SIVASWAROOP; BANDANA, 2012). Todas essas referências utilizam como fase estacionária uma coluna C₁₈. No entanto, em nossos estudos essa coluna não se mostrou eficiente em separar o MOX dos interferentes da córnea, ou o MOX apresentou tempo de retenção menor que 3 min, ou seja, eluiu junto ao “volume morto” da coluna. Para a análise cromatográfica do MOX, que apresenta características hidrofílicas (log P = -0,280) (AL OMARI et al., 2014), foi então testada uma coluna de fase normal μ porasil, em que o fármaco apresentou tempo de retenção de 6,6 min, sem apresentar interferência das matrizes testadas.

O objetivo inicial era validar a quantificação dos dois fármacos simultaneamente em um mesmo método analítico. No entanto, na coluna utilizada para a separação do MOX não foi identificado o pico cromatográfico referente ao BET, provavelmente por ser uma substância muito apolar (log P = 3,97) (DOLOWY; PYKA, 2015) que não interagia com esta fase estacionária. Assim, não foi possível realizar a quantificação simultânea dos fármacos em uma mesma corrida e, para a análise cromatográfica do BET, foi utilizada uma coluna de fase reversa C₈, mais polar que uma coluna C₁₈, em que o tempo de retenção do fármaco foi de 9,7 min e não houve interferência das matrizes na análise.

Partiu-se então para a validação dos métodos, iniciando-se pela avaliação de sua seletividade.

5.1.2 *Seletividade*

A seletividade de um método analítico é a capacidade de identificar e quantificar os fármacos inequivocamente, mesmo em meio à possíveis interferentes presentes na amostra

(ANVISA, 2017). Este parâmetro de validação foi avaliado em meio aos interferentes: nanoemulsão contendo Cremophor® EL, Plurol® oleique, oleato de etila e P407, solução metanólica obtido do extrato da córnea e meio receptor (solução de propilenoglicol a 40%). A sobreposição dos cromatogramas referentes aos interferentes em relação aos fármacos está apresentada na Figura 13.

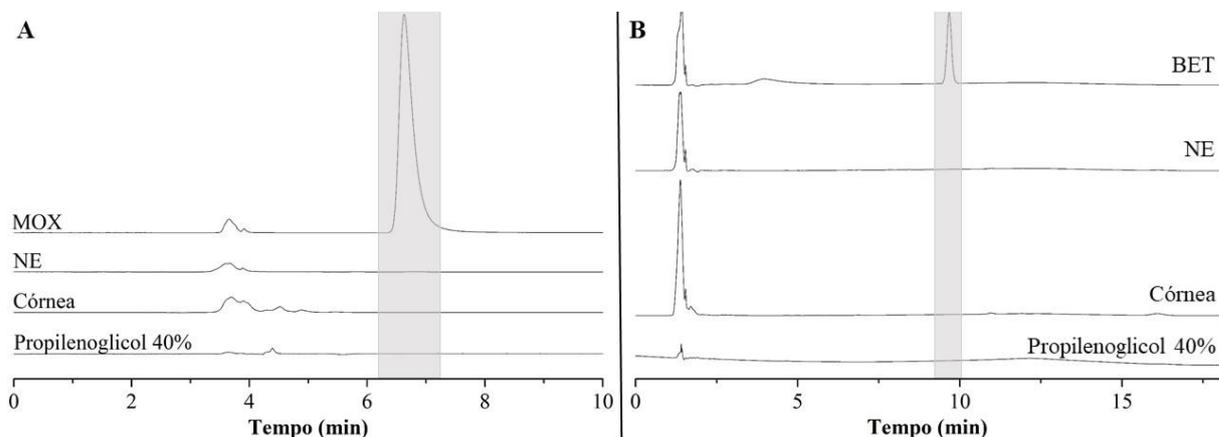


Figura 13. Sobreposição dos cromatogramas das diferentes amostras para análise da seletividade do método analítico. (A) Cromatograma do MOX em metanol comparado aos interferentes isolados de nanoemulsão, extrato da córnea e meio receptor; e (B) cromatograma do BET em metanol comparado aos interferentes isolados de nanoemulsão, extrato da córnea, e meio receptor BET – dipropionato de betametasona; MOX – cloridrato de moxifloxacino; NE – nanoemulsão.

Nas condições de análise, os possíveis interferentes não apresentaram resposta detectável no tempo de retenção dos fármacos, o que indica confiabilidade tanto do MOX quanto do BET em amostras contendo os contaminantes.

A área do pico cromatográfico de cada fármaco em metanol foi avaliada em relação às áreas dos fármacos contaminados com cada interferente (Figura 14), com o objetivo de identificar se os interferentes alterariam a magnitude dos picos de cada fármaco.

No método cromatográfico do MOX, foi possível observar que não ocorreu diferença estatística ($p > 0,05$) entre as áreas dos picos em meio aos interferentes: nanoemulsão e córnea. Entretanto, a área do fármaco na solução aquosa de propilenoglicol 40% (v/v) sofreu uma supressão do sinal, reduzindo em 37% a área do pico. Para correção da alteração do sinal do MOX em meio aos interferentes foi avaliado o efeito matriz descrito no item 4.3.2.

No método cromatográfico do BET, houve uma diferença estatística na área do fármaco quando em meio aos interferentes: nanoemulsão ($p \leq 0,01$) e córnea ($p \leq 0,001$). Contudo, como esses aumentos de repostas foram de apenas 4% e 5%, respectivamente, foi considerado como estando dentro de uma margem segura para análise.

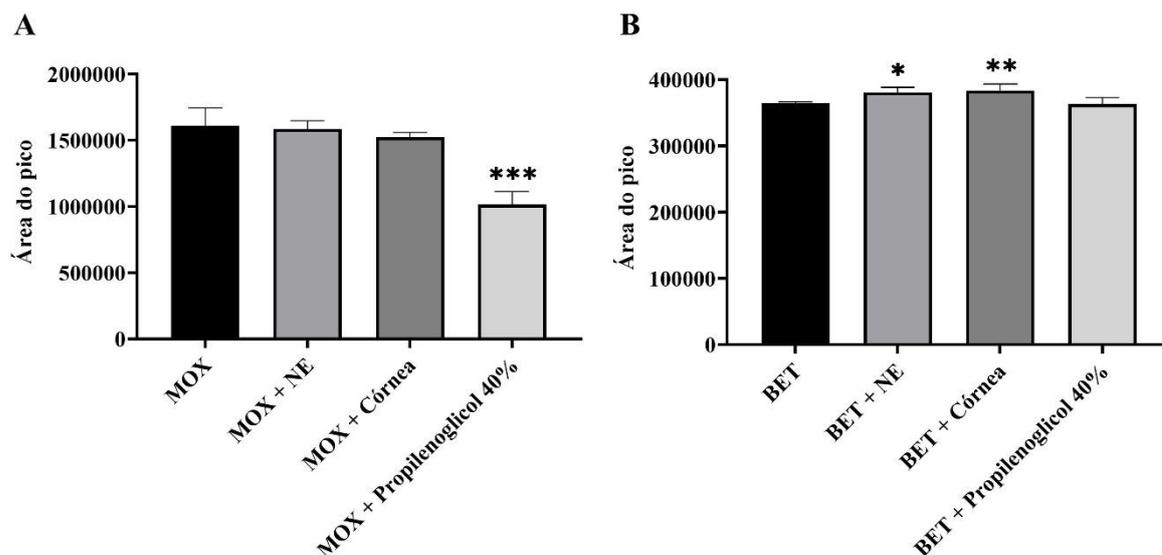


Figura 14. Seletividade para os métodos de quantificação de (A) MOX (10 µg/mL) e de (b) BET (10 µg/mL) em metanol e frente aos interferentes: NE, córnea e propilenoglicol 40%, analisados em termos de diferenças entre as áreas dos picos. Análise estatística por ANOVA, (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$. BET – dipropionato de betametasona; MOX – cloridrato de moxifloxacino; NE – nanoemulsão.

Para avaliação completa da interferência dos contaminantes foi avaliado o efeito matriz, de acordo com o método descrito no item 4.3.2 e os resultados descritos no item abaixo.

5.1.3 Linearidade

A linearidade representa a capacidade do método de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (ANVISA, 2017). As curvas analíticas para quantificação do MOX e do BET estão apresentadas na Figura 15.

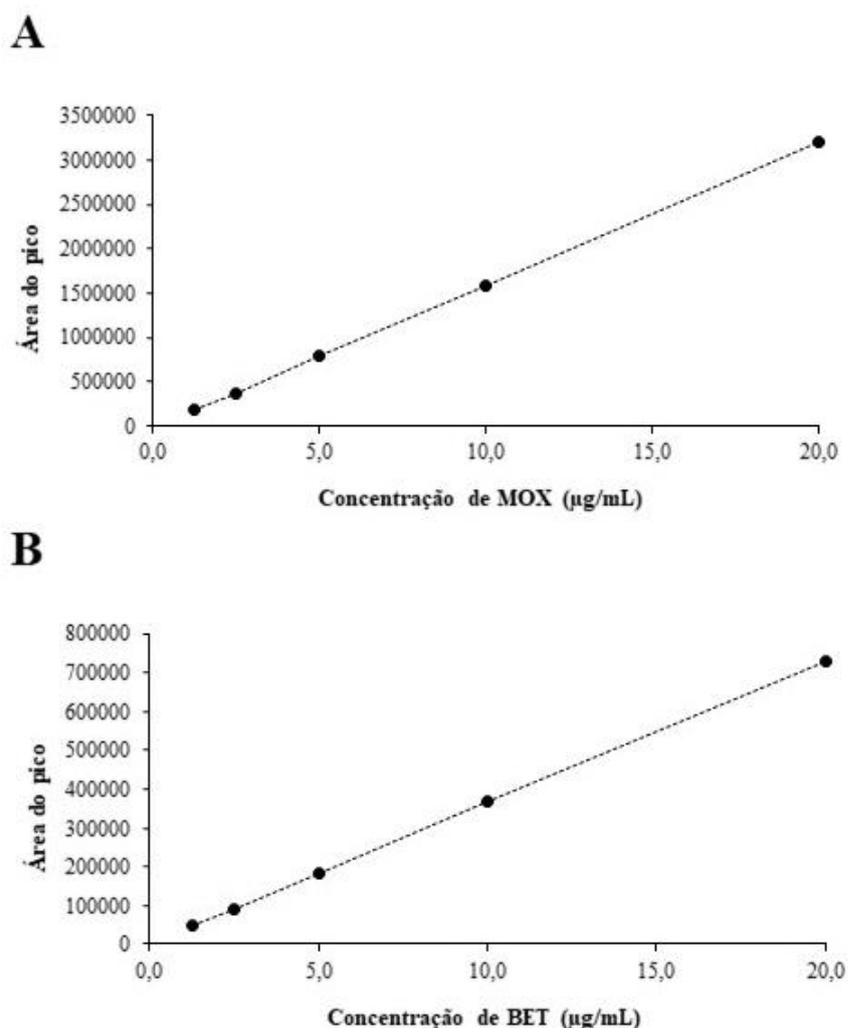


Figura 15. Representação gráfica da curva analítica, na faixa de concentração de 1,25 a 20,0 µg/mL, obtida por HPLC para quantificação de (A) MOX, equação da reta: $y = 161115x - 20393$, $r^2 = 0,9999$ e (B) BET, equação da reta: $y = 36330x + 1015,5$, $r^2 = 0,9999$. BET – dipropionato de betametasona; MOX – cloridrato de moxifloxacino.

As áreas dos picos plotadas em relação à concentração dos fármacos foram consideradas lineares na faixa de concentração de 1,25 a 20,0 µg/mL. O cálculo da regressão linear resultou na equação: $y = 161115x - 20393$, para o MOX, e na equação: $y = 36330x + 1015,5$, para a BET. Ambos os coeficientes de correlação linear foram de 0,9999, resultado de acordo com as diretrizes padronizadas tanto pela ANVISA (2017) quanto pelo ICH (2005).

A investigação do efeito matriz durante a quantificação de compostos é um parâmetro importante e que deve ser determinado durante a validação de um método analítico (CASSIANO et al., 2009). O efeito matriz ocorre quando substâncias inerentes à matriz coeluem com os compostos de interesse, ocasionando um aumento ou supressão do sinal do analito (ANVISA, 2017; CASSIANO et al., 2009). Assim, baseado nos resultados obtidos para

avaliação da seletividade do método, para avaliar se a quantificação dos fármacos estava sendo alterada pelos interferentes as curvas dos fármacos em solução metanólica contaminadas com a córnea e em solução aquosa de propilenoglicol 40% (v/v) foram comparadas às curvas dos fármacos em metanol (Figura 16).

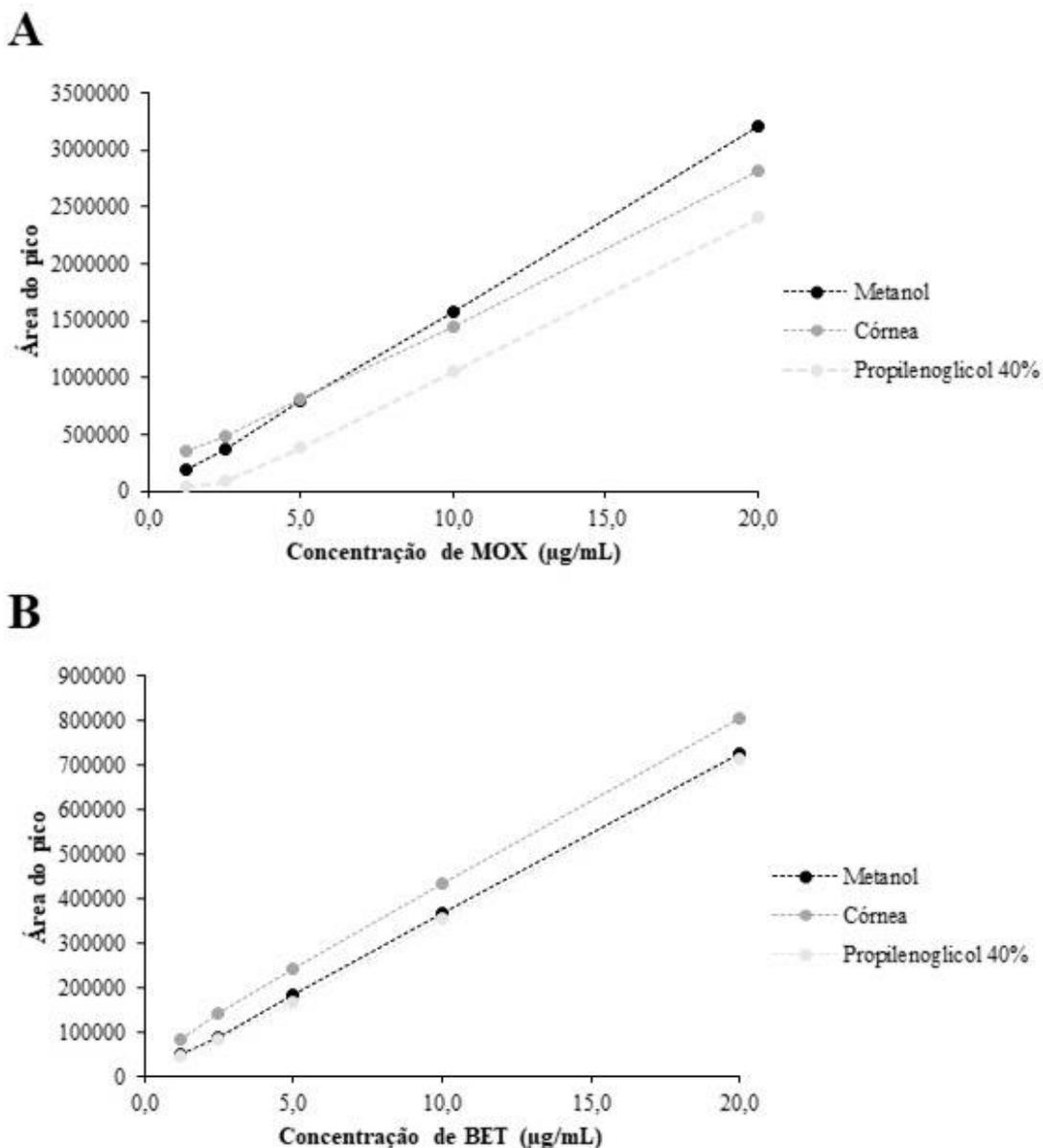


Figura 16. Correspondência entre as curvas analíticas em metanol (solvente), em solução metanólica contaminada com a córnea para ambos os fármacos e as curvas em solução aquosa de propilenoglicol 40% (v/v). (A) MOX – equação da reta para solução metanólica da córnea: $y = 131672x + 163225$, $r^2 = 0,9996$; equação da reta para em solução aquosa de propilenoglicol 40% (v/v): $y = 129178x - 209237$, $r^2 = 0,9965$. (B) BET – equação da reta para solução metanólica da córnea: $y = 38188x + 44689$, $r^2 = 0,9992$; equação da reta para em solução aquosa de propilenoglicol 40% (v/v): $y = 35940x - 6563$, $r^2 = 0,9997$. BET – dipropionato de betametasona; MOX – cloridrato de moxifloxacino.

De acordo com as legislações nacional e internacional, o valor de $\pm 15\%$ de efeito matriz é aceitável para métodos bioanalíticos (ANVISA, 2012; ICH, 2019). A Tabela 3 apresenta os resultados referentes ao cálculo do efeito matriz na solução metanólica contaminadas com a córnea e na solução aquosa de propilenoglicol 40% (v/v). Os resultados indicaram que as matrizes não alteraram o sinal do BET no método analítico, sendo que a interferência discreta do efeito matriz ($< 6\%$) encontra-se dentro do limite aceitável descrito nas diretrizes. Contudo, as matrizes geram grande efeito no sinal do MOX ($> -15\%$), o que indica que há uma supressão do sinal do fármaco em meio aos interferentes. Um indicativo de interferência dos constituintes da matriz, é a ausência de paralelismo entre as retas (ANVISA, 2017), o que pode ser observado na inclinação das curvas da matriz córnea comparada à curva do MOX em metanol (Figura 16A). Portanto, para este fármaco, as análises foram realizadas utilizando as curvas analíticas obtidas por cada matriz da qual o MOX foi extraído, com o objetivo de garantir uma quantificação confiável.

Tabela 3. Cálculo do efeito matriz na curva de cada fármaco (MOX e BET) na presença da solução metanólica contaminada com a córnea e da solução aquosa de propilenoglicol 40% (v/v). BET – dipropionato de betametasona; MOX – cloridrato de moxifloxacino.

Matriz	Efeito matriz (%) – MOX	Efeito matriz (%) – BET
Córnea	-18,28	5,11
Propilenoglicol 40%	-19,87	-1,12

5.1.4 Precisão

A precisão de um procedimento analítico é a avaliação da proximidade entre os resultados obtidos em análises repetidas e independentes, a partir de um mesmo método (ANVISA, 2017; ICH, 2003). A precisão dos métodos foi expressa em termos de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade é a avaliação das amostras produzidas sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. Enquanto isso, a precisão intermediária é a expressão entre a proximidade dos resultados obtidos através da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos (ANVISA, 2017).

Os resultados da precisão foram expressos em função do coeficiente de variação. Nos ensaios de repetibilidade (Tabela 4) os coeficientes de variação dos dois analitos (MOX e BET)

nas suas diferentes concentrações foram menores que 1%, enquanto os valores nos ensaios de precisão intermediária (Tabela 5) foram todos menores ou muito próximos do limite de 5% proposto pelos órgãos internacionais de validação.

Tabela 4. Precisão, mensurada em termos de repetibilidade, dos métodos analíticos do MOX e do BET. BET – dipropionato de betametasona; CV – coeficiente de variação; MOX – cloridrato de moxifloxacino.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	Erro (%)
MOX			
1,25	1,31	0,27	104,97
10,00	10,48	0,85	104,85
20,00	20,27	0,12	101,33
BET			
1,25	1,28	0,35	102,71
10,00	10,49	0,18	104,89
20,00	20,81	0,07	104,05

Tabela 5. Precisão, mensurada em termos de precisão intermediária, dos métodos analíticos do MOX e do BET. BET – dipropionato de betametasona; CV – coeficiente de variação; MOX – cloridrato de moxifloxacino.

Analista	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	CV (%)	Erro (%)
MOX				
<i>Dia 1 (n=9)</i>				
1	1,25	1,23	5,10	98,64
	10,00	9,51	2,06	95,15
	20,00	19,50	2,76	97,52
2	1,25	1,27	3,57	101,99
	10,00	9,54	0,61	95,37
	20,00	19,20	3,00	96,02
<i>Dia 2 (n=9)</i>				
1	1,25	1,24	3,74	99,48
	10,00	9,72	2,78	97,16
	20,00	19,17	2,79	95,87
2	1,25	1,31	2,13	104,52
	10,00	9,70	3,09	97,02
	20,00	19,52	1,03	97,58
BET				
<i>Dia 1 (n=9)</i>				
1	1,25	1,27	5,80	101,31
	10,00	10,32	2,02	103,22
	20,00	20,66	0,60	103,29
2	1,25	1,20	5,10	95,98
	10,00	10,08	5,08	100,78
	20,00	19,20	2,98	96,02
<i>Dia 2 (n=9)</i>				
1	1,25	1,30	2,60	104,00
	10,00	10,52	3,73	105,15
	20,00	20,40	1,79	101,99
2	1,25	1,20	5,09	95,78
	10,00	9,70	3,52	97,05
	20,00	20,98	1,28	104,92

5.1.5 Exatidão

A exatidão dos métodos analíticos foi avaliada em termos de recuperação do fármaco da matriz biológica (córnea). Os fármacos podem interagir de diversas formas com os componentes da córnea e, assim, a recuperação dos fármacos a partir dessa matriz tem como objetivo verificar a capacidade de extração do solvente empregado. Essa etapa permite padronizar o método extrativo, o que garante a quantificação adequada e eficiente dos fármacos (OLIVEIRA et al., 2020; REIS et al., 2018).

Os valores de recuperação variaram de 70,86 a 76,59% para o MOX e de 82,96 a 89,85% para o BET (Tabela 6). Ambos os resultados apresentaram desempenhos de recuperação adequados para determinação em matrizes biológicas (ICH, 2019; OLIVEIRA et al., 2020; REIS et al., 2018).

Tabela 6. Valores de recuperação do MOX e do BET da córnea por extração metanólica, após 24 h em repouso. BET – dipropionato de betametasona; CV – coeficiente de variação; MOX – cloridrato de moxifloxacino.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	CV (%)	Erro (%)
MOX			
1,25	0,95	7,48	82,96
10,00	7,09	8,44	83,51
20,00	15,32	4,53	89,85
BET			
1,25	1,03	9,38	76,34
10,00	8,35	8,06	70,86
20,00	17,97	2,61	76,59

5.1.6 Limites de detecção e quantificação

O LD diz respeito à menor concentração do analito na amostra que pode ser detectado, entretanto o valor não necessariamente pode ser quantificado com exatidão (ANVISA, 2017). Já o LQ é referente à menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser analisada com precisão e exatidão aceitáveis considerando as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2017).

Na Tabela 7 estão representados os valores de LD e LQ encontrados para cada método analítico. Os valores obtidos representam as menores concentrações de cada fármaco que podem ser detectadas pelos métodos analíticos desenvolvidos.

Tabela 7. Dados referentes aos LD e LQ teóricos dos métodos de quantificação do MOX e do BET em metanol. BET – dipropionato de betametasona; LD – limite de detecção; LQ – limite de quantificação; MOX – cloridrato de moxifloxacino.

Fármaco	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
MOX	0,490	1,200
BET	0,162	0,396

Tanto para o MOX quanto para o BET, os limites foram inferiores ao menor ponto da curva analítica (1,25 µg/mL). Esses limites definem se é possível quantificar os fármacos nos ensaios de liberação e permeação realizados. Assim, a menor porcentagem de MOX liberada da formulação que pode ser quantificada corresponde a 1,2% do teor incorporado nas formulações e, de BET, a 0,4%.

5.2 Estudo da compatibilidade química entre o BET, o MOX e componentes da nanoformulação

5.2.1 Análise térmica

Os dados de DSC elucidam o grau de cristalinidade com base na entalpia de fusão da amostra analisada. Dessa forma, a partir de mudanças no ponto de fusão de um fármaco é possível ter uma ideia sobre a compatibilidade físico-química entre ele e o outro componente da formulação (GADE et al., 2019). Nos ensaios de DSC foi possível observar que o MOX apresentou um pico endotérmico à 254°C e o BET, à 179,5°C, temperaturas correspondentes às suas temperaturas de fusão (Figura 17).

Tanto o MOX como o BET foram parcialmente dissolvidos em todas as misturas produzidas com os excipientes da formulação (Figura 17). A fusão detectada no DSC é uma característica da porção cristalina do fármaco. Logo, uma diminuição na entalpia no pico de fusão é considerada aumento da forma amorfa do fármaco, ou seja, indica que o fármaco se dispersou no meio (GADE et al., 2019). Assim, em cada uma das misturas binárias (M1 à M9), a redução da entalpia no pico de fusão de cada fármaco permitiu concluir que os compostos sozinhos diminuíram a porção cristalina dos fármacos. Contudo, essa diminuição não foi tão significativa quando comparada à mistura M10, que contém todos os componentes da

formulação. A mistura M10 demonstrou que os excipientes foram capazes de realizar a dispersão completa dos fármacos, indicando que os fármacos se encontravam amorfos na mistura, o que está relacionado ao aumento da solubilidade de ambos no meio.

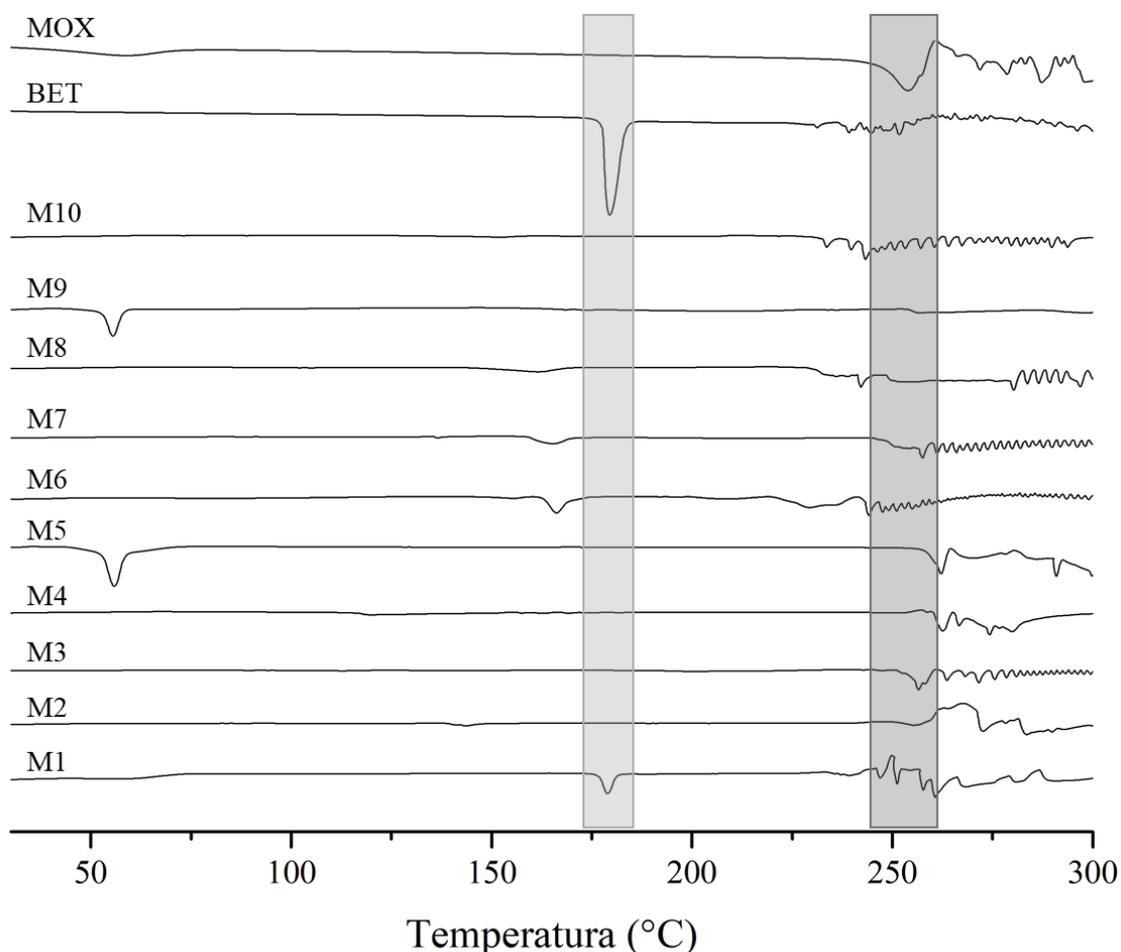


Figura 17. Análise das curvas de DSC do BET, do MOX e das misturas físicas. O pico de fusão de cada fármaco foi sombreado, o mais claro indica a fusão do BET e o mais escuro do MOX. BET – dipropionato de betametasona; MOX – cloridrato de moxifloxacino.

As análises de TG estão representadas na Figura 18, onde estão apresentadas a primeira derivada de TG (DrTGA), que permite uma melhor demarcação das etapas de perda de massa e fornece informações sobre o nível de interação entre os fármacos e os excipientes. O MOX sofre um processo de decomposição em duas etapas: a primeira na faixa de 232-266°C, com uma perda de massa correspondente à 3,4% e outra na faixa de 266-375°C, com uma perda de massa de 40,7%. Do mesmo modo, o BET também se decompõe em duas etapas, a primeira na faixa de 207-281°C, perdendo 15,7% de massa e a segunda na faixa de 281-388°C, com perda

de massa igual à 52,0%. A decomposição de cada excipiente da formulação está indicada na Tabela 8.

Tabela 8. Faixa de decomposição e perda de massa em porcentagem dos excipientes da formulação.

Composto	Perda de massa (%)	Faixa/(°C)
Oleato de etila	96,0	146-223
Plurol Oleique	75,4	190-410
Cremophor	76,5	358-424
P407	91,9	336-429

Na M1, foi possível observar que um fármaco não alterou a degradação do outro e a perda de massa foi correspondente à mistura dos dois fármacos juntos, o que indica compatibilidade química entre eles.

Em relação às misturas dos fármacos com o oleato de etila, foi possível observar na M2 que a temperatura de degradação do oleato foi prorrogada em 19°C, não comprometendo a estabilidade térmica e degradação do MOX, que apresentou uma baixa definição de perda de massa, o que sugere uma interação entre o fármaco e o óleo. Em M6, nota-se que o oleato não alterou a degradação do BET e a perda de massa foi correspondente à mistura.

Quanto à interação entre o Plurol[®] oleique com os fármacos, em M3 e M7 foi possível identificar que a degradação dos fármacos nas misturas ocorreu em mais etapas do que a dos fármacos sozinhos, e a temperatura de degradação do MOX e do BET, e seus valores de perda de massa se mantiveram conforme a decomposição dos fármacos sozinhos.

Do mesmo modo, a M4 também indicou a presença de várias etapas de degradação do MOX, mantendo a temperatura de degradação e os valores de perda de massa consistentes com o fármaco puro. Já na M8, o Cremophor[®] EL não alterou a degradação do fármaco e a perda de massa foi correspondente à mistura.

Em M5 e M9, pode-se notar que o P407 também não alterou a degradação dos fármacos e manteve a perda de massa esperada.

A mistura completa da formulação (M10) não alterou a degradação dos fármacos e nem dos demais componentes, mantendo a perda de massa correspondente aos componentes isolados da mistura.

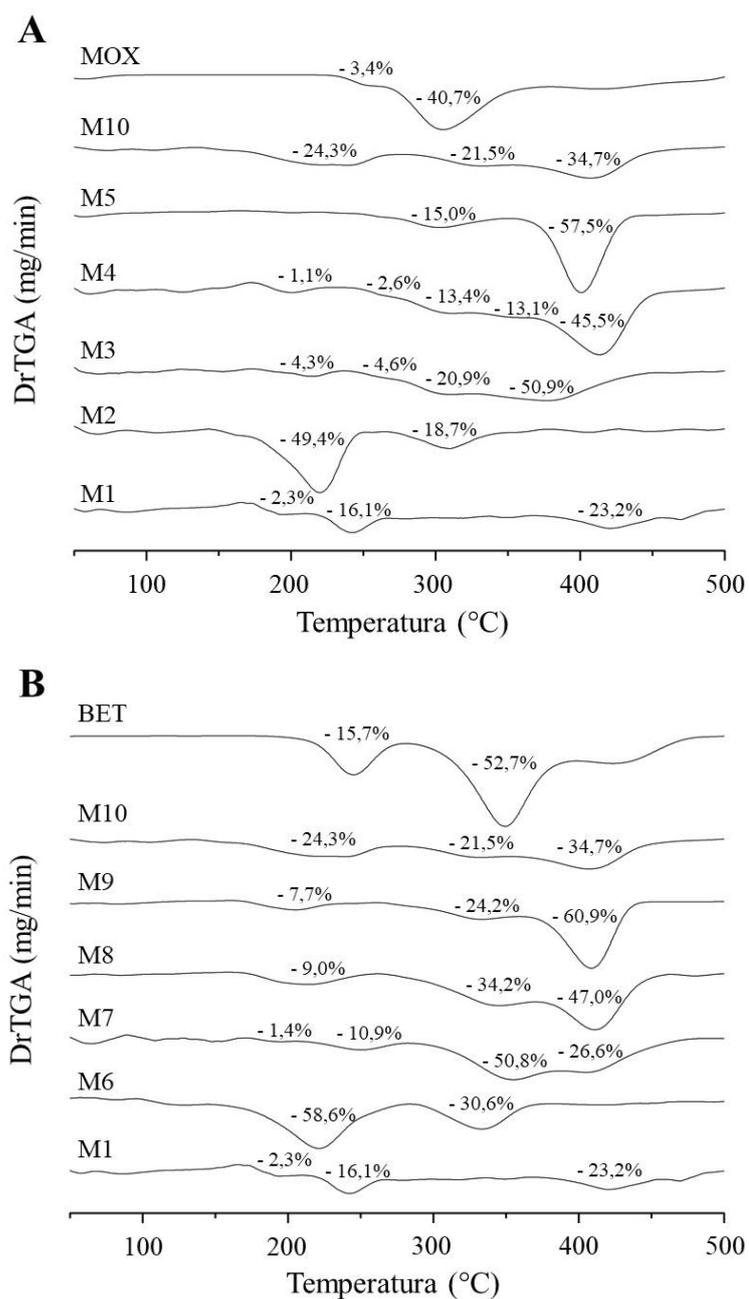


Figura 18. Primeira derivada de TGA das misturas M1 à M10 e dos fármacos isolados. Análises referentes ao MOX e às misturas físicas contendo MOX (A) e análises referentes ao BET e às misturas físicas contendo BET (B). Cada evento de perda de massa está indicado nas figuras como porcentagem (%). BET – dipropionato de betametasona; MOX – cloridrato de moxifloxacino.

5.2.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A técnica FTIR foi utilizada para avaliar e confirmar a ocorrência ou não de interações entre as moléculas dos excipientes e dos fármacos utilizados no preparo das nanoemulsões com base nos resultados anteriores de análise térmica, fornecendo dados mais precisos sobre possíveis incompatibilidades nas nanoformulações. Assim, as alterações nos padrões espectrais característicos dos fármacos e dos excipientes foram observadas a partir da sobreposição dos espectros, onde as estruturas particulares de cada molécula podem ser identificadas.

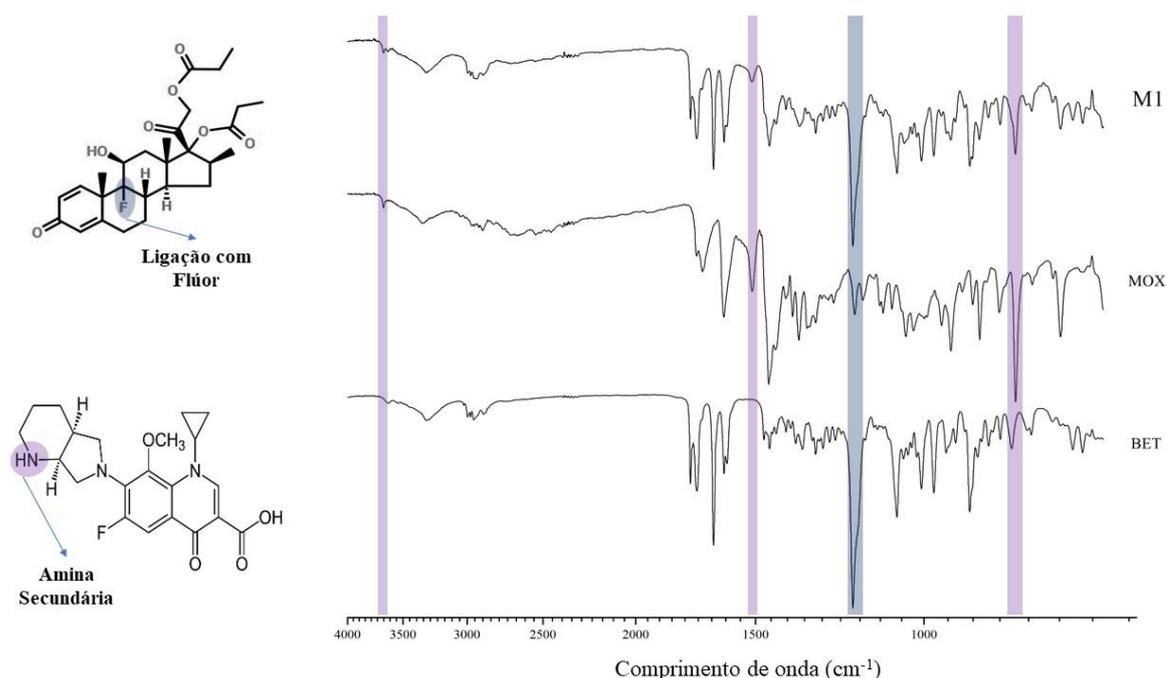


Figura 19. Espectros de FTIR e estruturas químicas dos fármacos BET e MOX sozinhos ou em mistura física (BET + MOX). BET – dipropionato de betametasona; FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier; MOX – cloridrato de moxifloxacino.

Na Figura 19 é possível observar os *fingerprints* das moléculas do MOX e do BET sozinhas e da mistura física dos dois fármacos. A molécula do MOX foi identificada pelas vibrações moleculares de suas estruturas, dentre as quais, as principais são: um pico em 3668 cm^{-1} , uma banda em 1512 cm^{-1} e um estiramento longo em 803 cm^{-1} , que caracterizam as diversas ocorrências do grupamento amina secundária na molécula do fármaco. Enquanto isso, o BET foi caracterizado primordialmente pelo estiramento de alta intensidade vinculado à ligação F–C em 1187 cm^{-1} . A partir da mistura M1 dos fármacos não foi observada nenhuma alteração na orientação das estruturas químicas deles, o que sugere a existência de compatibilidade química entre MOX e BET, indicando que a associação dos fármacos em uma mesma formulação pode ser feita.

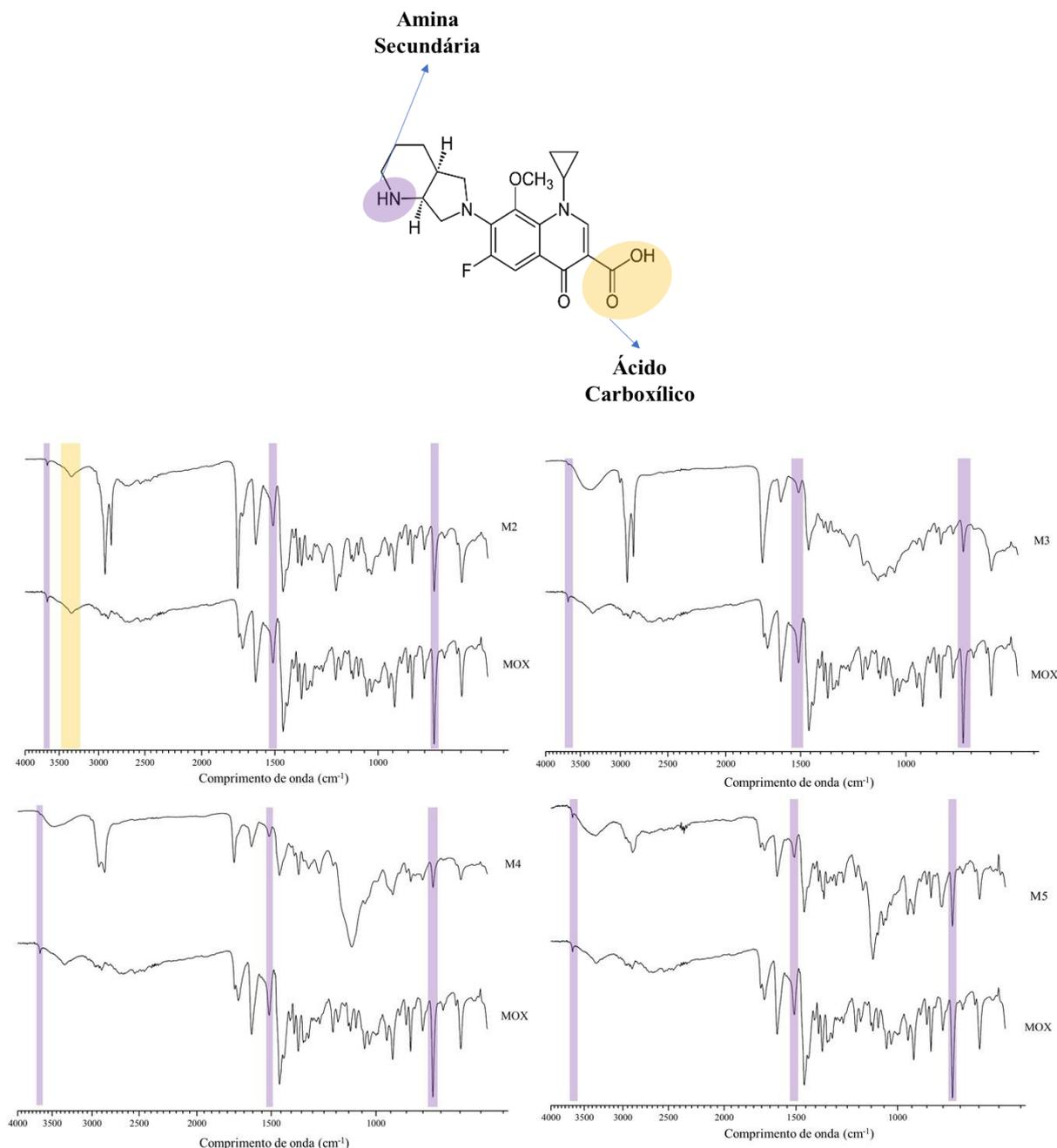


Figura 20. Espectros de FTIR do MOX sozinho ou em mistura física (M2, M3, M4, M5) e estrutura química do MOX. FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier; MOX – cloridrato de moxifloxacino.

Os *fingerprints* das misturas binárias entre o MOX e os excipientes da formulação: oleato de etila, plurool oleique, cremophor e P407 estão representados na Figura 20. Os sinais particulares do MOX foram identificados nas misturas para investigar a possível ocorrência de interações com os excipientes. As principais vibrações moleculares da molécula do MOX identificadas foram: um pico em 3668 cm^{-1} , uma banda em 1512 cm^{-1} e um estiramento longo em 803 cm^{-1} , que caracterizam as diversas ocorrências do grupamento amina secundária; e um

estiramento muito longo O–H a 3339 cm^{-1} . Não foram observados deslocamentos das bandas identificadas do MOX nos espectros das misturas físicas, o que sugere que não existe interação entre as moléculas dos excipientes e do fármaco, indicando a não ocorrência de reações de degradação ou instabilidade nas amostras.

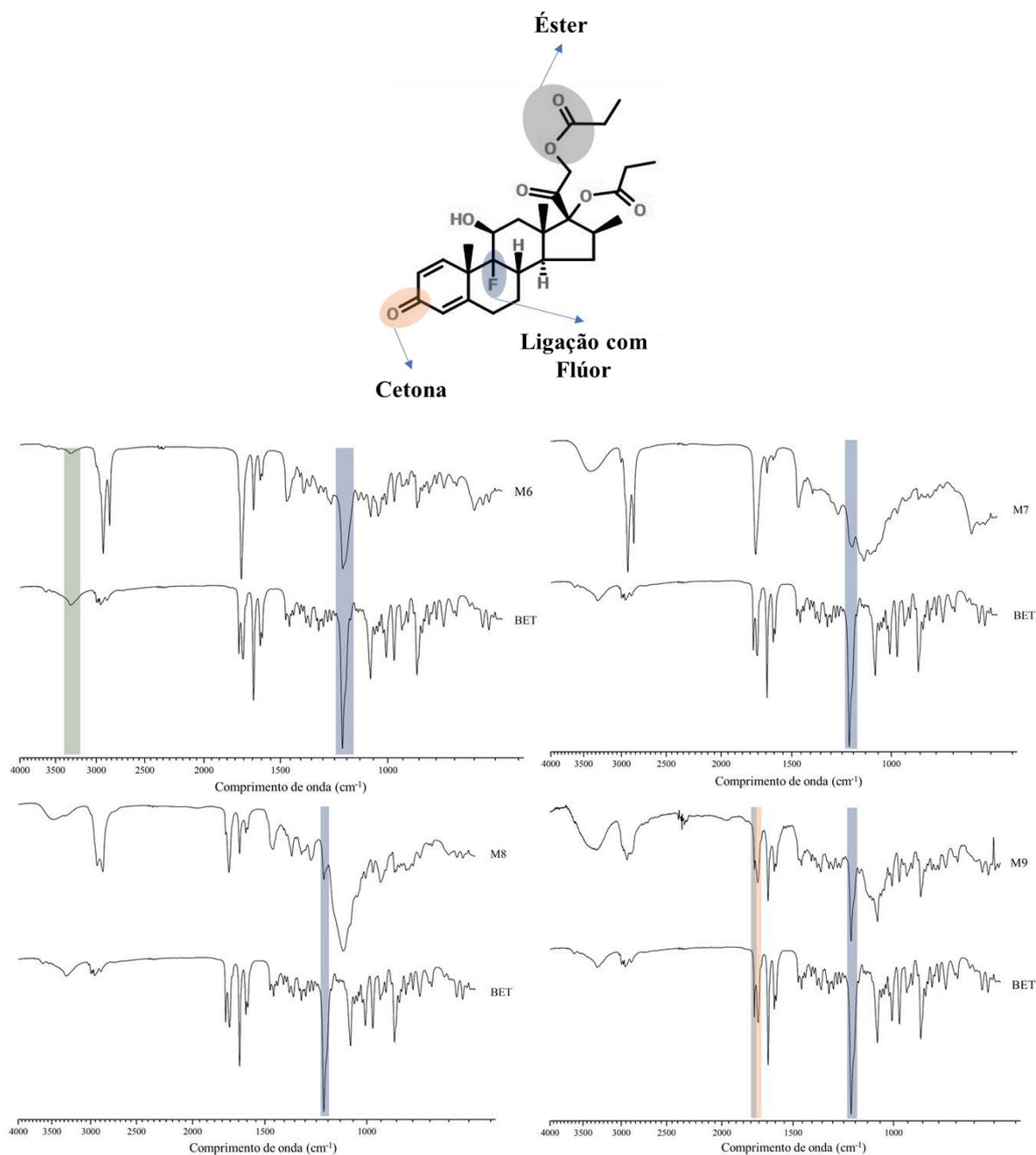


Figura 21. Espectros de FTIR do BET sozinho ou em mistura física (M6, M7, M8, M9) e estrutura química do BET. BET – dipropionato de betametasona; FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.

Na Figura 21, encontram-se os *fingerprints* das misturas binárias entre o BET e os excipientes da formulação: oleato de etila, pluroil oleique, cremophor e P407. Os sinais característicos do BET também foram identificados nas misturas com o mesmo objetivo de investigar a possível ocorrência de interações com os excipientes. As principais vibrações moleculares da molécula do BET identificadas foram: estiramento de alta intensidade vinculado à ligação F–C em 1187 cm^{-1} , um estiramento da ligação C=O em 1715 cm^{-1} do grupo cetona, e um estiramento da ligação C=O a 1754 cm^{-1} do grupo éster. Assim como nas misturas físicas com o MOX, nas misturas físicas dos excipientes com o BET, não foram observados deslocamentos das bandas do BET nos espectros das misturas físicas, sugerindo que não ocorreram reações de degradação ou instabilidade nas amostras devido à ausência de interação entre as moléculas dos excipientes e do BET. Assim, com base nesse conjunto de resultados apresentados, passou-se para a fase de desenvolvimento das nanoformulações utilizando os excipientes selecionados.

5.3 Obtenção das nanoemulsões líquidas e gel *in situ*

A seleção dos excipientes de nanoformulações tópicas oculares necessita de uma grande cautela, uma vez que esses produtos devem alcançar um equilíbrio ideal para garantir que as propriedades da formulação (tamanho das gotículas e distribuição do tamanho, potencial zeta, pH, osmolaridade e estabilidade) atendam às exigências de uma formulação ocular (DUKOVSKI et al., 2019). Além disso, o tensoativo, o cotensoativo e o óleo não podem ser irritantes ou tóxicos para a superfície da córnea e outros tecidos oculares (KAUR; KAKKAR, 2014). Portanto, para compor a formulação foram escolhidos como tensoativos Cremophor[®] EL e Pluro[®] oleique, e como óleo, o oleato de etila.

Cremophor[®] EL (Óleo de rícino polietoxilado, EHL: 12.0-14.0) é um tensoativo hidrofílico, não irritante, comumente usado em produtos oftálmicos (DUKOVSKI et al., 2019; JURETIĆ et al., 2018; KANG et al., 2016; SHAH et al., 2014). O uso do tensoativo combinado ao cotensoativo permite reduzir a tensão interfacial, o que facilita o processo de dispersão da fase interna durante o preparo da nanoemulsão (KAUR; KAKKAR, 2014), além de melhorar a estabilidade e solubilidade das nanoemulsões (LALU et al., 2017). Logo, como cotensoativo foi utilizado o Pluro[®] oleique (Propilenoglicol monocaprilato, EHL: 3.0), um produto lipofílico, biodegradável e capaz de aumentar a solubilidade de fármacos hidrofóbicos (CHAVAN; INGLE; VAVIA, 2013; JANKOVIĆ et al., 2016). Ambos os tensoativos escolhidos são não-iônicos (DUKOVSKI et al., 2019; JANKOVIĆ et al., 2016), uma importante característica que garante a baixa irritabilidade aos olhos (KANG et al., 2016).

O oleato de etila, por sua vez, é um óleo formado por ésteres de ácidos graxos de cadeia média e tem sido preferencialmente usado em nanoemulsões devido ao seu pequeno peso molecular (HEGDE; VERMA; GHOSH, 2013). Atualmente, tem sido empregado para formular nanoemulsões para tratamento tópico oftálmico, e demonstrou grande desempenho por auxiliar no aumento da permeação de fármacos na córnea (SHAH et al., 2019).

5.3.1 Diagrama de fases pseudoternário

As nanoemulsões foram obtidas através da construção de um diagrama de fases pseudoternário, utilizando como tensoativo e cotensoativo, respectivamente o Cremophor[®] EL e o Plurol[®] oleique na proporção 4:1 (p/p). Esse diagrama permite observar a mudança mútua de um sistema de três componentes em um triângulo equilátero. Os vértices do diagrama de fases pseudoternário representam a fase aquosa, a fase oleosa e o tensoativo, e quando são avaliados quatro componentes, um dos vértices do diagrama representará uma mistura binária de razão fixa, como tensoativo/cotenoativo. O diagrama indica a região onde está a melhor proporção dos componentes da formulação (WANG et al., 2018).

Assim, as nanoemulsões do tipo O/A foram formadas quando a fração de tensoativo estava em maior proporção e a de fase oleosa, em menor. Nas primeiras titulações dessas formulações, em que a água se encontrava em menores proporções, houve a formação de nanoemulsões gelificadas, e conforme foi ocorrendo a titulação e aumentando a proporção da fase aquosa, essas nanoemulsões ficaram líquidas. Como esperado, a combinação de um tensoativo com um cotensoativo reduziu a tensão interfacial entre os líquidos (AMMAR et al., 2009), resultando em uma grande área de formação de nanoemulsões (Figura 22). Por outro lado, as regiões com iguais concentrações de óleo e de tensoativo, com a titulação da fase aquosa, formaram emulsões líquidas. Enquanto nas formulações com maior fase oleosa e menos tensoativo, foi possível observar que, independente da proporção de fase aquosa, as formulações ficaram turvas e apresentaram separação de fase.

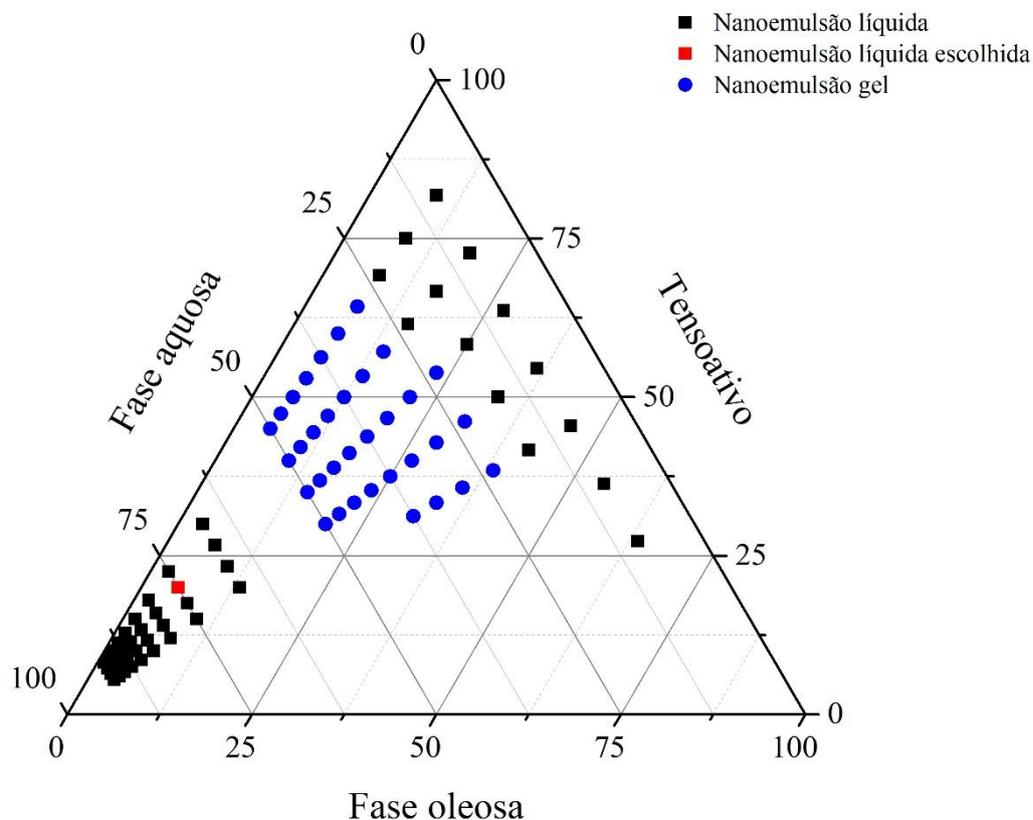


Figura 22. Diagrama de fases pseudoternário mostrando as regiões de formação de nanoemulsões gel e líquida, em vermelho, está indicada a região escolhida para o preparo da nanoemulsão. O diagrama foi composto por Cremophor® EL e o Plurol® oleique na proporção 4:1 (p/p), como tensoativos, oleato de etila, como fase oleosa e água, como fase aquosa.

5.3.2 Seleção da formulação

Com base na extensão da região de nanoemulsões O/A no diagrama de fases construído, a nanoemulsão selecionada para incorporar os fármacos levou em consideração a concentração mínima possível de tensoativo/cotensoativo, com a menor quantidade possível de fase oleosa, que permitisse a solubilização completa do fármaco hidrofóbico (BET). Objetivou-se também a obtenção de nanoemulsões estáveis, sem precipitação dos fármacos. E, ainda, foi selecionada uma formulação que se apresentasse no estado líquido, para garantir a precisão da dose quando instilada no olho. Assim, as nanoemulsões O/A foram preparadas utilizando 5% de fase oleosa, 20% de tensoativo e 75% de fase aquosa (Figura 22).

5.3.3 Incorporação dos fármacos e do poloxamer na nanoemulsão

Os métodos de alta energia para produção de uma nanoemulsão, como o ultrassom de ponta, permitem reduzir o tamanho da gotícula de uma formulação para tamanhos menores do que 100 nm, fornecendo um maior controle para a estabilidade, reologia e cor da formulação (KUMAR et al., 2019). Portanto, a formulação selecionada com base no diagrama de fases pseudoternário, foi submetida à técnica de ultrassonificação com o objetivo de melhorar suas características físico-químicas. A Figura 23 mostra as características macroscópicas das nanoemulsões produzidas por essa metodologia. O fármaco hidrofílico (MOX, $\log P = -0,280$) possivelmente encontra-se na fase aquosa externa da formulação ou interagindo com as porções polares dos tensoativos, enquanto o fármaco hidrofóbico (BET, $\log P = 3,97$) possivelmente encontra-se dissolvido nas gotículas da fase oleosa que compõem a fase interna da formulação.

As nanoemulsões O/A foram preparadas utilizando 5 mg/L de MOX e 1 mg/L de BET, oleato de etila 5% p/p, cremophor EL: plurol oleique na proporção 4:1 (p/p) 20% p/p, tampão fosfato pH 7,4 75%. O tampão fosfato pH 7,4 foi utilizado como fase aquosa para manter o pH da nanoformulação em níveis fisiológicos.

Objetivando a formação de uma nanoemulsão de gelificação *in situ*, após preparo das nanoemulsões, o P407 foi adicionado à formulação. Esse polímero permite que a formulação permaneça líquida nas condições de armazenamento, mas que se converta em um gel viscoelástico quando em contato com a temperatura ocular. Isso permite a maior residência dos fármacos em contato com a região pré-corneana, aumentando, assim, a biodisponibilidade. Essa característica também permite que as doses dos medicamentos sejam aplicadas de forma precisa e reprodutível (PATEL et al., 2016).

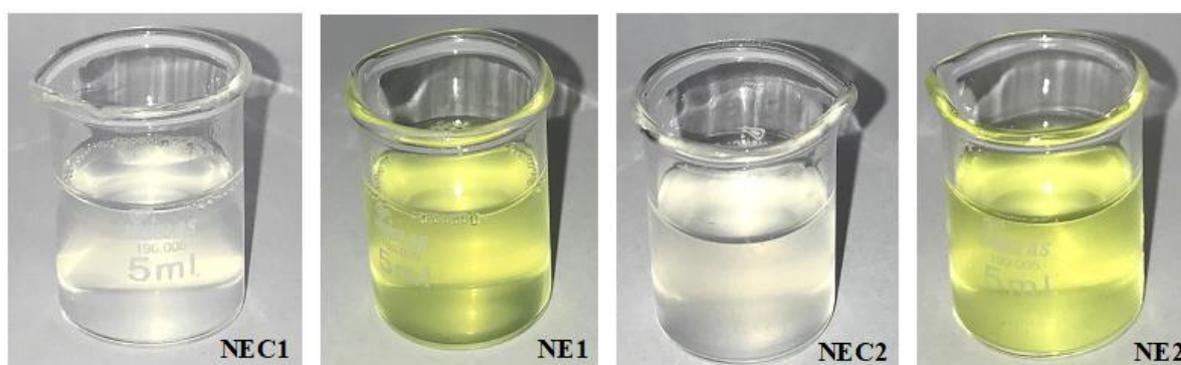


Figura 23. Nanoemulsões O/A: (NEC1) sem os fármacos e sem o P407, (NE1) com os fármacos e sem o P407, (NEC2) sem os fármacos e com o P407, (NE2) com os fármacos e com o P407.

5.4 Caracterização das nanoemulsões líquida e de gelificação *in situ*

Formulações para uso tópico ocular precisam atender a diversos requisitos, que devem ser definidos em relação aos limites das diferentes implicações fisiológicas do olho (LALU et al., 2017). Portanto, para atender a esses limites da via ocular e para serem caracterizadas como nanoemulsões, as formulações desenvolvidas foram analisadas quanto aos seguintes parâmetros: tamanho da gotícula, PDI, potencial zeta, pH, osmolaridade e morfologia.

5.4.1 Diâmetro da gotícula e PDI

Uma das características mais importantes de uma nanoemulsão é o tamanho da gotícula. Uma nanoemulsão com tamanho médio de gotícula variando entre 10-100 nm é capaz de melhorar a estabilidade, diminuindo a ocorrência de processos de instabilização como coalescência, além de aumentar o poder de penetração dos fármacos incorporados e, conseqüentemente, a biodisponibilidade ocular dos fármacos (KUMAR et al., 2017). De fato, as nanoemulsões formadas apresentaram um aspecto translúcido com valores de diâmetro da gotícula relativamente baixos, variando entre 21 e 27 nm (Tabela 9). Esse pequeno tamanho era esperado devido à presença das moléculas de cotensoativo juntas ao tensoativo, que permitem a redução da tensão interfacial, diminuindo, assim, o raio de curvatura das nanoemulsões.

O PDI, por sua vez, indica a distribuição do diâmetro das gotículas da nanoemulsão em torno do valor médio, em que valores menores que 0,2 indicam uma distribuição de tamanho estreita, ou seja, com alta homogeneidade no sistema (PATHAK; CHHABRA; PATHAK, 2013). Os resultados obtidos indicaram valores de PDI menores que 0,11 demonstrando que existe uma grande homogeneidade de distribuição do diâmetro das gotículas nessas formulações. Esse resultado é positivo, pois permite inferir que essas nanoemulsões monodispersas serão estáveis fisicamente por período de tempo considerável.

Tabela 9. Caracterização das nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2 quanto ao diâmetro da gotícula (nm) e ao PDI. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer; PDI – índice de polidispersão.

Formulação	Diâmetro da gotícula (nm)	PDI
NEC1	21,8 ± 0,3	0,07 ± 0,01
NE1	22,6 ± 0,3	0,09 ± 0,01
NEC2	26,7 ± 0,1	0,08 ± 0,01
NE2	28,0 ± 0,1	0,11 ± 0,01

Na Figura 24 está a representação gráfica da variação do tamanho e do PDI das nanoemulsões. A adição tanto do P407 quanto dos fármacos alterou estatisticamente o tamanho das nanoemulsões ($p \leq 0,05$ e $p \leq 0,0001$, respectivamente), resultando em formulações com tamanhos maiores de gotícula. Já o PDI apenas sofreu aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,01$) entre a formulação NEC1 e NE2, ou seja, após a adição simultânea dos fármacos e do P407. Esses resultados são condizentes, uma vez que com a adição de outros componentes à formulação espera-se que haja pequenos rearranjos no sistema, que resultam em aumento de tamanho de nanogotículas.

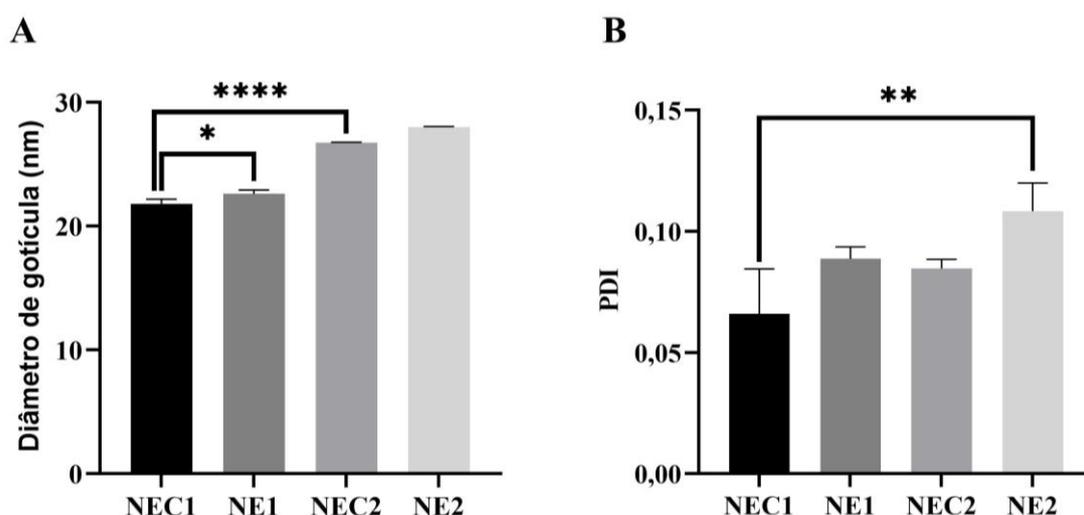


Figura 24. Representação gráfica da caracterização das nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2 quanto ao diâmetro da gotícula (nm) e ao PDI. Análise estatística por ANOVA, (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,01$, (****) $p \leq 0,0001$. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer.

5.4.2 Potencial Zeta

O potencial zeta indica a densidade de carga em torno das nanogotículas e fornece informações sobre o grau de repulsão entre elas. Assim, quanto maior o seu potencial zeta, seja negativo ou positivo, maior deve ser a estabilidade física da formulação, já que há prevenção de floculação e a agregação das nanogotículas da formulação (PATEL et al., 2016; SHAH et al., 2019). Os dados mostrados na Tabela 10 indicam que as gotículas apresentaram cargas negativas em sua superfície variando entre -10 e -16 mV, mas esse resultado é próximo à neutralidade. Tal carga deve ser proveniente dos sais de fosfato que compõem o tampão pH 7,4,

uma vez que os tensoativos utilizados na formulação foram não-iônicos (MEHANNA; MNEIMNEH; ABED EL JALIL, 2020).

Tabela 10. Resultado da avaliação do potencial zeta (mV) das formulações NEC1, NE1, NEC2, NE2. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer.

Formulação	Potencial Zeta (mV)
NEC1	- 15,0 ± 0,7
NE1	- 16,2 ± 0,6
NEC2	- 12,2 ± 0,7
NE2	- 10,3 ± 0,1

5.4.3 Mensuração do pH

O pH ideal de uma formulação ocular deve estar na faixa de $7,2 \pm 0,6$ (MAHBOOBIAN et al., 2017), visto que essa faixa de pH permite que a formulação seja tamponada pelo líquido lacrimal evitando a irritação ocular, a produção reflexa de lágrimas e o reflexo de piscar rapidamente (SHAH et al., 2019). As nanoemulsões inicialmente foram produzidas com água ultrapura, e formaram nanoformulações com pH com valores entre 5,5 e 6,7 (Tabela 11). As nanoformulações contendo os fármacos (NE1 e NE2) apresentaram valores de pH mais ácidos o que provavelmente causaria efeitos indesejados de irritabilidade nos olhos.

Os tampões desempenham um papel fundamental na formulação de colírios oftálmicos, contribuindo significativamente para a estabilidade química, para a resposta clínica e, também, para o conforto e a segurança do produto (NANJWADE et al., 2011). Portanto, para corrigir o pH, foi utilizado tampão fosfato pH 7,4 como fase aquosa das formulações, o que resultou em formulações com pH variando entre 7,0 e 7,2 (Tabela 11).

Tabela 11. Avaliação do pH das formulações NEC1, NE1, NEC2, NE2 produzidas tanto com a fase aquosa composta por água ultrapura, quanto com a fase aquosa composta por tampão fosfato pH 7,4. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer.

Formulação	pH sem tampão	pH com tampão
NEC1	6,3 ± 0,1	7,1 ± 0,1
NE1	5,5 ± 0,1	7,0 ± 0,1
NEC2	6,7 ± 0,1	7,2 ± 0,1
NE2	5,8 ± 0,1	7,1 ± 0,1

5.4.4 Osmolaridade

Idealmente, uma formulação oftálmica deve apresentar a osmolaridade em torno de 290 mOsmol/kg. Esse parâmetro se relaciona à menor irritabilidade de uma formulação (PATEL et al., 2016). Contudo, valores de osmolaridade entre 100 e 640 mOsmol/kg são comumente tolerados pela mucosa ocular, não causando desconforto após a aplicação (MAHBOOBIAN et al., 2017). Na Tabela 12, pode-se observar que os valores de osmolaridade das formulações NEC1, NE1, NEC2, NE2 se encontraram numa faixa de 430 a 580 mOsmol/kg e quanto maior a quantidade de solutos adicionados ao meio, maior a sua tonicidade, como era obviamente esperado.

Tabela 12. Resultados referentes à osmolaridade das formulações NEC1, NE1, NEC2, NE2. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer.

Formulação	Osmolaridade (mOsmol/kg)
NEC1	434,7 ± 4,9
NE1	455,3 ± 5,6
NEC2	568,7 ± 9,4
NE2	579,0 ± 9,4

5.4.5 Morfologia

A avaliação morfológica das nanoformulações (NEC1, NE1, NEC2 e NE2) foi realizada a partir da análise de imagens obtidas por MET (Figura 25). As nanoemulsões apresentaram

formato de gotículas esférico, conforme descrito na literatura (MEHANNA; MNEIMNEH; ABED EL JALIL, 2020; PATHAK; CHHABRA; PATHAK, 2013; SHAH et al., 2019), com alterações discretas no tamanho hidrodinâmico observado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico. Mesmo com a adição do P407 nas formulações NEC2 e NE2, o formato esférico das nanoestruturas foram mantidos. Essa avaliação será novamente realizada em experimentos futuros com diferentes contrastantes para melhor observação das gotículas das formulações.

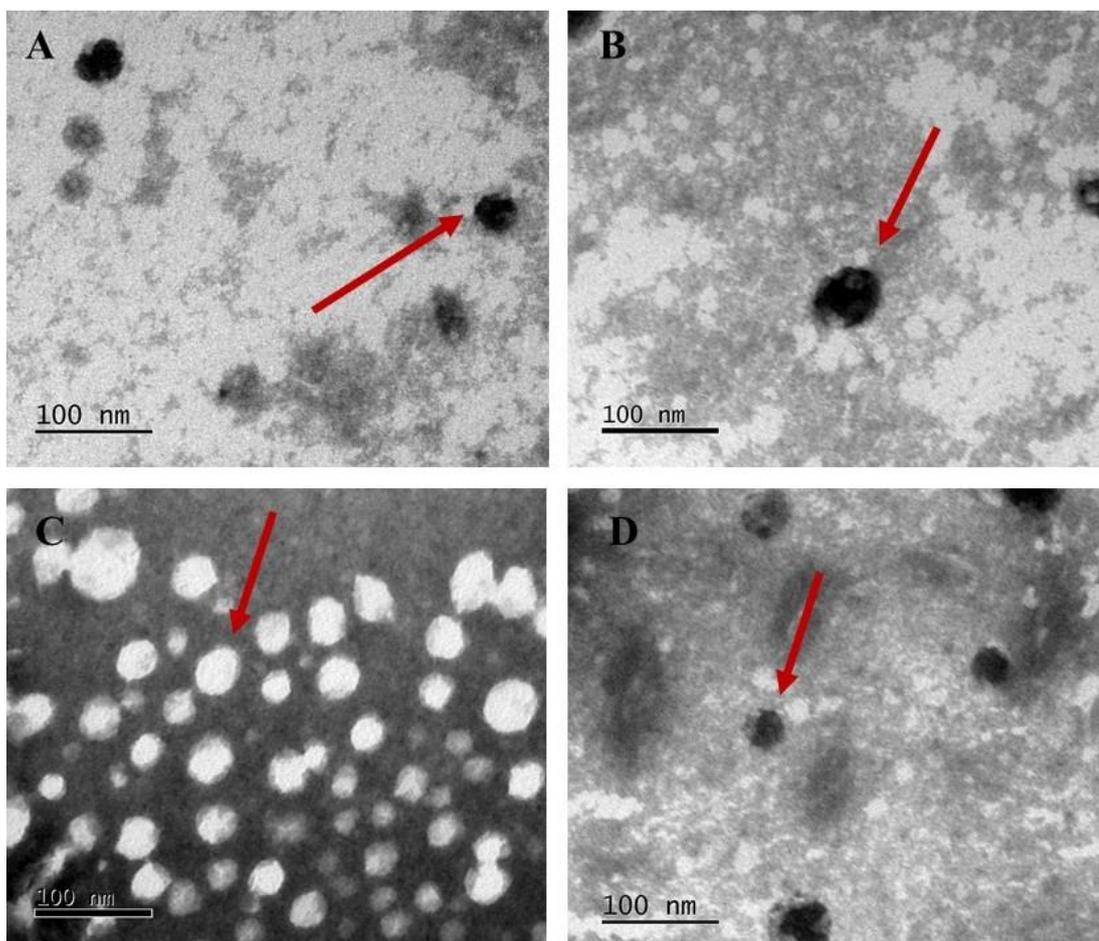


Figura 25. Imagens obtidas por MET das formulações: NEC1 (A), NE 1 (B), NEC2 (C) e NE2 (D). Aumento de 30.000 vezes. Nanoemulsões identificadas pelas setas vermelhas. MET – microscopia eletrônica de transmissão. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer.

5.5 Estudos reológicos da nanoemulsão

Um importante parâmetro que deve ser analisado em formulações gel *in situ*, é a temperatura de transição desse gel, que idealmente deve estar entre 25° (temperatura ambiente) e 35°C (temperatura do olho) para formulações oculares (KRTALIC et al., 2018). As características da formulação em temperatura ambiente e fisiológica podem ser determinadas

pelas suas propriedades dinâmicas, como elasticidade ou módulo elástico (G'), e viscosidade ou módulo dissipativo (G'') (LI et al., 2020). O G' é uma característica inerente de um material sólido. Quando seu valor é mais alto, significa que sob uma força de cisalhamento, o material é capaz de armazenar a energia e não deformar ou fluir. O oposto é verdadeiro para o G'' (GRATIERI et al., 2010).

A T_{gel} é um parâmetro crítico em relação à eficácia e segurança da formulação, assim como à adesão do paciente ao tratamento, uma vez que influencia a precisão da dosagem, o conforto da aplicação e o tempo de residência do fármaco na superfície ocular (KRTALIC et al., 2018). A formulação deve ser um líquido de fluxo livre para que seja administrado facilmente como uma gota. Dessa forma, o G'' deve ser superior ao G' no momento da aplicação. Contudo, após a administração da formulação, espera-se a formação de um gel, em que G' deve ser maior que G'' , resistindo às forças de cisalhamento do olho durante o ato de piscar (GRATIERI et al., 2010).

Inicialmente, foi identificada a região de viscoelasticidade linear da formulação à 15°C e 40°C, onde a tensão é diretamente proporcional à deformação, o que determinou a amplitude de deformação de 1% utilizada nas análises (Figura 26).

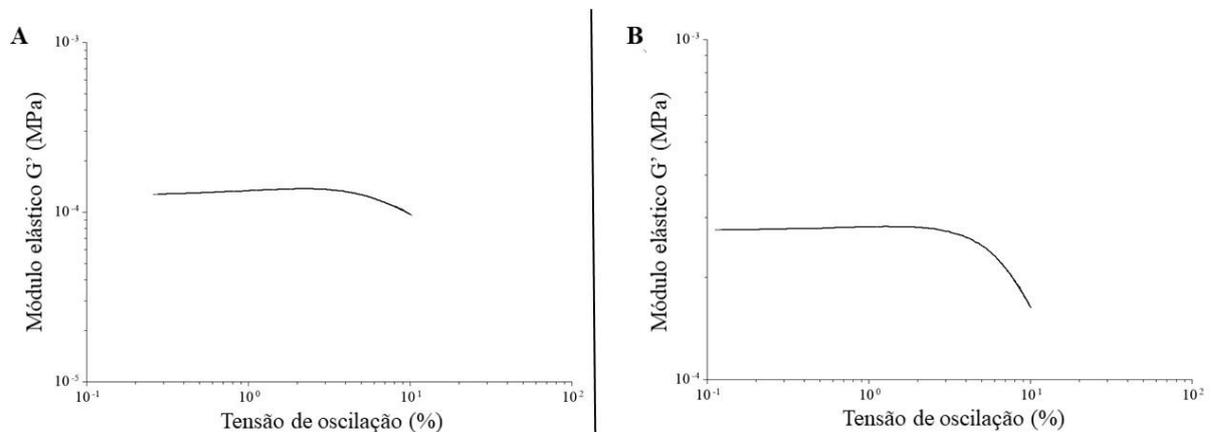


Figura 26. Gráfico referente à região visco-elástica linear da formulação à temperatura de 15°C (A) e 50°C (B).

O resultado obtido da T_{gel} da formulação foi de $32,0 \pm 0,9$ °C (Figura 27), demonstrando que a formulação encontra-se nas condições ideais de formação de gel de um medicamento para aplicação tópica ocular. Quando armazenada a temperaturas mais baixas, essa formulação apresenta-se no estado líquido, podendo ser instilada no olho com precisão da dose, e quando em contato com a superfície ocular, essa formulação inicia seu processo de gelificação, considerando que a temperatura ocular é de 35°C, e à 32°C a formulação gelifica.

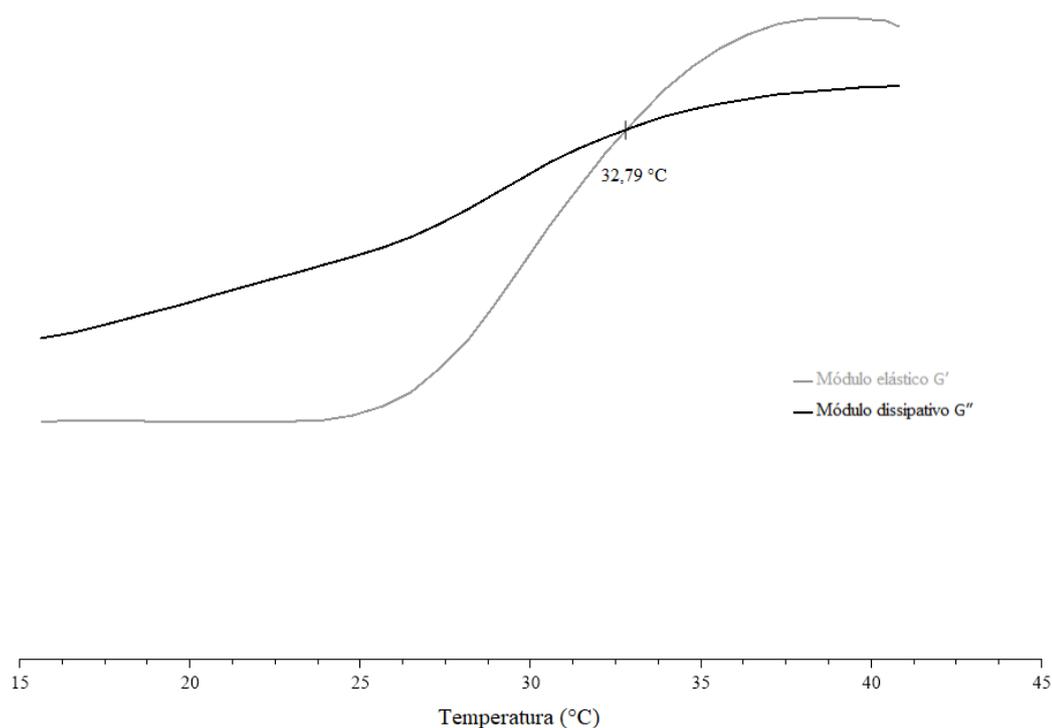


Figura 27. Módulo elástico (G') e módulo dissipativo (G'') em função da temperatura da formulação NE2. NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer.

Os resultados de viscosidade mostraram que a formulação sem adição do poloxamer apresentou uma viscosidade constante com a variação de temperatura ($\approx 0,110$ Pa.s), enquanto na formulação com poloxamer, a viscosidade após a gelificação foi maior do que antes, aumentando a viscosidade de 0,462 Pa.s a 25°C para 3,819 Pa.s a 35°C, o que confirma que a formulação líquida se tornou gel (Tabela 13). Essa baixa viscosidade inicial da formulação permite a precisão da dosagem e facilidade de administração do colírio, em contraste com as formulações gelificadas já existentes (DUKOVSKI et al., 2019) e a gelificação posterior permite uma liberação lenta e prolongada dos fármacos, gerando uma formulação mais potente com uma retenção pré-corneana (GUPTA; JUYAL; NAGAICH, 2019).

Tabela 13. Resultados de viscosidade das formulações NE1 e NE2, nas temperaturas de 15°, 25° e 35°C. NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer.

Formulação	Viscosidade (Pa.s) a 15°C	Viscosidade (Pa.s) a 25°C	Viscosidade (Pa.s) a 35°C
NE1	0,123	0,114	0,104
NE2	0,230	0,465	3,819

5.6 Estudo de estabilidade das nanoemulsões

Inicialmente, todas as nanoemulsões apresentaram um aspecto transparente e homogêneo: as NE1 e NE2 apresentaram uma coloração amarela clara (devido à coloração amarelada conferida pelo MOX), enquanto as NEC1 e NEC2 apresentaram cor transparente. Ao longo dos 90 dias de análise, foram observadas alterações na coloração das NE1 e NE2 somente quando armazenadas em temperatura de $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Figura 28 e 30), que apresentaram uma coloração amarelo escuro a partir do 30° dia de armazenamento. Contudo, não foram observados demais indicativos de instabilidade física, como precipitação de partículas, separação de fases ou turvação das amostras. A alteração na coloração das amostras sugere que houve uma degradação dos fármacos na formulação, indicando que a partir do dia 30, as amostras contendo os fármacos, armazenadas à $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, não devem se manter estáveis quimicamente. As principais reações de degradação do MOX ocorrem por fotodegradação ou por oxidação (AL OMARI et al., 2014). Considerando que as formulações foram acondicionadas protegidas da luz, possivelmente essa alteração na coloração da nanoemulsões pode ter se dado por reações de oxidação desse fármaco, uma vez que as amostras não se encontravam fechadas hermeticamente nos frascos. As demais amostras não apresentaram nenhum tipo de alteração física (Figura 29 e 31, e NEC1 e NEC2 das Figura 28 e 30), indicando maior estabilidade do sistema.

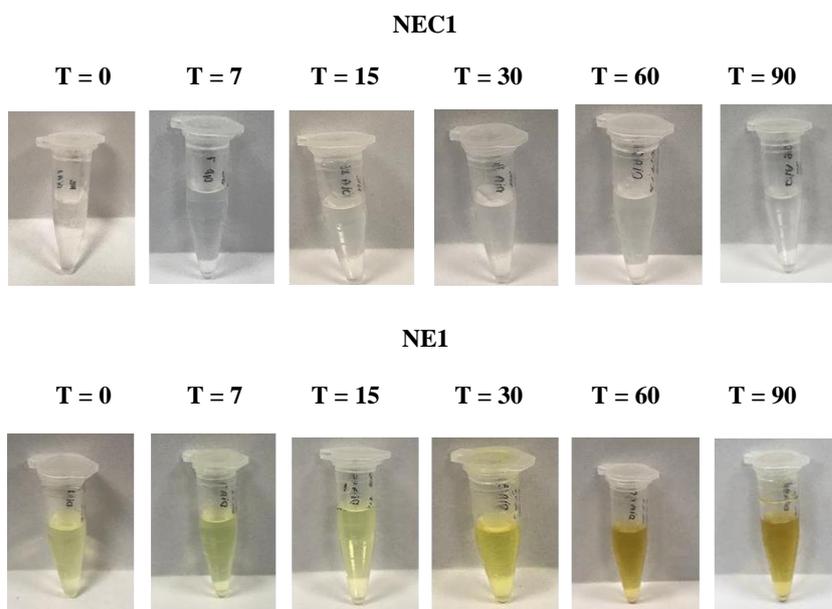


Figura 28. NEC1 e NE1 armazenadas à temperatura de $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante o período de 90 dias. Após o 30° dia de armazenamento é possível identificar alteração na coloração da NE1. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona.

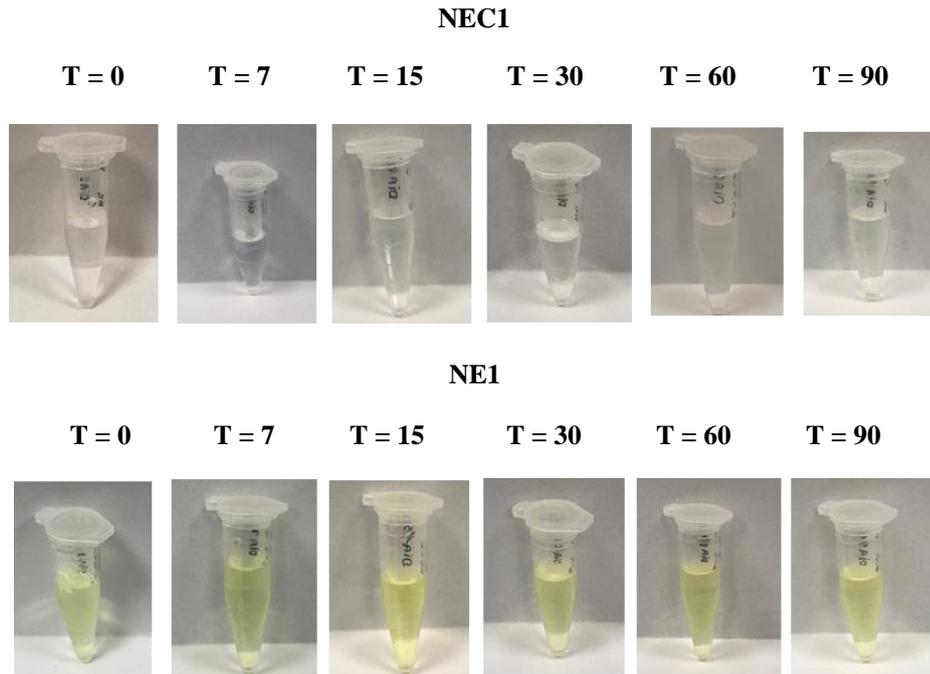


Figura 29. NEC1 e NE1 armazenadas à temperatura de $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante o período de 90 dias. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona.

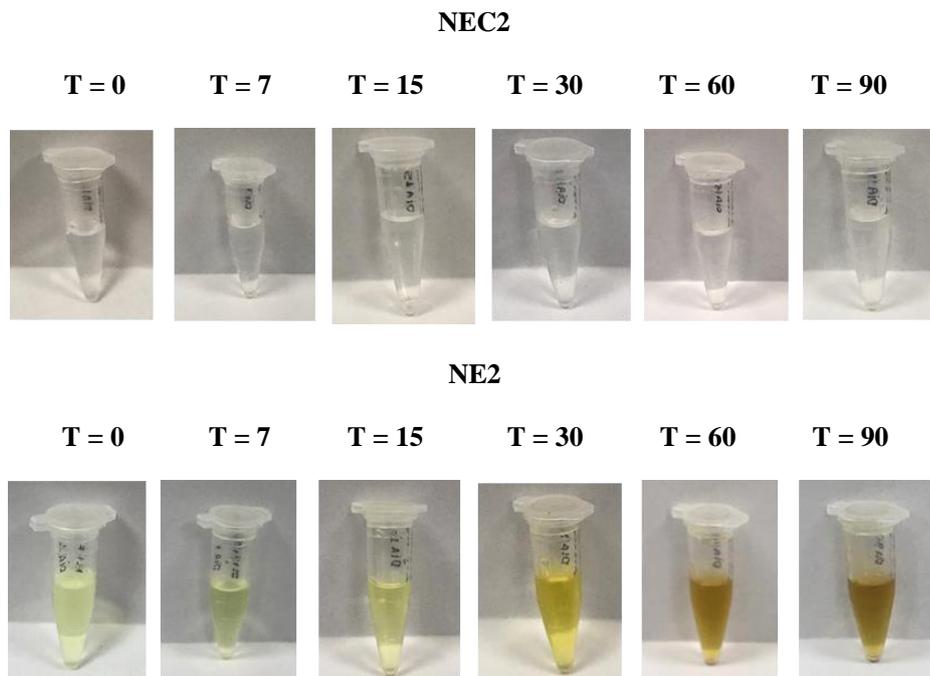


Figura 30. NEC2 e NE2 armazenadas à temperatura de $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante o período de 90 dias. Após o 30º dia de armazenamento é possível identificar alteração na coloração da NE2. NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer.

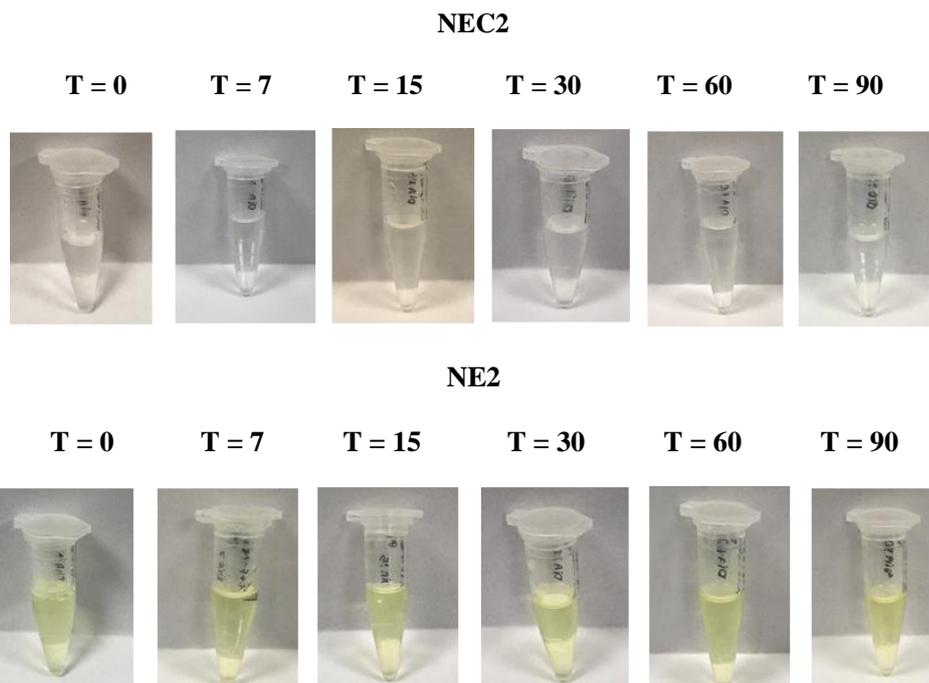


Figura 31. NEC2 e NE2 armazenadas à temperatura de $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante o período de 90 dias. NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer.

As nanoemulsões foram avaliadas quanto ao tamanho da gotícula por um período de 90 dias (Figura 32). As nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2, armazenadas em temperatura $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, permaneceram com uma média de tamanho de $21,4 \pm 0,4$; $22,4 \pm 1,7$; $26,1 \pm 0,5$; $26,6 \pm 0,7$ nm, respectivamente. Enquanto, isso, as nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2, armazenadas em temperatura $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, permaneceram com uma média de tamanho de $21,6 \pm 0,1$; $22,2 \pm 0,1$; $26,8 \pm 0,6$; $27,3 \pm 0,6$ nm, respectivamente.

Após a análise estatística, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa das amostras NEC1, NEC2 e NE2 armazenadas na temperatura de $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, ao longo dos 90 dias de estudo, contudo a NE1, armazenada nessas mesmas condições, apresentou uma diferença significativa ($p < 0,05$) no tempo 7 de análise. No entanto, tal alteração foi discreta e não foi observada nos demais dias.

Na temperatura de $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, não foi observado nenhuma diferença estatisticamente significativa das amostras NEC1, NE1 em relação ao diâmetro de gotículas. Contudo, na NE2, houve diferença significativa estatisticamente ($p < 0,05$) a partir do dia 15 de análise e na NEC2 houve diferença estatística ($p < 0,05$) durante todo o período de avaliação. Apesar disso, nenhuma amostra apresentou indícios de alteração física e não foi observado aumento do

tamanho das gotículas, que se mantiveram com diâmetro menor que 30 nm, levando à conclusão de que não houve perda da estabilidade das formulações armazenadas $5^\circ \pm 3^\circ\text{C}$.

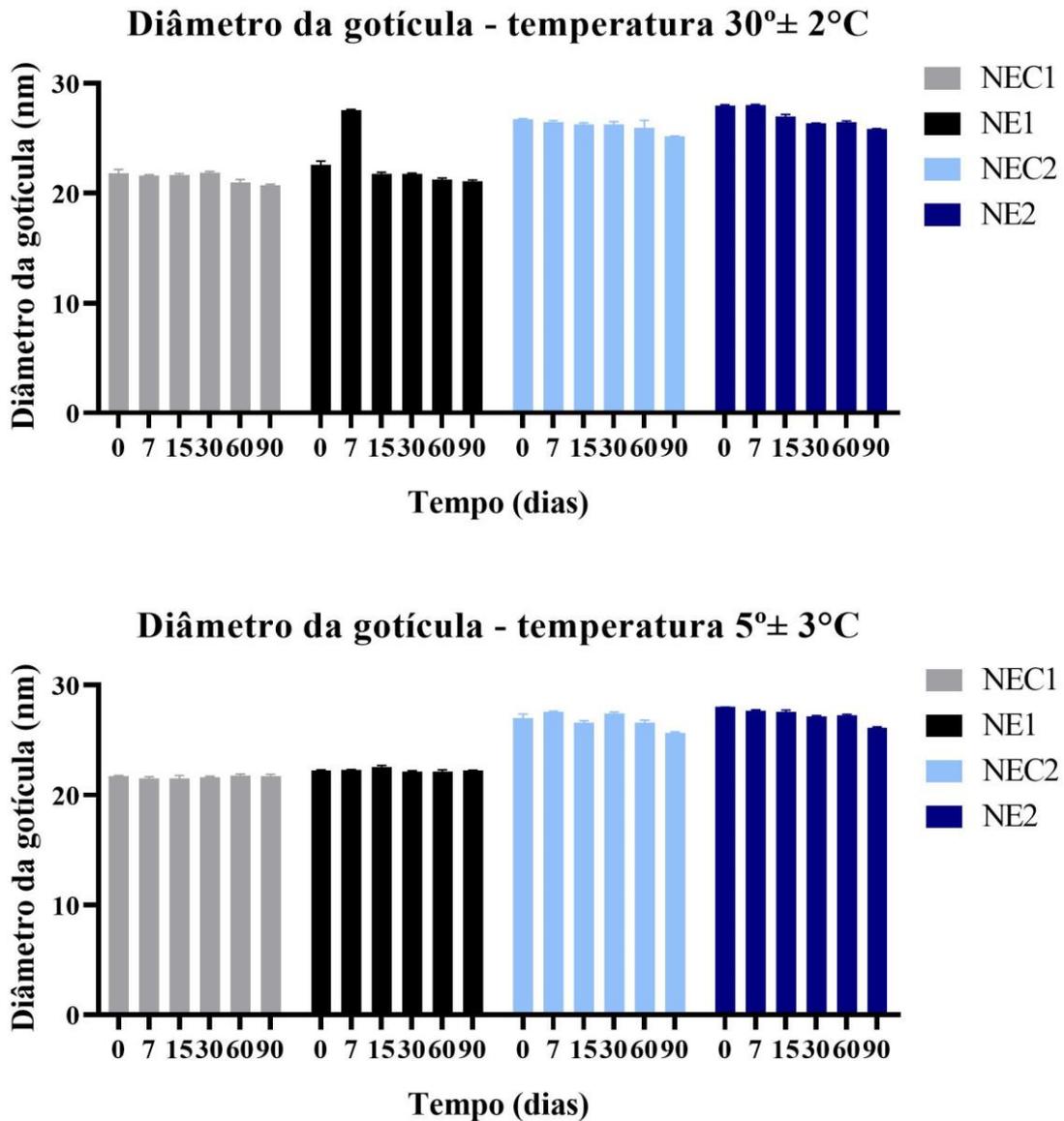


Figura 32. Diâmetro de gotícula das nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2 armazenadas à $30^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ e $5^\circ \pm 3^\circ\text{C}$, durante 90 dias. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer. Análise estatística por ANOVA.

O PDI indica a homogeneidade de distribuição do tamanho das gotículas, como já mencionado, valores menores que 0,200 sugerem uma distribuição de tamanho altamente homogênea no sistema.

Nas análises estatísticas, na temperatura de $30^\circ \pm 2^\circ\text{C}$, a NEC1 e a NE1 apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) a partir do tempo 30 de análise, a NEC2 apresentou diferença

estatística no tempo 90 de análise e a NE2 apresentou diferenças estatísticas a partir do 7º dia de análise. Já na temperatura de $5^\circ \pm 3^\circ\text{C}$, não foi observado nenhuma diferença estatisticamente significativa da amostra NEC1; a NE1 e a NE2 apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) no tempo 90; e a NEC2 obteve diferenças estatísticas ($p < 0,05$) somente nos tempos 7, 60 e 90.

Apesar das variações dos valores das análises, todas as nanoemulsões formadas (NEC1, NE1, NEC2 e NE2) armazenadas tanto à $30^\circ \pm 2^\circ\text{C}$, quanto à $5^\circ \pm 3^\circ\text{C}$, apresentaram valores de PDI menores do que 0,150 durante todo o período (Figura 33), indicando que ao longo do tempo de avaliação, as nanoemulsões se encontraram monodispersas.

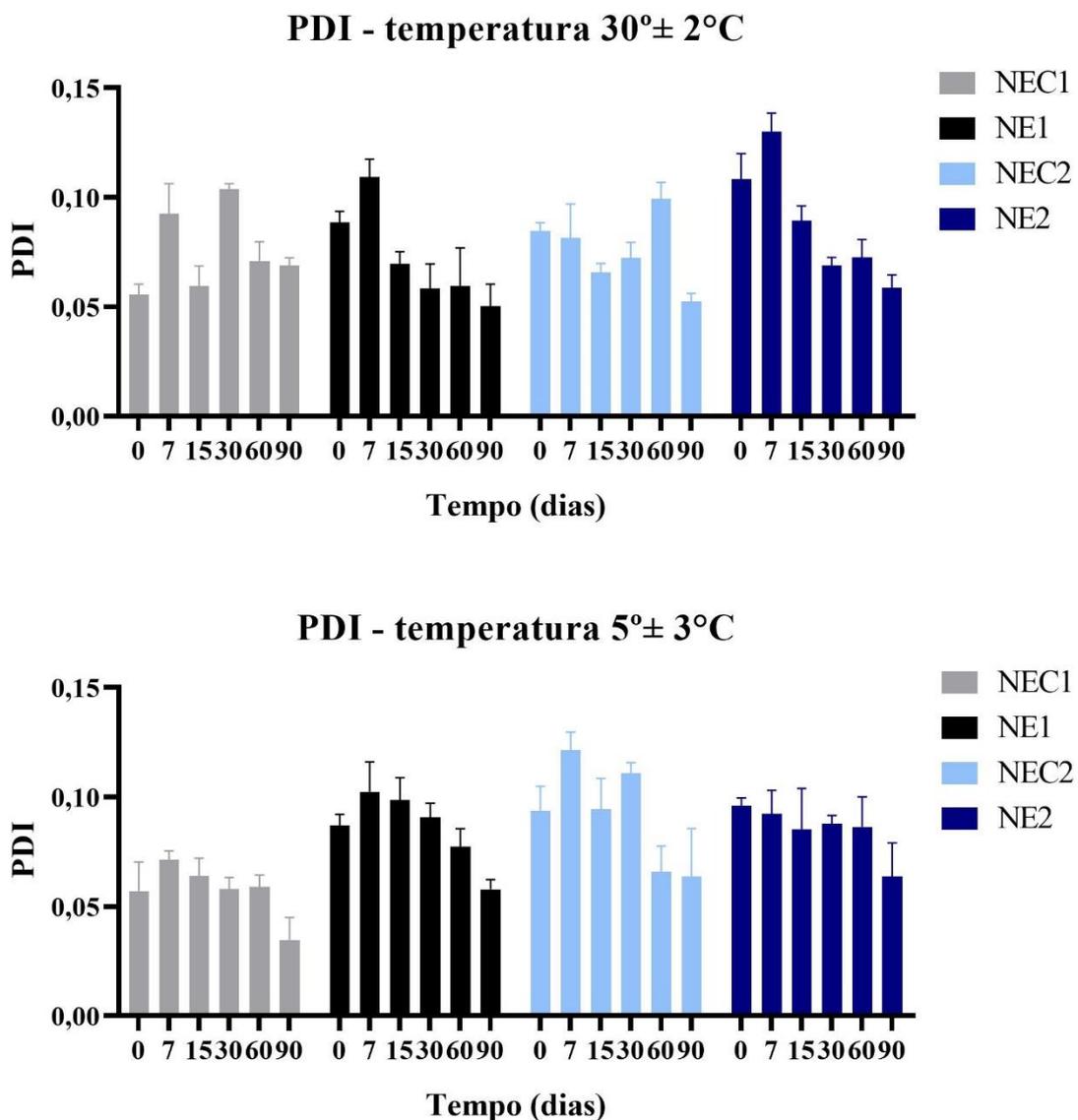


Figura 33. PDI das nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2 armazenadas à $30^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ e $5^\circ \pm 3^\circ\text{C}$, durante 90 dias. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer. Análise estatística por ANOVA.

A análise do potencial zeta ao longo dos 90 dias de análise referente às nanoemulsões formadas (NEC1, NE1, NEC2 e NE2) armazenadas tanto a $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, quanto a $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ pode ser feita pela observação dos dados apresentados na Figura 34.

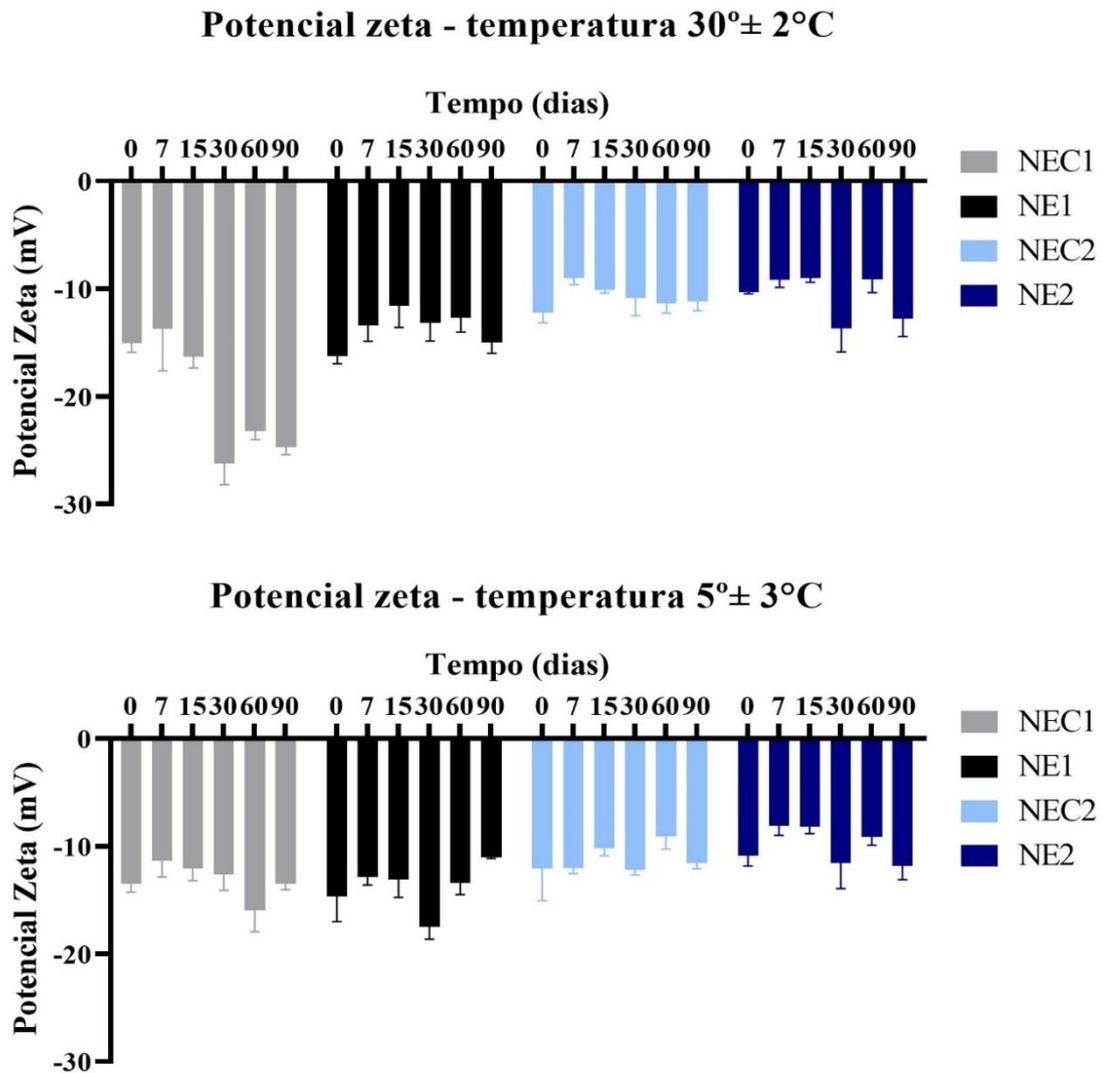


Figura 34. PDI das nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2 armazenadas à $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 90 dias. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer. Análise estatística por ANOVA.

Como descrito anteriormente, o potencial zeta faz referência à densidade de carga superficial das gotículas e informa sobre a atração ou repulsão entre elas. As formulações apresentaram cargas negativas, contudo próximas à neutralidade, ao longo de todo o período de análise. Não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) de potencial zeta ao longo dos 90 dias de análise em ambas nas amostras armazenadas à $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Nas formulações

armazenadas na temperatura de $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, foram observadas diferença estatística ($p < 0,05$) na NEC1, a partir do dia 30 de análise.

O pH é um fator chave na determinação da permeabilidade de um fármaco na córnea, uma vez que desvios no pH ideal para o olho aumenta a produção de lágrimas, provocando a perda do fármaco, o que diminui sua biodisponibilidade (AWWAD et al., 2017). Idealmente, uma formulação deve apresentar uma faixa de pH variando entre 6,6 – 7,8, contudo, o pH de colírios pode variar de 3,5 a 8,5 (BHARTI; KESAVAN, 2016). A variação de pH das nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2 armazenadas à $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, analisadas por 90 dias, foi representada na Figura 35.

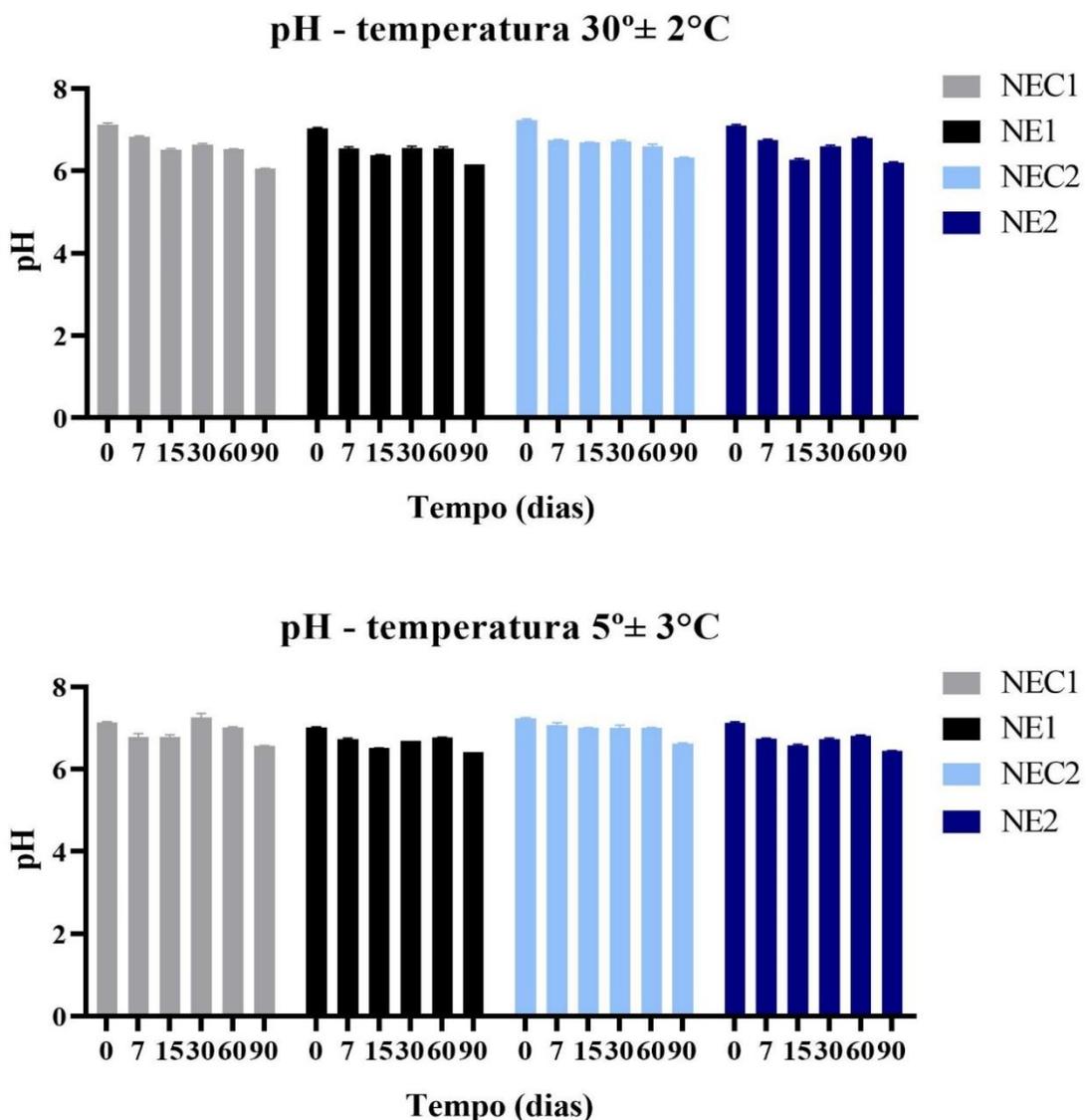


Figura 35. pH das nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2 armazenadas à $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 90 dias. NEC1 – nanoemulsão O/A sem os fármacos; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona; NEC2 – nanoemulsão O/A sem os fármacos com poloxamer; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasaona com poloxamer. Análise estatística por ANOVA.

As nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2, armazenadas em temperatura $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, apresentaram pHs $6,6 \pm 0,3$; $6,5 \pm 0,3$; $6,7 \pm 0,3$; $6,6 \pm 0,3$, respectivamente. Enquanto isso, as nanoemulsões NEC1, NE1, NEC2 e NE2, armazenadas em temperatura $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, permaneceram com uma média de pH igual a $6,9 \pm 0,2$; $6,7 \pm 0,2$; $7,0 \pm 0,2$; $6,7 \pm 0,2$, respectivamente. Nas análises estatísticas, em ambas as temperaturas, foram observadas diferenças estatísticas em todas as análises ao longo dos 90 dias ($p > 0,05$); porém, o pH se manteve dentro de uma faixa aceitável e sem alterações bruscas.

De maneira geral, esses experimentos indicam estabilidade física de todas as nanoemulsões por pelo menos 90 dias. Indicam também que a menor temperatura é ideal para armazenamento das nanoformulações, uma vez que preserva a coloração proveniente dos fármacos incorporados, que é sinal de estabilização química.

5.7 Perfil de liberação *in vitro* dos fármacos

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado com o objetivo de identificar a velocidade com que os fármacos foram liberados das formulações NE1 e NE2 em comparação a um controle do fármaco livre. Os resultados estão apresentados na Figura 36.

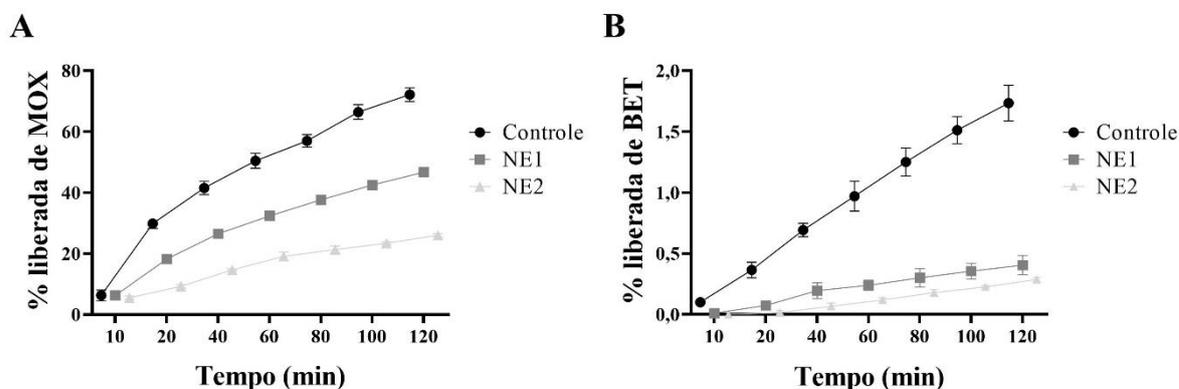


Figura 36. Perfis de liberação de MOX (A) e BET (B) a partir das formulações NE1, NE2 ou controle contendo os fármacos livres em solução na mesma concentração (1% de BET e 5% de MOX). Resultados apresentados como média \pm desvio padrão. BET – dipropionato de betametasona; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasona; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasona com poloxamer; MOX – cloridrato de moxifloxacino.

O MOX exibiu um padrão de liberação rápido no controle, em que mais de 70% do fármaco se difundiu através da membrana após duas horas de análise. A NE1 controlou de maneira consistente a liberação do fármaco quando comparada ao controle ($p \leq 0,0001$), resultando em uma liberação de aproximadamente 40% de MOX após as duas horas de análise.

Um resultado semelhante já foi descrito para nanoemulsão O/A de MOX preparada com Tween 80, Soluphor[®] P, oleato de etila e água, em que o sistema controlou em 60% a liberação do fármaco comparado com controle (SHAH et al., 2019).

Já a NE2 garantiu um controle ainda maior de liberação de MOX em relação às outras duas amostras ($p \leq 0,0001$), liberando aproximadamente 25% do fármaco no período de análise (Figura 36A). Este controle maior da liberação do fármaco hidrofílico ($\log P = -0,280$) (AL OMARI et al., 2014) da nanoformulação de gelificação *in situ* pode ser justificado pela maior viscosidade desta formulação em relação à NE1 e controle, que gera uma resistência à difusão do fármaco (PATEL et al., 2016).

Diferente do observado para o MOX, a BET livre teve maior dificuldade em se difundir da formulação em direção ao meio receptor aquoso através da membrana hidrofílica de celulose. Quando incorporado às nanoemulsões, o fármaco exibiu um padrão de liberação ainda mais controlado. Enquanto somente 2% do fármaco se difundiu através da membrana em duas horas de análise, a partir da NE1 foi liberado apenas 0,4% ($p \leq 0,05$) do fármaco no período e a partir da NE2, apenas 0,3% (Figura 36B). O controle da liberação desse fármaco pode ter ocorrido pelo seu aprisionamento nas gotículas das nanoemulsões devido à sua característica lipofílica ($\log P = 3,97$) (DOLOWY; PYKA, 2015), que resulta em alta solubilidade no óleo das nanogotículas da fase interna da formulação. Isso sugere que a solubilidade do fármaco pode ser considerada um fator importante para modificar a sua liberação da nanoformulação.

5.8 Estudos *ex vivo* da penetração ocular

Os estudos de penetração ocular *ex vivo* foram realizados com o objetivo de verificar o efeito da incorporação dos fármacos nas nanoemulsões quando aplicadas topicamente na córnea sobre a sua penetração. Nas Figura 37A e Figura 37B estão representadas as quantidades respectivamente de MOX e de BET recuperados da córnea após 1 hora de tratamento tópico com as formulações em uma condição estática (sem fluxo lacrimal) e em uma condição simulando o fluxo lacrimal.

Foi realizada a coleta do meio receptor para quantificação dos fármacos, contudo, não houve permeação de MOX ou de BET através da córnea a partir de nenhuma formulação avaliada (NE1 e NE2) ou do controle.

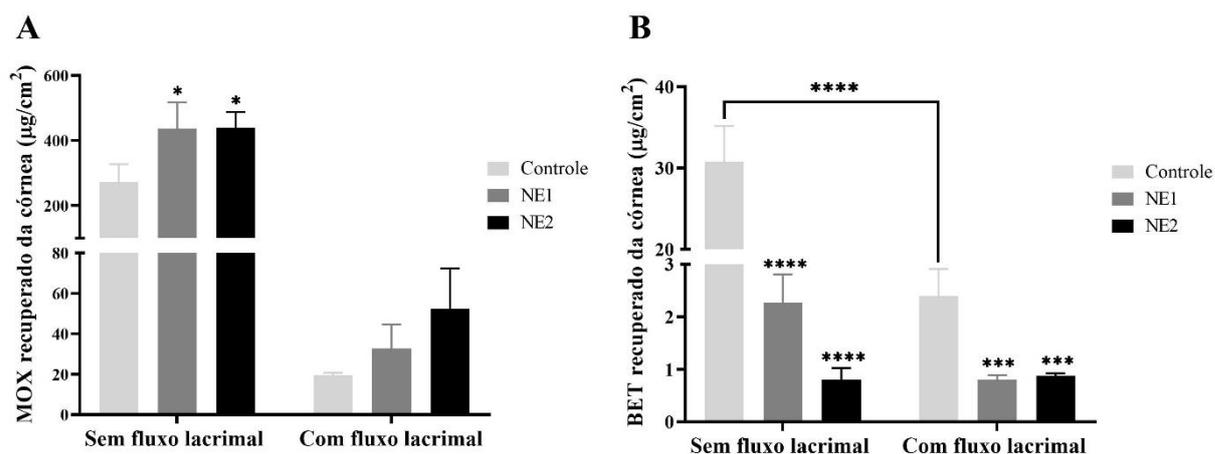


Figura 37. Quantificação de MOX (A) e de BET (B) recuperados da córnea após ensaios *ex vivo* de penetração ocular em condição estática (sem fluxo lacrimal) e em condição simulando o fluxo lacrimal, a partir das formulações NE1, NE2 ou controle contendo os fármacos livres em solução na mesma concentração (1% de BET e 5% de MOX). Análise estatística por ANOVA, onde (*)= $p \leq 0,05$, (***)= $p \leq 0,001$, (****)= $p \leq 0,0001$ em relação ao controle. BET – dipropionato de betametasona; NE1 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasona; NE2 – nanoemulsão O/A de moxifloxacino e betametasona com poloxamer; MOX – cloridrato de moxifloxacino.

Em condição estática, as formulações NE1 e NE2 aumentaram, respectivamente, 1,6 e 1,4 vezes a penetração do MOX na córnea comparada ao controle ($p \leq 0,05$) (Figura 37A). O aumento da penetração desse fármaco pode ter ocorrido pela interação das nanogotículas oleosas contendo tensoativo e do cotenosoativo em sua superfície com a córnea (MORSI et al., 2017). O aumento da viscosidade da formulação (PATEL et al., 2016), que refletiu no controle de liberação do MOX pela NE2 em relação à NE1 (Figura 36) causou uma mínima diminuição na penetração do fármaco, porém sem diferença estatística entre os dois grupos ($p > 0,05$). É importante ressaltar que a alta penetração do MOX a partir do controle deve ser resultante da ação do propilenoglicol como um promotor de permeação; entretanto, esse tipo de composição não seria viável para administração ocular por ser muito irritante, ao contrário das formulações NE1 e NE2.

A recuperação de MOX da córnea após 1 h de tratamento tópico com cada uma das formulações em uma condição de aplicação que simula o lacrimejamento (Figura 37A) indica que, em condições fisiológicas, há uma redução significativa da quantidade de fármaco capaz de penetrar na córnea a partir das duas formulações testadas (NE1 e NE2) ($p \leq 0,0001$) e do controle ($p \leq 0,001$). Apesar de não existir uma diferença estatisticamente significativa entre a penetração do fármaco a partir das nanoformulações em relação ao controle ($p > 0,05$), a NE2 aumentou 2,7 e 1,5 vezes a penetração do MOX em relação ao controle e a NE1,

respectivamente. O aumento da penetração da NE2 nesse experimento foi ainda maior do que no experimento estático, o que sugere viscosidade aumentada da formulação permitiu com que o fármaco permanecesse por um tempo prolongado em contato com a córnea, favorecendo a sua penetração ocular, mesmo quando a formulação era constantemente “lavada” pelo líquido que mimetizada o líquido lacrimal.

No caso do BET (Figura 37B), em condição estática, as formulações NE1 e NE2 diminuíram consideravelmente a penetração ocular do fármaco quando comparadas ao controle contendo o fármaco livre em solução ($p \leq 0,0001$). Possivelmente isso deve à alta solubilidade do fármaco em meio à fase oleosa da formulação, o que pode ter ocasionado um aprisionamento do BET nas gotículas oleosas da formulação, como já observado nos experimentos de liberação, evidenciando esse controle da liberação do fármaco lipofílico.

A Figura 37B também apresenta os dados da quantidade recuperada de BET da córnea após 1 h de tratamento tópico com as formulações, no ensaio simulando o fluxo lacrimal. A quantidade de fármaco que penetrou a córnea permaneceu maior no controle quando comparado às duas formulações NE1 e NE2 ($p \leq 0,001$). Contudo, houve uma redução considerável da penetração do BET entre o ensaio sem e com fluxo lacrimal ($p \leq 0,0001$), o que sugere que a baixa viscosidade do controle permitiu que o tampão fosfato removesse grande parte do fármaco que estava em contato com a superfície da córnea, impedindo que a sua penetração fosse similar à penetração observada em condições estáticas. Para a formulação NE1, também ocorreu uma diminuição significativa da penetração entre os dois ensaios ($p \leq 0,001$). Assim, como o controle, essa formulação apresenta baixos valores de viscosidade, o que a impedem de permanecer por um período prolongado na córnea. A penetração de BET na córnea a partir da NE2, por sua vez, não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) se compararmos as condições estática e dinâmica de aplicação. A viscosidade aumentada dessa formulação evitou sua remoção pela lágrima simulada e, dessa forma, o fármaco teve tempo suficiente para interagir e penetrar na córnea na mesma concentração que nos experimentos estáticos.

Portanto, considerando as diversas barreiras fisiológicas e anatômicas que restringem a administração de medicamentos ao segmento anterior do olho, levando à altas taxas de eliminação da formulação na superfície ocular, a viscosidade aumentada da formulação diminuiria essas taxas, promovendo uma liberação mais consistente e prolongada tanto do fármaco lipofílico quanto do hidrofílico.

6 CONCLUSÕES

Nesse estudo, foram desenvolvidos inicialmente dois métodos bioanalíticos capazes de quantificar de maneira seletiva, linear, precisa e exata os fármacos MOX e BET na presença de interferentes da córnea e das nanoformulações. Os estudos de pré-formulação permitiram concluir o MOX e a BET podem ser associados em uma mesma formulação sem comprometer a estabilidade e identidade de cada composto. Ainda, mostraram que ambos os fármacos são compatíveis com os excipientes selecionados para o preparo das nanoformulações.

Foram desenvolvidas duas nanoemulsões, uma líquida e uma de gelificação *in situ* contendo MOX e BET, que atenderam aos parâmetros físico-químicos esperados para uma nanoemulsão, com pH e osmolaridade que são compatíveis com uma aplicação ocular. As nanoemulsões de gelificação *in situ* contendo MOX e BET apresentaram uma temperatura ideal de gelificação, em que quando armazenada à temperaturas mais baixas, apresenta-se no estado líquido, podendo ser instilada no olho com precisão da dose, e quando em contato com a superfície ocular, essa formulação inicia seu processo de gelificação. Ainda, as nanoemulsões acondicionadas em $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ se mantiveram estáveis ao longo dos 90 dias de armazenamento.

As nanoformulações apresentaram um perfil controlado de liberação, exercendo um controle ainda mais prolongado para o fármaco lipofílico. As formulações nanoemulsionadas, em condições experimentais de aplicação estática sobre a córnea, aumentaram a penetração do MOX na superfície ocular, contudo não foram capazes de aumentar a penetração do BET. No ensaio simulando o fluxo lacrimal que mimetiza o que ocorre fisiologicamente, a penetração do MOX diminuiu consideravelmente em relação ao ensaio em condições estáticas, tanto para as nanoemulsões, quanto para o controle. Contudo, as formulações nanoemulsionadas permaneceram com uma taxa de penetração maior que o controle. A penetração do BET, por sua vez, foi reduzida a partir do controle e da nanoemulsão formulada sem o P407 no ensaio com fluxo lacrimal, quando comparado ao ensaio estático; no entanto, a nanoemulsão preparada com o P407 manteve a taxa de penetração do fármaco em ambos os tipos de experimento.

Assim, a nanoemulsão de gelificação *in situ* associando BET e MOX parece promover maior comodidade de aplicação, porque além de associar dois fármacos em um mesmo produto, é capaz de aumentar a penetração do fármaco hidrofílico (MOX) e manter essa penetração de maneira sustentada. Além disso, por aumentar o tempo de residência do fármaco lipofílico (BET) em contato com a córnea, também parece garantir uma liberação consistente e prolongada do BET na córnea.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAHARI, V. et al. A comprehensive insight on ocular pharmacokinetics. **Drug delivery and translational research**, v. 6, n. 6, p. 735–754, 2016.

AKO-ADOUNVO, A.-M. et al. Recent Patents on Ophthalmic Nanoformulations and Therapeutic Implications. **Recent patents on drug delivery & formulation**, v. 8, n. 3, p. 193–201, 2014.

AL-HALAFI, A. M. Nanocarriers of nanotechnology in retinal diseases. **Saudi Journal of Ophthalmology**, v. 28, n. 4, p. 304–309, 2014.

AL OMARI, M. M. H. et al. Moxifloxacin Hydrochloride. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, v. 39, p. 299–431, 2014.

ALI, A. et al. Nanoemulsion: An Advanced Vehicle for Efficient Drug Delivery. **Drug Research**, v. 67, n. 11, p. 617–631, 2017.

AMMAR, H. O. et al. Nanoemulsion as a potential ophthalmic delivery system for dorzolamide hydrochloride. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 3, p. 808–819, 2009.

AMMAR, H. O. et al. Development of dorzolamide hydrochloride in situ gel nanoemulsion for ocular delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 11, p. 1330–1339, 2010.

ANVISA. **Resolução nº 1 de 29 de julho de 2005. Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade**. Brasil: 2005

ANVISA. **RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012**. Brasil: 2012

ANVISA. **RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017**. Brasil: 2017

ÁVILA, M.; MUCCIOLI, C.; HÖFLING-LIMA, A. L. Efficacy and tolerability of a fixed-dose moxifloxacin – dexamethasone formulation for topical prophylaxis in LASIK : a comparative , double-masked clinical trial. **Clinical Ophthalmology**, v. 2, n. 2, p. 331–338, 2008.

AWWAD, S. et al. Principles of pharmacology in the eye. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 23, p. 4205–4223, 2017.

BACHU, R. D. et al. Ocular drug delivery barriers—role of nanocarriers in the treatment of anterior segment ocular diseases. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 1, p. 1–31, 2018.

BHARTI, S. K.; KESAVAN, K. Phase-transition W/O Microemulsions for Ocular Delivery: Evaluation of Antibacterial Activity in the Treatment of Bacterial Keratitis. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 25, n. 4, p. 463–474, 2016.

BHOSALE, S. D.; RAJPUT, S. J. RP-HPLC method for simultaneous determination of butenafine hydrochloride and betamethasone dipropionate in a cream formulation. **Journal of AOAC International**, v. 94, n. 1, p. 106–109, 2011.

CASSIANO, N. M. et al. Chromatographic methods validation for analysis of small molecules in biological matrices. **Quimica Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

CETINEL, S.; MONTEMAGNO, C. Nanotechnology for the prevention and treatment of cataract. **Asia-Pacific Journal of Ophthalmology**, v. 4, n. 6, p. 381–387, 2015.

CHANG, E. H. et al. Nanomedicine: Past, present and future - A global perspective. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 468, n. 3, p. 511–517, 2015.

CHAVAN, S. S.; INGLE, S. G.; VAVIA, P. R. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticle-based nasal spray of budesonide. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 3, n. 5, p. 402–408, 2013.

DA CUNHA, P. A. F. et al. Efficacy and tolerability of a gatifloxacin/prednisolone acetate fixed combination for topical prophylaxis and control of inflammation in phacoemulsification: A 20-day-double-blind comparison to its individual components. **Clinics**, v. 68, n. 6, p. 834–839, 2013.

DAY, A. C. et al. Surgical efficiency in femtosecond laser cataract surgery compared with phacoemulsification cataract surgery: A case-control study. **BMJ Open**, v. 8, n. 2, p. 6–11, 2018.

DEL BARRIO, J. L. A. et al. Small incision lenticule extraction (SMILE) in the correction of myopic astigmatism: outcomes and limitations - an update. **Eye and Vision**, v. 4, n. 1, p. 26, 2017.

DELMONTE, D. W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. **Journal of Cataract**

and Refractive Surgery, v. 37, n. 3, p. 588–598, 2011.

DESTRUUEL, P. L. et al. In vitro and in vivo evaluation of in situ gelling systems for sustained topical ophthalmic delivery: state of the art and beyond. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 4, p. 638–651, 2017.

DOLOWY, M.; PYKA, A. Evaluation of lipophilic properties of betamethasone and related compounds. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 72, n. 4, p. 671–681, 2015.

DOS SANTOS, G. A. et al. Besifloxacin liposomes with positively charged additives for an improved topical ocular delivery. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–18, 2020.

DUKOVSKI, B. J. et al. Functional ibuprofen-loaded cationic nanoemulsion: Development and optimization for dry eye disease treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 576, 2019.

EGHRARI, A. O.; RIAZUDDIN, S. A.; GOTTSCH, J. D. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 134, p. 7–23, 2015.

FERREIRA, K. S. A. et al. Ocular delivery of moxifloxacin-loaded liposomes Perfil de liberação ocular de lipossomas contendo moxifloxacino. **Arq Bras Oftalmol**, v. 81, n. 6, p. 510–513, 2018.

GADE, S. et al. An Ex Vivo Evaluation of Moxifloxacin Nanostructured Lipid Carrier Enriched In Situ Gel for Transcorneal Permeation on Goat Cornea. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 9, p. 2905–2916, 2019.

GANESH, S.; BRAR, S.; ARRA, R. R. Refractive lenticule extraction small incision lenticule extraction: A new refractive paradigm. **Indian journal of ophthalmology**, v. 66, n. 1, p. 10, 2017.

GIANNOLA, L. I. et al. Ocular gelling microspheres: In vitro precorneal retention time and drug permeation through reconstituted corneal epithelium. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, n. 2, p. 186–196, 2008.

GOMES, R. L. R. et al. Aqueous humor concentrations of topical fluoroquinolones alone or in combination with a steroid. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 80, n. 5, p. 300–303,

2017.

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

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

GUPTA, C.; JUYAL, V.; NAGAICH, U. Formulation, optimization, and evaluation of in-situ gel of moxifloxacin hydrochloride for ophthalmic drug delivery. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, v. 11, n. 4, p. 147–158, 2019.

GUPTA, P. N. et al. Development and evaluation of paclitaxel loaded PLGA: Poloxamer blend nanoparticles for cancer chemotherapy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 393–399, 2014.

HANNA, P. A.; GHORAB, M. M.; GAD, S. Development of Betamethasone Dipropionate-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Topical and Transdermal Delivery. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 26–44, 2019.

HARIPRIYA, A. Antibiotic prophylaxis in cataract surgery – An evidence - based approach. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 65, n. 12, p. 1390–1395, 2017.

HEGDE, R. R.; VERMA, A.; GHOSH, A. Microemulsion: New Insights into the Ocular Drug Delivery. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

HILLIER, R. J. et al. The Pneumatic Retinopexy versus Vitrectomy for the Management of Primary Rhegmatogenous Retinal Detachment Outcomes Randomized Trial (PIVOT). **Ophthalmology**, v. 126, n. 4, p. 531–539, 2019.

HUANG, A. S.; FRANCIS, B. A.; WEINREB, R. N. Structural and functional imaging of aqueous humour outflow: a review. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 46, n. 2, p. 158–168, 2018.

ICH. **Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)**. 2003

ICH. **Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2(R1)**. 2005

ICH. **ICH Harmonised Guideline - Bioanalytical Method Validation - M10**. 2019

IMPERIALE, J. C.; ACOSTA, G. B.; SOSNIK, A. Polymer-based carriers for ophthalmic drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 285, p. 106–141, 2018.

JACOBS, D. S. Diagnosis and Treatment of Ocular Pain: the Ophthalmologist's Perspective. **Current Ophthalmology Reports**, v. 5, n. 4, p. 271–275, 2017.

JANAGAM, D. R.; WU, L.; LOWE, T. L. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 122, p. 31–64, 2017.

JANKOVIĆ, J. et al. Evaluation of critical formulation parameters in design and differentiation of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDSs) for oral delivery of aciclovir. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 497, n. 1–2, p. 301–311, 2016.

JOHNSTON, S. E. et al. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for simultaneous assay of betamethasone dipropionate, chlorocresol, and for the estimation of betamethasone dipropionate related compounds in a pharmaceutical cream and ointment. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, n. 9, p. 733–741, 2010.

JONES, B. M.; NEVILLE, M. W. Nepafenac: An ophthalmic nonsteroidal antiinflammatory drug for pain after cataract surgery. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 47, n. 6, p. 892–896, 2013.

JURETIĆ, M. et al. Biopharmaceutical evaluation of surface active ophthalmic excipients using in vitro and ex vivo corneal models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 120, p. 133–141, 2018.

KALAM, M. A. Development of chitosan nanoparticles coated with hyaluronic acid for topical ocular delivery of dexamethasone. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 127–136, 2016.

KANG, H. et al. Cyclosporine A micellar delivery system for dry eyes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 2921–2933, 2016.

KAUR, I. P.; KAKKAR, S. Nanotherapy for posterior eye diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 100–112, 2014.

KELS, B. D.; GRZYBOWSKI, A.; GRANT-KELS, J. M. Human ocular anatomy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 2, p. 140–146, 2015.

KHAN, F. U. et al. Simultaneous determination of moxifloxacin and ofloxacin in physiological fluids using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1017–1018, p. 120–128, 2016.

KHURANA, L. K. et al. Systematic Development and Optimization of an in-situ Gelling System for Moxifloxacin Ocular Nanosuspension using High-pressure Homogenization with an Improved Encapsulation Efficiency. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 12, 2018.

KIM, T. IM et al. Refractive surgery. **The Lancet**, v. 393, n. 10185, p. 2085–2098, 2019.

KOPECKY, A.; NEMCANSKY, J. Changes in the anterior segment of the eye following uncomplicated pars plana vitrectomy. A review. **Biomedical Papers**, v. 163, n. 3, p. 207–211, 2019.

KRTALIC, I. et al. D-Optimal Design in the Development of Rheologically Improved In Situ Forming Ophthalmic Gel. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 6, p. 1562–1571, 2018.

KUMAR, A. K. H. et al. Simple and rapid liquid chromatography method for determination of moxifloxacin in saliva. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 30, p. 3663–3667, 2011.

KUMAR, M. et al. Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: A review. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 24, n. 3, p. 225–234, 2019.

KUMAR, R. et al. Ultrasound processed nanoemulsion: A comparative approach between resver- atrol and resveratrol cyclodextrin inclusion complex to study its binding inter- actions, antioxidant activity and UV light stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 478–489, 2017.

KURYAN, J.; CHEEMA, A.; CHUCK, R. S. Laser-assisted subepithelial keratectomy (LASEK) versus laser-assisted in-situ keratomileusis (LASIK) for correcting myopia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2017.

LABAN-DJURDJEVIĆ, A.; JELIKIĆ-STANKOV, M.; DJURDJEVIĆ, P. Optimization and validation of the direct HPLC method for the determination of moxifloxacin in plasma. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 844, n. 1, p. 104–111, 2006.

LALU, L. et al. Novel nanosystems for the treatment of ocular inflammation: Current paradigms and future research directions. **Journal of Controlled Release**, v. 268, p. 19–39, 2017.

LI, S.; JIE, Y. Cataract surgery and lens implantation. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 30, n. 1, p. 39–43, 2019.

LI, T. et al. Mucoadhesive in situ forming gel for oral mucositis pain control. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 580, p. 119238, 2020.

LIU, Y. C. et al. Cataracts. **The Lancet**, v. 390, n. 10094, p. 600–612, 2017.

LYSENG-WILLIAMSON, K. A. Loteprednol etabonate ophthalmic gel 0.5 %: A review of its use in post-operative inflammation and pain following ocular surgery. **Drugs**, v. 73, n. 9, p. 949–958, 2013.

MAHBOOBAN, M. M. et al. Formulation development and evaluation of the therapeutic efficacy of brinzolamide containing nanoemulsions. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 3, p. 847–857, 2017.

MAHOR, A. et al. Moxifloxacin loaded gelatin nanoparticles for ocular delivery: Formulation and in-vitro, in-vivo evaluation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 483, p. 132–138, 2016.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 2012.

MEHANNA, M. M.; MNEIMNEH, A. T.; ABED EL JALIL, K. Levofloxacin-loaded naturally occurring monoterpene-based nanoemulgel: a feasible efficient system to circumvent MRSA ocular infections. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 46, n. 11, p. 1787–1799, 2020.

MIESFELD, J. B.; BROWN, N. L. Eye organogenesis: A hierarchical view of ocular

development. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 132, p. 351–393, 2019.

MILLER, D. Review of moxifloxacin hydrochloride ophthalmic solution in the treatment of bacterial eye infections. **Clinical Ophthalmology**, n. April 2008, p. 77, 2008.

MOHAMMADI, M. et al. Injectable drug depot engineered to release multiple ophthalmic therapeutic agents with precise time profiles for postoperative treatment following ocular surgery. **Acta Biomaterialia**, v. 73, p. 90–102, 2018.

MORSI, N. et al. Nanoemulsion-based electrolyte triggered in situ gel for ocular delivery of acetazolamide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. April, p. 302–314, 2017.

NAGPAL, M. et al. Topical nepafenac 0.1% alone versus prednisolone acetate 1% as postoperative anti-inflammatory agents in small gauge vitrectomy. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 62, n. 5, p. 606–609, 2014.

NAM, Y. S.; KWON, I. K.; LEE, K. B. Monitoring of clobetasol propionate and betamethasone dipropionate as undeclared steroids in cosmetic products manufactured in Korea. **Forensic Science International**, v. 210, n. 1–3, p. 144–148, 2011.

NANJWADE, B. K. et al. Formulation and evaluation of micro hydrogel of Moxifloxacin hydrochloride. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 37, n. 2, p. 117–123, 2011.

NAYAK, K.; MISRA, M. A review on recent drug delivery systems for posterior segment of eye. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 107, n. February, p. 1564–1582, 2018.

OLIVEIRA, P. M. et al. LC–MS bioanalytical method for simultaneous determination of latanoprost and minoxidil in the skin. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, p. 113373, 2020.

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

PARK, S. E.; TSENG, M.; LEE, J. K. Effectiveness of intracorneal ring segments for keratoconus. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 30, n. 4, p. 220–228, 2019.

PATEL, N. et al. Development of loteprednol etabonate-loaded cationic nanoemulsified in-situ ophthalmic gel for sustained delivery and enhanced ocular bioavailability. **Drug Delivery**, v. 23, n. 9, p. 3712–3723, 2016.

PATHAK, M. K.; CHHABRA, G.; PATHAK, K. Design and development of a novel pH triggered nanoemulsified in-situ ophthalmic gel of fluconazole: Ex-vivo transcorneal permeation, corneal toxicity and irritation testing. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 5, p. 780–790, 2013.

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

RABINOWITZ, Y. S. Keratoconus. **Survey of Ophthalmology**, v. 42, n. 4, p. 297–319, 1998.

RAI, V. K. et al. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of Controlled Release**, v. 270, p. 203–225, 2018.

RAM, J. et al. Prevention of postoperative infections in ophthalmic surgery. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 49, n. 1, p. 59–69, 2001.

REIS, T. A. et al. Simple and Selective HPLC-UV/Vis Bioanalytical Method to Determine Aluminum Phthalocyanine Chloride in Skin Permeation Studies. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2018, 2018.

RESPAUD, R. et al. High-performance liquid chromatography assay for moxifloxacin in brain tissue and plasma: Validation in a pharmacokinetic study in a murine model of cerebral listeriosis. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 1, n. 1, 2012.

SAAD, S. et al. Corneal crosslinking in keratoconus management. **Journal Français d’Ophtalmologie**, v. 43, n. 10, p. 1078–1095, 2020.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. et al. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye – Part I – Barriers and determining factors in ocular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 110, p. 70–75, 2016.

SCHIEFER, U. et al. Refractive error. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 113, n. 41, p.

693–702, 2016.

SHAH, J. et al. Nanoemulsion based vehicle for effective ocular delivery of moxifloxacin using experimental design and pharmacokinetic study in rabbits. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, p. 230, 2019.

SHAH, S. M. et al. Preclinical formulations: Insight, strategies, and practical considerations. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 5, p. 1307–1323, 2014.

SHOKOOHI-RAD, S. et al. Comparison between Betamethasone, Fluorometholone and Loteprednol Etabonate on intraocular pressure in patients after keratorefractive surgery. **Journal of Current Ophthalmology**, v. 30, n. 2, p. 130–135, 2018.

SHOSS, B. L.; TSAI, L. M. Postoperative care in cataract surgery. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 24, n. 1, p. 66–73, 2013.

SHUKLA, P. et al. Moxifloxacin-loaded nanoemulsions having tocopheryl succinate as the integral component improves pharmacokinetics and enhances survival in e. Coli -induced complicated intra-abdominal infection. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 12, p. 4314–4326, 2014.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017.

SINHA, S. et al. Fixed combination netarsudil-latanoprost for the treatment of glaucoma and ocular hypertension. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 21, n. 1, p. 39–45, 2019.

SONAWANE, R. et al. Solid lipid nanoparticles-loaded topical gel containing combination drugs: An approach to offset psoriasis. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 12, p. 1833–1847, 2014.

SOOD, S.; JAIN, K.; GOWTHAMARAJAN, K. Optimization of curcumin nanoemulsion for intranasal delivery using design of experiment and its toxicity assessment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 330–337, 2014.

SOUZA, J. G. et al. Topical delivery of ocular therapeutics: Carrier systems and physical methods. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 4, p. 507–530, 2014.

SRIDHAR, M. S. Anatomy of cornea and ocular surface. **Indian J Ophthalmol**, v. 66, n. 2, p. 190–194, 2018.

STEEL, D. Retinal detachment. **BMJ Clinical Evidence**, v. 03, p. 710, 2014.

SURESH, P. K.; SAH, A. K. Patent perspectives for corticosteroids based ophthalmic therapeutics. **Recent patents on drug delivery & formulation**, v. 8, n. 3, p. 206–223, 2014.

TEWELDEMEDHIN, M. et al. Bacterial profile of ocular infections: A systematic review. **BMC Ophthalmology**, v. 17, n. 1, p. 212, 2017.

THOMPSON, J.; LAKHANI, N. Cataracts. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 42, n. 3, p. 409–423, 2015.

TITIYAL, J. S. et al. Small incision lenticule extraction (SMILE) techniques: Patient selection and perspectives. **Clinical Ophthalmology**, v. 12, p. 1685–1699, 2018.

TSUJI, F. et al. The effects of betamethasone derivatives on endotoxin-induced uveitis in rats. **Exp. Eye Res.**, v. 64, n. 31–36, 1997a.

TSUJI, F. et al. The effects of betamethasone derivatives on endotoxin-induced uveitis in guinea pigs. **Inflammation Research**, v. 46, n. 12, p. 486–490, 1997b.

TUNG, N. T.; VU, V. D.; NGUYEN, P. L. DoE-based development, physicochemical characterization, and pharmacological evaluation of a topical hydrogel containing betamethasone dipropionate microemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, p. 480–488, 2019.

VAIRALE, A. S.; SIVASWAROOP, P.; BANDANA, S. Development and validation of stability-indicating HPLC method for betamethasone dipropionate and related substances in topical formulation. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 2, p. 107–115, 2012.

WANG, B. et al. Preparation and evaluation of spirulina polysaccharide nanoemulsions. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 42, n. 3, p. 1273–1282, 2018.

WEINREB, R. N.; AUNG, T.; MEDEIROS, F. A. The pathophysiology and treatment of glaucoma: A review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 18,

p. 1901–1911, 2014.

YESILIRMAK, N.; DAVIS, Z.; YOO, S. H. Refractive Surgery (SMILE vs. LASIK vs. Phakic IOL). **International Ophthalmology Clinics**, v. 56, n. 3, p. 137–147, 2016.

YUKUYAMA, M. N. et al. Nanoemulsion: Process selection and application in cosmetics - A review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, n. 1, p. 13–24, 2016.

ZIAEI, M. et al. Comparison of corneal biomechanical properties following penetrating keratoplasty and deep anterior lamellar keratoplasty for keratoconus. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 48, n. 2, p. 174–182, 2020.