

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

JOSÉ IZO SANTANA DA SILVA DE JESUS

Nanocristais de besifloxacino para o tratamento de conjuntivite bacteriana:
preparação, caracterização físico-química e toxicidade.

Dissertação para obtenção do título de MESTRE.

Orientadora: Prof. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra

São Paulo 2022

JOSÉ IZO SANTANA DA SILVA DE JESUS

Nanocristais de besifloxacino para o tratamento de conjuntivite bacteriana:
preparação, caracterização físico-química e toxicidade.

Versão Original

Dissertação apresentada a Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Programa de Pós-graduação em Fármaco e
Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos
Orientadora: Prof. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra

São Paulo 2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

J58n	Jesus, José Izo Santana da Silva de Nanocristais de besifloxacino para o tratamento de conjuntivite bacteriana: preparação, caracterização físico-química e toxicidade / José Izo Santana da Silva de Jesus. - São Paulo, 2022. 107 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia - Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos. Orientador: Bou-Chacra, Nádia Araci 1. Nanotecnologia. 2. Conjuntivite. 3. Besifloxacino. 4. Povacoat®. 5. Fluoroquinolonas. I. T. II. Bou-Chacra, Nádia Araci , orientador.
------	---

Nome: José Izo Santana da Silva de Jesus

Título: Nanocristais de besifloxacino para o tratamento de conjuntivite bacteriana: preparação, caracterização físico-química e toxicidade.

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha esposa, com amor e gratidão por sua compreensão, aos meus filhos, à minha família, amigos e colegas por todo apoio e torcida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por iluminar e me prover de coragem para realizar esse sonho, Ele que abençoa a minha vida em todas as circunstâncias.

Agradeço à Profa. Dra. Nádia Araci Bou Chacra por me aceitar como aluno de pós-graduação, por toda dedicação, aconselhamentos, paciência e confiança.

Aos meus colegas de laboratório, por todos ensinamentos, parcerias e discussões técnicas.

À toda equipe do Departamento de Farmácia do Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos.

À Profa. Dra. Iolanda Midea Cuccovia do Departamento de Bioquímica (IQ/USP) que abriu as portas do seu laboratório, possibilitando a conclusão de etapas essenciais desse estudo, em tempo adequado.

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz e à toda equipe e colegas do DEINFAR, pelo compartilhamento do laboratório e equipamentos.

À Profa. Dra. Kelly Ishida e a doutoranda Thayná L. Barreto, pelos ensinamentos e parceria referente às análises de toxicidade.

Ao Prof. Dr. Felipe Rabelo Lourenço pelo apoio na realização das análises microbiológicas.

À Profa. Dra. Priscyla Daniely M. Gaspari e ao Prof. Dr. Newton Andréo Filho pelos comentários valiosos durante meu exame de qualificação.

Ao Grupo Eurofarma, principalmente, à unidade Momenta e aos meus gestores que me deram flexibilidade para concluir esse projeto.

À minha família, colegas e amigos que torceram por mim. Especialmente, a minha esposa pela compreensão e paciência e aos meus filhos Victor e Heloísa que me proporcionam motivação todos os dias.

RESUMO

Jesus, J.I.S.S. Nanocristais de besifloxacino para o tratamento de conjuntivite bacteriana: preparação, caracterização físico-química e toxicidade. 2022. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A conjuntivite bacteriana tem significativo impacto na Saúde Pública. Essa infecção representa mais de um terço das doenças oculares relatadas em âmbito global. É uma doença altamente contagiosa causada por variedade de bactérias aeróbias e anaeróbias. Diferentes antibióticos empregados no tratamento dessa doença têm apresentado elevada incidência de resistência bacteriana. Dentre os antibióticos de última geração, destaca-se o besifloxacino, antibiótico de quarta geração da classe das fluoroquinolonas, indicado exclusivamente para uso oftálmico tópico. Entretanto, esse fármaco possui baixa solubilidade em água, diminuindo sua biodisponibilidade. Tendo em vista superar esse desafio, foi proposta abordagem nanotecnológica para o desenvolvimento de nanocristais desse fármaco. A preparação de nanocristais de besifloxacino empregando moagem via úmida em escala reduzida foi promissora empregando tensoativo Povacoat®. O Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) da partícula foi de aproximadamente 550 nm, com índice de polidispersão (IP) menor que 0,2. Esse resultado permitiu aumentar a solubilidade de saturação em aproximadamente duas vezes em relação a matéria-prima, possibilitando aumentar a velocidade de dissolução desse fármaco e melhorar sua biodisponibilidade e segurança. Além disso, foi validado o método para quantificação do besifloxacino por CLAE, apresentando especificidade, linearidade no intervalo de 20 a 80 µg/mL ($r = 0,9996$), precisão por repetibilidade (DPR= 1,20%, 0,84% e 0,39%), precisão intermediária (DPR= 0,94%) e exatidão 99,03%. Estudo de estabilidade acelerado (90 dias) na condição 40°C±2°C/75%UR±5%UR e estudo de estabilidade de acompanhamento (150 dias) na condição: 25°C ± 2°C / 60% UR ± 5% UR evidenciaram a estabilidade do teor no período avaliado. Ainda, a nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m (nanocristais) na dose máxima (500 mg/kg) e o estabilizante Povacoat® (750 mg/kg) não apresentaram toxicidade em larvas de *G. mellonella*. A concentração inibitória mínima (CIM) para a formulação inovadora foi de 0,0960 µg/mL e 1,60 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente, confirmando eficácia *in vitro*.

Palavras-Chave: nanocristais; conjuntivite; besifloxacino; Povacoat®; fluoroquinolonas.

ABSTRACT

Jesus, J.I.S.S. Besifloxacin nanocrystals for treating bacterial conjunctivitis: preparation, physicochemical characterization, and toxicity. 2022. MS. Thesis – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

Bacterial conjunctivitis greatly impacts the population's health, presenting more than a third of eye diseases reported worldwide. It is an infection caused by various aerobic and anaerobic bacteria and is highly contagious. Therefore, it presents a high incidence of bacterial resistance to the antibiotics commonly used for treatment. Among the most recent antibiotics, besifloxacin is a fourth-generation fluoroquinolone antibiotic indicated exclusively for topical ophthalmic use. Due to its importance in treating bacterial conjunctivitis and its low solubility in the water, a nanotechnological approach was proposed to develop besifloxacin nanocrystals. The preparation of besifloxacin nanocrystals using small-scale wet milling was promising using Povacoat® surfactant. The particle's average hydrodynamic diameter (DHM) was approximately 550 nm, with a polydispersity index (IP) of less than 0.2. This result increased the saturation solubility approximately two times concerning the raw material, making it possible to increase the dissolution rate of this drug and improve its bioavailability and safety. In addition, the method for quantification of besifloxacin by HPLC was validated, presenting specificity, linearity in the range of 20 to 80 µg/mL ($r = 0.9996$), precision by repeatability (DPR= 1.20%, 0.84% and 0.39%), intermediate precision (DPR= 0.94%) and accuracy 99.03%. Accelerated stability study (90 days) at 40°C±2°C/75%RH±5%RH condition and follow-up stability study (150 days) at 25°C ± 2°C / 60% RH ± condition 5% RH showed the stability of content in the evaluated period. Furthermore, the 0.6% besifloxacin nanosuspension (nanocrystals) at the maximum dose (500 mg/kg) and the Povacoat® stabilizer (750 mg/kg) did not show toxicity in *G. mellonella* larvae. The minimum inhibitory concentration (MIC) to innovative formulation was 0.0960 µg/mL and e 1.60 µg/mL against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively, confirming in vitro efficacy.

Keywords: nanocrystals; conjunctivitis; besifloxacin; Povacoat®; fluoroquinolones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração em 2D e 3D da molécula besifloxacino, respectivamente.

Figura 2 - Aumento da solubilidade de saturação (CS) e aumento da pressão de dissolução de uma superfície plana, uma micropartícula e uma nanopartícula. Sendo PX: pressão de dissolução.

Figura 3 - Diminuição da camada de difusão (h), aumento do gradiente de concentração CS – CX/h.

Figura 4 - Distribuição do tamanho de partícula para o produto comercial Besivance® e do cloridrato de besifloxacino. Os picos representam a média de 3 leituras

Figura 5 - Microfotografia do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima), objetiva: 10x/0,25.

Figura 6 - Curvas de inibição do crescimento bacteriano para determinação da CIM do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e do produto Besivance® frente a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Figura 7 - Cromatogramas da amostra de nanossuspensão de besifloxacino (preto) do diluente/fase móvel (azul) e do placebo (rosa), para avaliação da seletividade do método

Figura 8 - Pureza do pico de besifloxacino obtido a partir dos cromatogramas das amostras do produto Besivance® e da fórmula otimizada (nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m).

Figura 9 - Intensidade de detecção UV do pico de besifloxacino a 295nm.

Figura 10 - Curva analítica de cloridrato de besifloxacino SQR com correlação 0,99963 calculado pelo software Chromeleon® Version 6.80.

Figura 11 - Gráfico de linha ajustada de área versus concentração: curva de calibração da linearidade.

Figura 12 - Gráfico de dispersão dos resíduos para análise da linearidade do método por CLAE.

Figura 13 - Estabilidade (aspecto) das fórmulas BSF 60mg + POVA 100mg (F1), BSF 60 mg + KLT 30mg + QUITO 30mg (F3), BSF 60mg + P407 50mg + QUITO 50mg (F7) e BSF 60mg + P407 30mg + QUITO 30mg (F8). Após 15 dias.

Figura 14 - Estrutura Química do Povacoat®.

Figura 15 - Gráfico de contorno relativo à avaliação do DHM do nanocristal de besifloxacino, cujas variáveis são: concentração de besifloxacino (% m/m), concentração de Povacota® (% m/m) e velocidade (rpm).

Figura 16 - Gráfico de superfície relativo à avaliação do DHM do nanocristal de besifloxacino, cujas variáveis são: concentração de besifloxacino (% m/m), concentração de Povacota® (% m/m) e velocidade (rpm).

Figura 17 - Gráfico de resíduos para o modelo estatístico da formulação de nanocristal de besifloxacino 0,6% m/m com o estabilizante Povacoat®.

Figura 18 - Distribuição das partículas da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m por difração a laser (DL).

Figura 19 - Distribuição (monomodal) do DHM das partículas da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m por espalhamento de luz dinâmica (DLS), para verificar a eficiência do processo de liofilização.

Figura 20 - Curvas DSC dos componentes da formulação, da mistura (mesma proporção da formulação) e dos nanocristais de besifloxacino.

Figura 21 - Termogravimetria (TG) dos componentes da formulação, da mistura (mesma proporção da formulação) e dos nanocristais de besifloxacino.

Figura 22 - Termogravimetria Derivada (TG) dos componentes da formulação, da mistura (mesma proporção da formulação) e dos nanocristais de besifloxacino.

Figura 23 - Difração de raios-X do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e dos nanocristais (nanossuspensão 0,6% m/m liofilizada).

Figura 24 - Difração de raios-X do besifloxacino (BSF), da mistura dos componentes da formulação, do Povacoat® (POVA) e dos nanocristais (NC) (nanossuspensão 0,6% m/m liofilizada).

Figura 25 - Microfotografia do besifloxacino matéria-prima (A, B) e dos nanocristais de besifloxacino (C, D).

Figura 26 - Solubilidade de saturação do besifloxacino (matéria-prima) e da nanosuspensão (besifloxacino 0,6% m/m). A) Solubilidade após 24 horas de incubação. B) Solubilidade após 48h de incubação.

Figura 27 - pH das amostras ao final da incubação (período 48h, 150 RPM à 37 ± 1 °C) para a determinação da solubilidade de saturação. N = 3.

Figura 28 - Toxicidade dos nanocristais de besifloxacino (500 mg/kg) e Povacoat® (750 mg/kg) em modelo larvário de *Galleria mellonella*.

Figura 29 - Distribuição das partículas (monomodal), estabilidade acelerado: 90 dias. Condição do estudo: $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos estabilizantes testados para desenvolvimento de nanocristais de besifloxacino.

Tabela 2 - Preparo das soluções para o teste de recuperação e determinação da exatidão. Balão volumétrico de 10mL, cada nível de concentração em triplicata.

Tabela 3 - Composição geral das formulações para obtenção dos nanocristais de besifloxacino.

Tabela 4 - Tamanho das partículas referentes ao cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e ao produto comercial Besivance® (suspensão oftálmica 0,6% m/m). Média de 3 leituras.

Tabela 5 - Absorbâncias para CIM das suspensões de cloridrato de besifloxacino (matéria prima) e Besivance® frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Para o padrão (microrganismo 10⁶ UFC/mL) foi obtido absorbância de 1,093. Para o branco (meio de cultura TSB sem inóculo bacteriano) foi obtido absorbância de 0,004.

Tabela 6 - Absorbâncias para CIM das suspensões de cloridrato de besifloxacino (matéria prima) e Besivance® frente a *Staphylococcus aureus*. Para o padrão (microrganismo 10⁶ UFC/mL) foi obtido absorbância de 1,093. Para o branco (meio de cultura TSB sem inóculo bacteriano) foi obtido absorbância de 0,004.

Tabela 7 - Áreas do padrão e amostras obtidas nos cromatogramas do teste de filtro Millex®-HV-PVDF 13mm de diâmetro, poros de 0,45µm.

Tabela 8 - Valores das áreas referentes aos picos de cloridrato de besifloxacino SRQ para a construção da curva analítica (CLAE).

Tabela 9 - Determinação da exatidão do método por CLAE para análise do cloridrato de besifloxacino em suspensão oftálmica.

Tabela 10 - Comparação entre a validação do método referência e a validação parcial para o desenvolvimento do método para quantificação de cloridrato de besifloxacino em suspensão oftálmica (0,6% m/m).

Tabela 11 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm e índice de polidispersão (IP) para estudo exploratório I do desenvolvimento de nanocristais de besifloxacina 0,6% (m/m). Condições: 1200 RPM e 30% (m/m) esferas de zircônio.

Tabela 12 - Estabilidade do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm e índice de polidispersão (IP) para os estabilizantes poloxamer 407, TPGS e polissorbato 80 nos intervalos de tempo: imediatamente após a moagem, após 48h, 7 dias e 15 dias.

Tabela 13 - Determinação do potencial zeta para os estabilizantes poloxamer 407, TPGS e polissorbato 80 nos intervalos de tempo: imediatamente após a moagem, após 48h, 72h e 7 dias e 15 dias.

Tabela 14 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm e índice de polidispersão (IP) para estudo exploratório II do desenvolvimento de nanocristais de besifloxacina 0,6% (m/m). Condições: 1200 RPM e 30% (m/m) esferas de zircônio.

Tabela 15 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm e índice de polidispersão (IP) para estudo exploratório III do desenvolvimento de nanocristais de besifloxacina 0,6% (m/m). Condições: 1200 RPM e 30% (m/m) esferas de zircônio.

Tabela 16 - Estabilidade do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm e índice de polidispersão (IP) para o estudo exploratório III, nos intervalos de tempo: imediatamente após a moagem (T0), 7 dias, 15 dias e 30 dias. Tempo de processo 4 dias.

Tabela 17 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm e índice de polidispersão (IP) para estudo exploratório III do desenvolvimento de nanocristais de besifloxacina 0,6% (m/m). Condições: 1200 RPM, 30% (m/m) esferas de zircônio e duas barras magnéticas.

Tabela 18 - Variáveis independentes e níveis selecionados para o experimento de Box-Behnken.

Tabela 19 - Tabela 19 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm obtidos para as preparações de nanocristal de besifloxacina. Matriz de planejamento de experimentos Box-Behnken. Condições: 30% (m/m) esferas de zircônio e duas barras magnéticas.

Tabela 20 - Análise de variância para testar a significância dos termos obtidos para a variação de DHM de partícula das preparações de nanocristal de besifloxacino. As variáveis são: concentração de besifloxacino (% m/m), concentração de Povacoat® (% m/m) e velocidade (rpm).

Tabela 21 - Significância dos coeficientes de regressão codificados e índice de ajuste do modelo selecionado na avaliação DHM nanocristais de besifloxacino.

Tabela 22 - Variáveis obtidas no desenho experimental de Box-Behnken para as preparações de nanocristal otimizadas e respectivos valores de diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) teórico e experimental.

Tabela 23 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm, índice de polidispersão (IP) e Potencial Zeta (PZ) obtidos para as preparações de nanocristal otimizadas (nanossuspensão 0,6% m/m), sem adição de conservante e com adição de 0,01% de cloreto de benzalcônio (conservante).

Tabela 24 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm e índice de polidispersão (IP) por espalhamento de luz dinâmica (DLS) e distribuição das partículas por difração a laser (DL) da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m.

Tabela 25 - Resultados de osmolalidade da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m (fórmula otimizada). Para as medidas foram consideradas amostra sem adição de glicerol e a amostra com adição de glicerol (1,0% m/m).

Tabela 26 - Avaliação da adequabilidade do sistema cromatográfico (system suitability) obtidos a partir do padrão calibração (50µg/mL) para quantificação do besifloxacino na nanossuspensão (0,6% m/m). Software Chromeleon™ versão 6.80.

Tabela 27 - Resultados da quantificação de besifloxacino na nanossuspensão otimizada (0,6% m/m), concentração teórica: 50µg/mL.

Tabela 28 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm, índice de polidispersão (IP) e Potencial Zeta (PZ), para verificar a eficiência do processo de liofilização. Fórmula otimizada (nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m).

Tabela 29 - Concentrações obtidas para avaliação da solubilidade de saturação do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e da nanossuspensão (besifloxacino 0,6%

m/m). Condição do estudo: 37 ± 1 °C a 150 RPM. Concentração teórica analisada 50 µg/mL. N = 3.

Tabela 30 - pH inicial e final (após 48h) das amostras durante a avaliação da solubilidade de saturação do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e da nanossuspensão (besifloxacino 0,6% m/m). Condição: 37 ± 1 °C a 150 RPM. N = 3.

Tabela 31 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IP), Potencial Zeta (PZ), teor e pH, para estudo de estabilidade acelerado da formulação otimizada (nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m), nos intervalos de tempo: T0, 30, 60 e 90 dias. Condição do estudo: $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / 75% UR $\pm$ 5% UR.

Tabela 32 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm, índice de polidispersão (IP), Potencial Zeta (PZ), teor e pH, para estudo de estabilidade da formulação otimizada (nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m), nos intervalos de tempo: T0, 30, 60, 90 e 150 dias. Condição do estudo: $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / 60% UR $\pm$ 5% UR.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Conjuntivite	19
1.2. Terapias convencionais para tratamento de conjuntivites bacteriana	21
1.3. Besifloxacino: histórico, aspectos clínicos e farmacêuticos	21
1.4. Limitações na terapêutica: aspectos fisiológicos do órgão da visão	24
1.5. Nanocristais de fármacos: alternativa inteligente no desenvolvimento de colírios	25
2. MATERIAL E MÉTODO	31
2.1 Material	31
2.2 Método	32
2.2.1 Determinação do tamanho de partícula do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e do Besivance® por difração a laser.....	32
2.2.2 Microscopia óptica do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima).....	33
2.2.3 Concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e do Besivance®	33
2.2.3.1 Microrganismos e meios de cultura	33
2.2.3.2 Preparação da suspensão contendo cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e do Besivance® (produto).....	33
2.2.3.3 Preparação das suspensões microbiana.....	34
2.2.4 Desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação do teor de besifloxacino.....	35
2.2.4.1 Reagentes utilizados	35
2.2.4.2 Sistema CLAE	35
2.2.4.3 Preparação da solução de cloridrato de besifloxacino SQR.....	35
2.2.4.4 Preparação da solução amostra (produto comercial, suspensão oftálmica 0,6%)	36
2.2.4.5 Placebo.....	36
2.2.4.6 Teste de filtro.....	37
2.2.4.7 Seletividade	37
2.2.4.8 Linearidade.....	38
2.2.4.9 Precisão.....	38
2.2.4.10 Exatidão.....	38
2.2.5 Estudo exploratório para o desenvolvimento de nanocristais de besifloxacino empregando moagem via úmida em escala reduzida	39

2.2.6	Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) da partícula e índice de polidispersão (IP) por espalhamento de luz dinâmica (DLS)	40
2.2.7	Distribuição e tamanho das partículas da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m por difração a laser (DL)	40
2.2.8	Potencial zeta (PZ)	40
2.2.9	Densidade	41
2.2.10	Viscosidade	41
2.2.11	pH	42
2.2.12	Osmolalidade	42
2.2.13	Quantificação do teor de besifloxacino na nanossuspensão por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	42
2.2.13.1	Preparo do padrão calibração e padrão verificação (solução de cloridrato de besifloxacino SQR)	42
2.2.13.2	Preparação da solução amostra (nanossuspensão 0,6% m/m)	43
2.2.14	Liofilização	43
2.2.15	Microscópio eletrônico de varredura (MEV)	43
2.2.16	Análise térmica	44
2.2.17	Difração de raios-X (DRX)	44
2.2.18	Solubilidade de saturação	45
2.2.19	Toxicidade em larvas da <i>Galleria mellonella</i>	46
2.3	Concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m	46
2.3.1	Estudos de estabilidade da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m	47
3.	RESULTADO E DISCUSSÃO	48
3.1	Determinação do tamanho de partícula do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e do Besivance® por difração a laser	48
3.2	Microscopia óptica do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima)	49
3.3	Concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e do Besivance®	50
3.4	Desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de besifloxacino	52
3.4.1	Teste de filtro	53
3.4.2	Seletividade	53
3.4.3	Linearidade	56
3.4.4	Precisão	58

3.4.5	Exatidão	59
3.4.6	Comparação entre a validação parcial com a validação do método referência	59
3.5	Estudo exploratório para o desenvolvimento de nanocristais de besifloxacino empregando moagem via úmida em escala reduzida	60
3.5.1	Estudo exploratório I: Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) da partícula, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ).....	62
3.5.2	Estudo exploratório II: Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) da partícula e índice de polidispersão (IP).....	65
3.5.3	Estudo exploratório III: Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) da partícula e índice de polidispersão (IP).....	66
3.6	Otimização da nanossuspensão de besifloxacino + Povacoat® aplicando desenho de experimento Box-Behnken	70
3.6.1	Verificação do modelo estatístico de otimização da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m	75
3.7	Distribuição e tamanho das partículas da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m por espalhamento de luz dinâmica (DLS) e por difração a laser (DL) .	77
3.8	Osmolalidade	78
3.9	pH	80
3.10	Viscosidade e densidade	80
3.11	Quantificação do teor de besifloxacino na nanossuspensão 0,6% m/m por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	81
3.12	Liofilização da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m.....	82
3.13	Análise térmica.....	84
3.14	Difração de raios-X (DRX).....	86
3.15	Microscópio eletrônico de varredura (MEV)	87
3.16	Solubilidade de saturação	88
1.1	Toxicidade da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m em larvas da <i>Galleria mellonella</i>	91
1.2	Concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m	92
1.3	Estudos de estabilidade da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m .	92
2.	CONCLUSÃO.....	96
3.	PERSPECTIVAS.....	97
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. Conjuntivite

Conjuntivite refere-se à processo inflamatório da conjuntiva. A conjuntiva é uma camada fina e transparente de tecido que reveste a superfície interna da pálpebra e a parte branca do olho (AOA, 2022). Os pacientes acometidos por conjuntivite podem apresentar os seguintes sintomas: olhos vermelhos e lacrimejantes, pálpebras inchadas, sensação de areia ou de ciscos nos olhos, secreção purulenta no caso da conjuntivite bacteriana ou secreção esbranquiçada no caso de conjuntivite viral, coceira, dor ao olhar para a luz (fotofobia), visão borrada e pálpebras grudadas ao acordar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

A conjuntivite acomete todas as faixas etárias e pode ser infecciosa e não infecciosa. A conjuntivite não infecciosa está relacionada a reações alérgicas na superfície ocular e são provocadas por poluição do ar proveniente de agentes químicos, pólen, poeira, pelos de animal, produtos cosméticos ou que entram em contato com os olhos, como lentes de contato, entre outros (AOA, 2022; HONG et al., 2016; PATELLA et al., 2018). No caso da conjuntivite infecciosa, essa é causada por vírus, fungos, parasitas e, principalmente, por bactérias.

Os vírus representam 20% dos casos de conjuntivite em âmbito global, enquanto os fungos e os parasitas representam índice significativamente menor nas infecções oculares. As conjuntivites causadas por bactérias são diagnosticadas em 60% dos casos relatados. A conjuntivite bacteriana é responsável por mais de um terço das complicações oculares, causando prejuízos sociais aos pacientes e aumento nos custos dos serviços de saúde (KARPECKI et al., 2010; KHIMDAS et al., 2011; MEJÍA-LÓPEZ et al., 2011; SAHER et al., 2016; TÓTOLI et al., 2018).

Alfonso e colaboradores (2015), em revisão bibliográfica, exemplificaram o impacto financeiro nos serviços de saúde dos Estados Unidos. Os custos com o tratamento da conjuntivite variaram de 377 a 875 milhões de dólares anualmente (ALFONSO et al., 2015). No Brasil, segundo publicação da Sociedade Brasileira de Oftalmologia (SOB, 2020), o Centro Nacional de Epidemiologia (Cenepi) da Fundação

Nacional de Saúde, notificou de fevereiro a abril de 2018, número maior que 184 mil casos de conjuntivite, somente nos estados Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul (SOB, 2020).

Em geral, a conjuntivite é uma doença autolimitada que provoca acentuado desconforto e prejuízos aos pacientes, como tempo de ausência no trabalho ou na escola e recorrência da infecção, com complicações (KHIMDAS et al., 2011; SAHER et al., 2016). A conjuntivite bacteriana é causada por diferentes bactérias aeróbias e anaeróbicas como: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Moraxella species*. Ainda, inclui outras espécies comuns como a *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitides*, *Pseudomonas species*, *Proteus species* e *Corynebacterium species* (AZARI; BARNEY, 2013).

A *Staphylococcus aureus* é a bactéria com maior predominância em adultos e a *Haemophilus influenzae*, em crianças. Nesse caso, as complicações podem ocorrer devido à baixa imunidade, especialmente em bebês. No caso de conjuntivite neonatal causada principalmente por infecção durante o parto normal, por *Neisseria gonorrhoeae*, pode ocorrer a perda permanente da acuidade visual (KHIMDAS et al., 2011; SAHER et al., 2016).

A conjuntivite bacteriana é altamente contagiosa e pode progredir rapidamente. Essas infecções bacterianas se não forem tratadas adequadamente podem resultar em consequências potencialmente graves, incluindo complicações irreversíveis na visão, como perda permanente (ASBELL et al., 2018).

Ainda, Comstock e colaboradores (2013) revelaram que em alguns casos, como após cirurgia de glaucoma, o contágio de conjuntivite bacteriana, aumenta o risco do paciente em desenvolver endoftalmite (COMSTOCK et al., 2013). Essa doença consiste de inflamação intraocular aguda que se desenvolve em resposta à infecção geralmente por bactérias ou fungos, principalmente após cirurgias oculares. É uma complicação devastadora, podendo causar perda permanente da visão, (KIRSTAHLER et al., 2018; LIPSKY; BARRETT, 2018).

1.2. Terapias convencionais para tratamento de conjuntivites bacteriana

Em geral, os pacientes não recorrem aos cuidados médicos no início dos sintomas e esses podem desaparecer espontaneamente logo nos primeiros dias (MAH; SANFILIPPO, 2016). No entanto, quando o quadro clínico não apresenta melhora, é indicada a terapia medicamentosa. No caso de complicações mais acentuadas, como o desenvolvimento de mucopurulência, o tratamento com antibióticos deve ser imediato (KHIMDAS; VISSCHER; HUTNIK, 2011).

Quando a indicação clínica é o tratamento com antibióticos para a conjuntivite bacteriana, é padronizado a utilização de colírio oftálmico tópico de amplo espectro, incluindo várias classes de antibióticos, como aminoglicosídeos, combinações de polimixina B, macrolídeos, sulfonamidas e as fluoroquinolonas (KHIMDAS; VISSCHER; HUTNIK, 2011; SAHER; GHORAB; MURSI, 2016).

A indicação da classe das fluoroquinolonas como oftálmico tópico foi somente a partir de 1990 e trouxe grandes vantagens terapêuticas, por apresentar amplo espectro e baixa toxicidade. Nessa classe está incluída a ciprofloxacina, ofloxacina e norfloxacina como segunda geração, a levofloxacina de terceira geração, a gatifloxacina, moxifloxacina e mais recente o besifloxacino, ambas de quarta geração (KHIMDAS; VISSCHER; HUTNIK, 2011; SAHER; GHORAB; MURSI, 2016). Entretanto, muitas dessas classes terapêuticas não são mais eficazes ou apresentam resistência bacteriana (SEIPLE, et al, 2016).

1.3. Besifloxacino: histórico, aspectos clínicos e farmacêuticos

A resistência aos antibióticos é um dos principais problemas para o tratamento de patógenos oculares (JENKINS; SCHUETZ, 2012; ASBELL; SANFILIPPO, 2017). O aumento da resistência bacteriana deve-se principalmente ao uso simultâneo dos antimicrobianos para o tratamento de várias infecções sistêmicas e para a profilaxia em procedimentos cirúrgicos (KHIMDAS; VISSCHER; HUTNIK, 2011; VENTOLA, 2015).

Nesse contexto, o besifloxacino, recente membro da quarta geração de fluoroquinolonas, apresenta significativas vantagens. Esse antimicrobiano foi desenvolvido exclusivamente para uso oftálmico tópico. Diferente das demais

fluoroquinolonas, o besifloxacino não é utilizado para o tratamento de outras infecções, sendo esse fármaco o único na sua classe a apresentar menor risco de desenvolver resistência (KHIMDAS; VISSCHER; HUTNIK, 2011; TÓTOLI; SALGADO, 2018).

A síntese do besifloxacino foi iniciada por uma empresa japonesa e em 2000 foi licenciada para uso oftálmico nos Estados Unidos e Europa (LIU et al., 2011). Em 2009 o besifloxacino foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de conjuntivite bacteriana nos Estados Unidos e, somente em 2011, foi aprovado no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (COSTA et al., 2014; HUGHES, 2010).

O besifloxacino é comercializado na forma de cloridrato de besifloxacino pela Bausch & Lomb Incorporated com o nome comercial Besivance[®], suspensão oftálmica a 0,6%. A suspensão oftálmica 8-cloro-fluoroquinolona contém 6,63 mg de cloridrato de besifloxacina equivalente a 6 mg de besifloxacino base (componente ativo) e cloreto de benzalcônio a 0,01%, como conservante. Os outros componentes da fórmula são: manitol, policarbofila, poloxamer 407, cloreto de sódio, edetato dissódico dihidratado, hidróxido de sódio e água purificada. É uma suspensão isotônica com osmolalidade de aproximadamente 290 mOsm/kg (BAUSCH & LOMB INCORPORATED, 2020; TÓTOLI; SALGADO, 2018).

A forma farmacêutica do besifloxacino foi desenvolvida a partir da tecnologia de administração de medicamentos denominada DuraSite[™] (InSite Vision, Inc., Alameda, EUA). Essa tecnologia é composta por cloreto de benzalcônio 0,01%, policarbófilo, manitol, poloxamer 407, cloreto de sódio e edetato dissódico dihidratado, oferece alta viscosidade ao produto e permite aumentar o tempo do fármaco na superfície do olho (BAUSCH & LOMB INCORPORATED, 2020; COSTA et al., 2014; TÓTOLI; SALGADO, 2018). A posologia para a suspensão oftálmica de besifloxacino (0,6%) tanto para adultos, quanto para crianças, se dá por meio da aplicação de uma gota do medicamento 3 vezes ao dia durante 7 dias (MAHVAN et al., 2014).

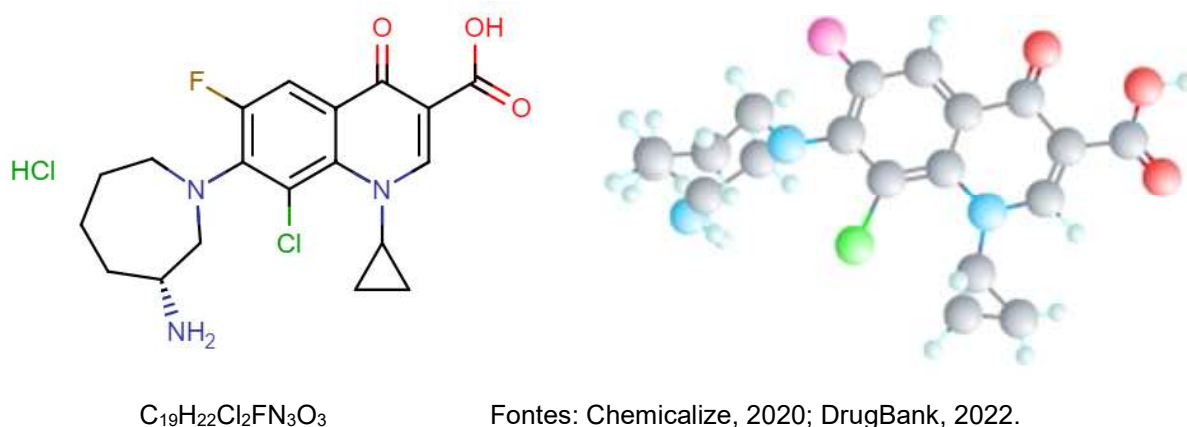
O besifloxacino possui ação bactericida, assim como outras fluoroquinolonas, ela se liga as enzimas bacterianas DNA-girase e topoisomerase IV. A inibição dessas enzimas, essenciais para a replicação do DNA em bactérias, interfere com a transcrição, replicação e separação de células cromossômicas do DNA, durante a

divisão celular (SCHECHTER; PAREKH; TRATTLER, 2015; MAH; SANFILIPPO, 2016).

O cloridrato de besifloxacinó é um pó branco a branco-amarelado-pálido, conhecido quimicamente como {7-[(3R)-3-amino-6,6,6-trimetil-1-azepina-1-il]-8-cloro-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-ácido quinolinocarboxílico}. Tem a fórmula molecular $C_{19}H_{22}ClFN_3O_3$, massa molecular de 430,30 g/mol, pKa: 5,45 (ácido forte) e 9,84 (base forte), LogP 0,7, toxicidade de LD50, rat: >2000 mg/kg e baixa solubilidade em água, com mínima solubilidade de 0,143 mg/mL (DrugBank, 2022; Chemicalize, 2020; TÓTOLI; SALGADO, 2018).

As ilustrações em 2D e 3D da molécula de cloridrato de besifloxacinó estão apresentadas na Figura 1. O amplo espectro de atividade dessa fluoroquinolona se dá pelo grupo ciclopropil 1-N o qual atua contra bactérias aeróbicas. O átomo de flúor na posição 6 age como farmacóforo fundamental para aumentar a afinidade a topoisomerase IV. A substituição de cloreto na posição C-8 aprimora a eficácia contra bactérias Gram-positivas, tornando esse fármaco potente contra bactérias anaeróbicas. Essa substância tem um centro quiral na posição C-3, sendo o enantiômero-R puro (TGA, 2014; SINGH, et al., 2014).

Figura 1 - Ilustração em 2D e 3D da molécula besifloxacinó, respectivamente.



1.4. Limitações na terapêutica: aspectos fisiológicos do órgão da visão

As preparações oftálmicas convencionais (gotas) são rapidamente removidas da superfície ocular como consequência dos mecanismos de proteção do olho, por exemplo, reflexo de piscar, ato de lacrimejar e renovação de fluido lacrimal. Portanto, o tempo de retenção dos fármacos no olho é muito limitado com consequente baixa biodisponibilidade, normalmente, menor que 5%. Após a instilação, o excesso de volume do líquido aplicado é drenado pelo canal nasolacrimal (ACHOURI et al., 2013; GAO et al., 2012).

A conjuntiva e a córnea são protegidas pela película lacrimal, uma estrutura multicamada, constituída por solução tamponada (pH 7,4) contendo eletrólitos, 1543 proteínas relatadas até o momento e mais de 600 espécies lipídicas de 17 classes lipídicas principais (LAM et al., 2014; SHARMA et al., 2016). A terceira camada dessa película, mais próxima da córnea, é uma camada de gel de mucina aquosa, contendo água, sais, proteínas e carboidratos, além de mucinas, que são glicoproteínas de alto peso molecular, altamente glicosiladas (50-80%) (LWDWIG, 2005).

A mucina é uma molécula carregada negativamente devido ao ácido siálico associado e resíduos de superfície. Adicionalmente, a mucina modifica a superfície da córnea hidrofóbica a uma superfície hidrofílica aderindo ao glicocálce nos microvilos da córnea permitindo a hidratação dos tecidos. A mucina pode desempenhar papel importante na biodisponibilidade ocular dependendo da extensão do seu comportamento como barreira ou local de retenção (SHIMAZAKI et al., 2017).

Liu et al. (2016) relataram que o baixo tempo de retenção e a baixa capacidade de penetração nos tecidos intraoculares dos fármacos são os principais obstáculos para a sua adequada biodisponibilidade, especialmente para fármacos com baixa solubilidade em água e permeabilidade. Assim, os sistemas de administração ocular de fármacos baseados em nanocristal têm o potencial para melhorar essa biodisponibilidade (doses mais baixas e instilação menos frequente), permitindo superar os desafios das preparações oftálmicas convencionais.

1.5. Nanocristais de fármacos: alternativa inteligente no desenvolvimento de colírios

A tecnologia de obtenção de nanocristais abriu caminhos, jamais alcançados, para facilitar a administração de fármacos. Essa abordagem permite, de forma eficiente, aumentar a área superficial do fármaco aumentando a interação com os meios biológicos, além de aumentar a solubilidade de saturação. Essa característica promove o aumento na velocidade de dissolução e na distribuição dos fármacos no organismo, com consequente aumento da biodisponibilidade. Além disso, apresenta maior bioadesividade às membranas biológicas, quando comparado ao fármaco na escala micrométrica. Tais vantagens melhoram potencialmente a segurança e eficácia dos medicamentos, permitindo a redução da dose (BARBOSA et al., 2016; CHEN et al., 2017; DAVIS et al., 2018; TYNER et al., 2017).

Diante desses benefícios, levantamento da Research and Markets mostrou que o mercado global de nanotecnologia para *drug delivery* apresentou faturamento de US\$ 47,5 bilhões em 2020. Somente os nanocristais deve alcançar US\$ 83,1 bilhões até 2027, com crescimento de 21,9% para os próximos 7 anos. Do ponto de vista regulatório, considera-se produto com base nanotecnológica se o material ou o produto final é projetado para ter pelo menos uma dimensão externa ou uma estrutura interna ou de superfície, na faixa de nanoescala (aproximadamente 1 a 100 nm), ou se o material ou o produto final é projetado para exibir propriedades ou fenômenos incluindo propriedades físicas, químicas ou efeitos biológicos que são atribuíveis às suas dimensões, mesmo se essas apresentarem tamanho inferior a 1µm (1000 nm) (FDA, 2014).

Conforme esclarecido por Noyes e Whitney (1897), a área superficial das partículas é aumentada em consequência da redução do tamanho delas, permitindo o aumento da velocidade de dissolução. Ainda, a velocidade de dissolução (dC/dt) é diretamente proporcional à diferença entre a concentração instantânea (C) no tempo (t) e a solubilidade de saturação (C_s), conforme equação abaixo:

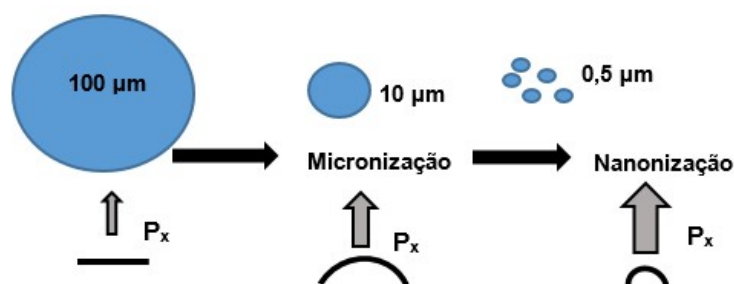
Equação 1:

$$\frac{dC}{dt} = k (C - C_s), \text{ sendo } k \text{ uma constante}$$

Assim, pode-se concluir que a taxa na qual uma substância sólida se dissolve em sua própria solução é proporcional à diferença entre a concentração dessa solução e a concentração da solução saturada (Noyes; Whitney, 1897).

A solubilidade de saturação (C_s) depende de cada componente da formulação ou fármaco, da temperatura e do meio de dissolução. Além disso, partículas com tamanho entre 1–2 μm tem sua solubilidade de saturação alterada em função do tamanho. De acordo com a equação de Ostwald-Freundlich, a pressão de vapor das gotículas de líquido aumenta devido à crescente curvatura da interface da gotícula com o decréscimo do raio da gota. Quando partículas micrométricas são alteradas para escala nanométrica, há diminuição do raio, resultando em aumento da curvatura da superfície dessas, proporcionando aumento da pressão de dissolução (WILLIAMS, et al., 2013).

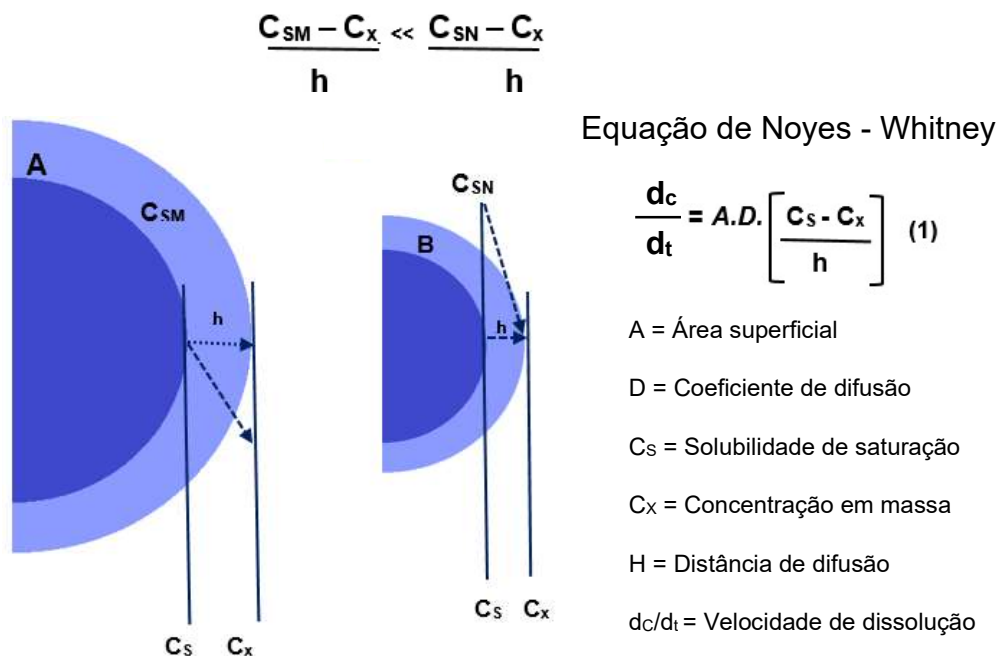
Figura 2 – Aumento da solubilidade de saturação (C_s) e aumento da pressão de dissolução de uma superfície plana, uma micropartícula e uma nanopartícula. Sendo P_x : pressão de dissolução.



Fonte: MORALES, 2016.

A redução do tamanho de partícula leva ao aumento da área superficial e permite diminuir a camada de difusão, aumentando a velocidade de dissolução (dc/dt). Adicionalmente, a distância de difusão (h) ao redor das partículas diminui com a redução do tamanho, promovendo elevado gradiente de concentração ao redor das partículas menores $(C_s - C_x)/h$ (Figura 3). Esses fenômenos justificam o aumento da velocidade de dissolução dos nanocristais. Além disso, é possível observar que a velocidade de dissolução (dc/dt) é proporcional ao gradiente de concentração $(C_s - C_x)/h$, sendo que C_s é a solubilidade de saturação, C_x a concentração do fármaco nos líquidos intersticiais e h a distância de difusão (MORALES, 2016).

Figura 3 – Diminuição da camada de difusão (h), aumento do gradiente de concentração $C_s - C_x/h$.



Fonte: MORALES, 2016.

De maneira geral, existem duas abordagens para a produção de nanocristais de fármacos, a abordagem *top-down* (de cima para baixo) e abordagem *bottom-up* (de baixo para cima). A abordagem *top-down*, os cristais, comumente em escala micrométrica, são reduzidos a escala nanométrica por moagem a alta energia e/ou por homogeneização a alta pressão (CHEN et al., 2017; OLIVEIRA, 2014; SATTAR et al., 2017).

A abordagem *bottom-up*, ao contrário da *top-down*, se inicia com moléculas em solução as quais são agregadas por processos de precipitação (SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013). A abordagem *bottom-up* exige um controle rigoroso do processo de fabricação a fim de evitar a recristalização na faixa de micrômetros, comumente surgida na técnica de fusão a quente. Ainda, alguns dos métodos *bottom-up* envolvem a utilização de solventes orgânicos possibilitando a introdução ou aumento de impurezas provenientes de resíduos de solvente no fármaco e/ou produto (CHEN et al., 2017). As tecnologias *top-down* evoluíram desde a década de 1990, e

atualmente é mais frequentemente utilizada na indústria farmacêutica, quando comparada às tecnologias *bottom-up* (CHEN et al., 2017).

Em geral, os nanocristais são preparados em meios de dispersão com a adição de estabilizantes (por exemplo, tensoativos e/ou polímeros), resultando em um estado coloidal sendo denominados como "nanossuspensões". Acredita-se que a maioria dos estabilizantes exerce as suas funções por adsorção na superfície de nanocristais, permitindo reduzir o risco de aglomeração de nanopartículas (BARBOSA et al., 2016; CHEN et al, 2017).

A farmacocinética e a biodistribuição de nanocristais são determinadas, principalmente, por suas propriedades físico-químicas, tais como tamanho, forma, potencial zeta e características químicas de superfície (PELTONEN; STRACHAN, 2015; TYNER et al., 2017). A formulação de nanocristais consiste de abordagem robusta que requer o uso de estabilizadores apropriados. A secagem da fórmula empregando liofilização ou por atomização pode garantir a estabilidade a longo prazo e a viabilidade comercial aos nanocristais (PAWAR et al., 2014).

Pawar e colaboradores (2014) relataram que os nanocristais podem direcionar os fármacos em regiões específicas, permitindo a administração por via oral, parenteral, pulmonar, dérmica e ocular, demonstrando sua alta aplicabilidade terapêutica. Romero e colaboradores (2016) relataram que a nanonização do pó de fármaco puro, resultando em nanocristais de fármaco (preferencialmente cerca de 100-500 nm para máxima adesividade), podem romper as dificuldades impostas pelas barreiras naturais do órgão da visão.

Considerando que nanocristais são constituídos de 100% do fármaco, esses apresentam vantagem do ponto de vista regulatório, em contraste com outros sistemas nanoparticulados. Nanocristais não contêm material de matriz, tal como polímero ou matriz lipídica. Isso é especialmente importante para a liberação do fármaco no órgão da visão, considerando a limitação de excipientes autorizados para uso oftálmico. Outra vantagem das nanossuspensões refere-se à viscosidade dessa forma de dosagem, que pode ser facilmente ajustada com base na concentração do fármaco e na composição do veículo (ROMERO et al., 2016; SATTAR et al., 2017).

Nesse sentido, Romero e colaboradores (2016) desenvolveram formulação contendo nanocristais catiônicos de acetato de dexametasona (0,05% m/m) e polimixina B (0,10% m/m). Nesse estudo, os autores descreveram vantagens como: maior solubilidade de saturação do fármaco e aumento do tempo de permanência no olho, resultando em potencial aumento da biodisponibilidade e potencial de aumento da mucoadesão dos nanocristais catiônicos, comparados às formulações padrão de gotas oculares.

As propriedades adesivas das nanosuspensões podem prolongar o tempo de liberação do fármaco. Chen e colaboradores (2017) em revisão da literatura, exemplificaram a aprovação do Ilevro® (nepafenaco, suspensão oftálmica, 0,3%), administrada uma vez por dia, relatado ser tão eficaz quanto a suspensão convencional do mesmo fármaco a 0,1%, administrada três vezes ao dia (CHEN et al., 2017).

Tuomela e colaboradores (2014) desenvolveram formulações de nanocristais de brinzolamida para o tratamento de glaucoma. Os autores observaram a redução da pressão intraocular, sem aumento da toxicidade celular (TUOMELA et al., 2014). Ainda, nanosuspensões de forscolina e nanocristais de dissulfiram melhoraram a biodisponibilidade, por meio do aumento do tempo de residência do fármaco na córnea e reduziram a pressão intraocular em comparação as suspensões convencionais indicadas para o tratamento de glaucoma (GUPTA; SAMANTA; RAICHUR, 2010; NAGAI, et al. 2015).

Ali e colaboradores (2011) desenvolveram formulação contendo nanocristais de hidrocortisona. Eles relataram melhoria na permeabilidade corneana com consequente melhoria da biodisponibilidade em relação a solução do mesmo fármaco indicada para o tratamento de distúrbios inflamatórios do olho. Nagai e colaboradores (2014) desenvolveram nanocristais de tranilast e puderam observar maior viabilidade celular e melhoria na penetração transcorneal da nanossuspensão em comparação com a solução do mesmo fármaco comercializada como Rizaben®, colírio oftálmico, para terapia da inflamação ocular (NAGAI, et al., 2014).

Ainda, Schopf e colaboradores (2014), de maneira similar, desenvolveram formulação contendo nanocristais para o tratamento de inflamação ocular. Os nanocristais de etabonato de loteprednol melhoraram significativamente a

biodisponibilidade do fármaco. Os autores constataram melhora de até oito vezes no nível dos fármacos na córnea e duas vezes mais elevado o nível do fármaco após 2h da administração, em comparação ao medicamento comercializado como Lotemax[®], gel oftálmico a 0,5%.

Baba e colaboradores (2015), também com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade de fármacos para o tratamento de inflamação ocular, desenvolveram nanocristais de fluorometolona. Os pesquisadores relataram melhor efeito anti-inflamatório da nanossuspensão comparado ao colírio comercialmente disponível, em que as concentrações do fármaco na córnea foi de 235ng/mL e 30ng/mL, respectivamente. Ainda, esses mesmos pesquisadores desenvolveram nanocristais de calpeptina com tamanhos médios de 104nm, buscando aumento da permeabilidade do fármaco para tratamento da degeneração da retina. Os nanocristais aumentaram significativamente a inibição da apoptose em comparação com a suspensão convencional do fármaco (BABA; NISHIDA; HASHIDA, 2015).

Ainda relacionado aos nanocristais para aplicação oftálmica, pesquisadores comprovaram o sucesso dessa formulação também para o tratamento da ceratoconjuntivite seca, também conhecida como síndrome do olho seco. Foi possível constatar a redução de irritação nos olhos em comparação com o produto comercializado como Restasis[®], emulsão oftálmica (KIM et al., 2011).

Considerando as vantagens acima mencionadas, o presente estudo tem por objetivo o desenvolvimento de nanossuspensão de besifloxacino para o tratamento da conjuntivite bacteriana.

Continuação

Estabilizante	Nome comercial	Abreviação	Fabricante	Composição	Massa molecular (g/mol)	Fórmula Química	Categoria
Cloreto de benzalcônio	-	BAC	Sigma-Sigma-Aldrich®, USA	Cloreto de alquildimetilbenzilamônio	340,0	$C_{21}H_{38}NCl$	Catiônico
Cloreto de cetilpiridínio	-	CPC	Sigma-Aldrich®, USA	Cloreto de cetilpiridínio monohidratado	358,0	$C_{21}H_{38}ClN \cdot H_2O$	Catiônico
Cloreto de Benzildimetil hexadecilamônio	-	16-BAC	Sigma-Aldrich®, USA	Cloreto de benzilhexadecildimetilamônio	396,1	$CH_3(CH_2)_{15}N(Cl)(CH_3)_2CH_2C_6H_5$	Catiônico
Quitosana	Quitosana	QUITO	Sigma-Aldrich®, USA	Quitina desacetilada (75-85%), Poli (D-glucosamina)	1526,5	$C_{56}H_{103}N_9O_{39}$	Catiônico

Conclusão

2.2 Método

2.2.1 Determinação do tamanho de partícula do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e do Besivance® por difração a laser

Nessa etapa foi utilizado o analisador de tamanho de partícula por difração a laser Beckman Coulter™ LS 13 320 (Beckman Coulter Inc. Califórnia, EUA), equipado com o módulo ULM (Universal Liquid Module) (Beckman Coulter Inc. Califórnia, EUA) programado para o método de via úmida com faixa de medida de 0,375µm a 2000µm, empregando tampão pH 7,0 como dispersante. Foi preparada solução saturada contendo o fármaco (cloridrato de besifloxacino) e solução saturada contendo o produto comercial (Besivance®). Para a preparação das respectivas soluções saturadas, foi adicionado excesso do fármaco ou do produto a um béquer contendo tampão pH 7,0. O sistema foi agitado manualmente e as amostras foram transferidas para o módulo ULM até atingir o obscurecimento adequado para as leituras. Os resultados representam a média de 3 leituras.

2.2.2 Microscopia óptica do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima)

Para verificar a forma cristalina do fármaco foi realizada análise de microscopia óptica utilizando microscópio ECLIPSE E100 (Nikon Corporation, Tóquio, Japão). Foi preparada lâmina contendo o fármaco disperso em óleo vegetal. A microfotografia foi obtida com objetiva: 10x/0,25.

2.2.3 Concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e do Besivance®

A concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) foi determinada para o cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e para o produto comercial Besivance® suspensão oftálmica estéril 0,6% (6mg/mL). O método utilizado foi o de diluição seriada. Após as diluições os tubos foram incubados em estufa a 37°C por 24h. A determinação da inibição e/ou crescimento dos microrganismos foi realizada por espectrofotômetro (BRASIL, 2020; HAAS et al., 2010).

2.2.3.1 Microrganismos e meios de cultura

Microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC® 23235™ e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027™.

Meios de cultura: *Trypticase Soy Agar* (TSA) (Becton Dickinson, Brasil) e *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Becton Dickinson, Brasil).

2.2.3.2 Preparação da suspensão contendo cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e do Besivance® (produto)

Foi preparada 10,0g de suspensão de cloridrato de besifloxacino na concentração de 6,0mg/mL. Para isso, foi adicionado 100,0mg de poloxamer 407 em 9,85g tampão pH 7,0, sob agitação constante, até obtenção de uma solução homogênea. Paralelamente, pesou-se 60,63mg de cloridrato de besifloxacino e foi adicionado à solução inicial, mantendo a agitação até a formação da suspensão visualmente homogênea. Dessa suspensão foi transferida alíquota de 1mL para balão de 10mL, obtendo a concentração de 600µg/mL de cloridrato de besifloxacino.

Para avaliação do produto Besivance® foi transferido 1mL da suspensão oftálmica estéril 0,6% (6mg/mL) para balão de 10mL, obtendo a concentração de 600µg/mL de cloridrato de besifloxacino.

2.2.3.3 Preparação das suspensões microbiana

As suspensões foram preparadas utilizando cepas padrão das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027™ (Gram-negativo) e *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538™ (Gram-positivo). Os meios de cultura empregados foram Trypticase Soy Agar (TSA) e *Tryptic Soy Broth* (TSB), preparados e esterilizados de acordo com as instruções do fabricante.

As suspensões de cada microrganismo foram preparadas pela adição de 4mL de solução fisiológica estéril em tubos contendo crescimento microbiano em meio de cultura TSA, durante 24 horas a 37°C (suspensões mãe). Alíquotas de 1mL dessas suspensões foram transferidas para tubos contendo 9mL de soro fisiológico, essas foram homogeneizadas e realizadas diluições seriadas até obter a concentração de 10⁶ UFC/mL.

Alíquota de 1mL das amostras (produto e matéria-prima) com concentração de 600µg/mL de cloridrato de besifloxacino foi transferida para tubo de 10mL. Desse tubo alíquota de 5mL foi transferida para tubo contendo 5mL de TSB, a partir dessa diluição foram efetuadas diluições seriadas para obter as concentrações de 60, 30, 15, 7,5, 3,75, 2, 1, 0,5, 0,250 e 0,125 µg/mL, para avaliação da CIM frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Para avaliação da CIM frente *Staphylococcus aureus* foram realizadas diluições seriadas para obter as concentrações de 0,6, 0,3, 0,15, 0,075, 0,04, 0,02, 0,01, 0,005, 0,0025 e 0,00125 µg/mL. Para cada tubo foi adicionado carga microbiana de 10⁶ UFC/mL.

Os tubos foram incubados por 24h a 37°C. Após esse período foram realizadas as leituras empregando espectrofotômetro com comprimento de onda de 660nm. Para a leitura do branco foi utilizado meio de cultura sem adição de microrganismo (branco/controle negativo). Adicionalmente, foi realizada leitura da suspensão de microrganismo na concentração de 10⁶ UFC/mL sem adição do fármaco (padrão/controle positivo).

2.2.4 Desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação do teor de besifloxacino

2.2.4.1 Reagentes utilizados

A substância química de referência (SQR) utilizada nesse trabalho foi o cloridrato de besifloxacino, adquirido da Jinan Shengqi Pharmaceutical Co., Ltd., China com teor especificado de 99,93%. Todos os reagentes de grau analítico e solventes grau CLAE: trietilamina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), ácido fosfórico 85% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), acetonitrila (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e água ultrapura Milli-Q® Integral 10 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). O produto Besivance® (suspensão oftálmica 0,6%) (Bausch & Lomb Incorporated) foi obtido no mercado local.

O método referência foi aquele desenvolvido por COSTA, et al. 2019 empregando o produto comercial Besivance® (suspensão oftálmica 0,6%).

2.2.4.2 Sistema CLAE

Foi utilizado o cromatógrafo líquido UHPLC⁺ Dionex™ UltiMate™ 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) composto por: bomba quaternária DGP-3600, amostrador automático ACC-3000 (com termostato de amostra), compartimento de coluna ACC-3000, detector DAD-3000(RS) equipado com software Chromeleon™ versão 6.80.

Foi utilizada a coluna C18 Eclipse Plus 150 mm x 4,6 mm x 3,5µm (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA). A fase móvel foi constituída da mistura de solução de trietilamina a 0,5% (v/v) (pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico diluído (10% v/v) e acetonitrila (74:26 v/v) a uma taxa de fluxo de 1,0mL/min. O volume de injeção das soluções foi de 20µL, com temperatura de coluna de 25°C, detecção UV em 295nm, utilizando matriz de diodo (DAD).

2.2.4.3 Preparação da solução de cloridrato de besifloxacino SQR

Foram preparadas soluções estoque com concentração de 500µg/mL. Para isso, alíquota equivalente a 25mg de besifloxacino foi transferido para balão volumétrico de 50mL com adição de aproximadamente 40mL de água ultrapura. Essa

mistura foi sonificada por 25 minutos em banho de gelo, agitando vigorosamente a cada 5 minutos. Decorrido esse tempo, o balão foi retirado e o volume completado até 50mL com o mesmo solvente (concentração 500µg/mL). A partir dessas soluções foram diluídas alíquotas, utilizando a fase móvel como diluente, para a obtenção das concentrações adequadas para determinação das características de desempenho do método.

2.2.4.4 Preparação da solução amostra (produto comercial, suspensão oftálmica 0,6%)

Foram preparadas soluções estoque com concentração de 500µg/mL de cloridrato de besifloxacino. Para isso, foram pesadas, analiticamente, alíquotas de 754mg da suspensão oftálmica 0,6%, equivalente a 5mg de cloridrato de besifloxacino. Para pesagem dessa quantidade, foi considerado o teor declarado de 6,63mg/mL de cloridrato de besifloxacino na suspensão oftálmica e a densidade de 1,0007g/mL (TÓTOLI, 2018). Essa quantidade foi transferida diretamente para balão volumétrico de 10mL, com a adição de aproximadamente 7mL de água ultrapura. A mistura foi submetida a ultrassom por 25 minutos em banho de gelo, agitando vigorosamente a cada 5 minutos. Decorrido o tempo, o balão foi retirado e o volume completado até 10mL com o mesmo solvente (concentração 500µg/mL). A partir dessas soluções foram diluídas alíquotas, utilizando a fase móvel como diluente, para a obtenção das concentrações adequadas para a determinação das características de desempenho do método.

2.2.4.5 Placebo

Os excipientes (placebo) do produto Besivance® foram considerados durante estudo de validação (seletividade) realizado por COSTA e colaboradores (2014). Complementarmente, nessa validação parcial, foi avaliado possíveis interferências do Povacoat®, do glicerol e do cloreto de benzalcônio nas respostas analíticas. Para isso, foi pesado 90mg de Povacoat®, 100mg de glicerol e 1mg de cloreto de benzalcônio e transferido para balão volumétrico de 10mL, foi adicionado aproximadamente 7mL de água ultrapura e levado ao ultrassom até completa solubilização. Depois disso, o balão foi avolumado obtendo-se uma solução de Povacoat® 0,9% m/m, glicerol 1,0%

m/m e cloreto de benzalcônio 0,01% m/m, mesmas concentrações da formulação otimizada e após isotonizar.

2.2.4.6 Teste de filtro

Para essa validação foram utilizados filtros Millex®-HV-PVDF 13mm de diâmetro, tamanho de poro 0,45µm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Para avaliar possíveis interferências desses filtros nas respostas analíticas, foram injetadas soluções padrão e amostra considerando: solução padrão sem filtrar, soluções padrões e amostras com descarte de filtro de 0mL, 1mL, 2mL e 5mL. As respostas analíticas foram avaliadas quanto a possíveis interferências dos filtros

2.2.4.7 Seletividade

Foram preparadas soluções na concentração de 50µg/mL de cloridrato de besifloxacino SQR e amostra do produto Besivance® (suspensão oftálmica 0,6%), a partir das soluções descritas nos itens 2.2.9.3 e 2.2.9.4, respectivamente. Para isso foi pipetado 1mL de cada solução e transferida para balão volumétrico de 10mL, os balões foram avolumados com fase móvel. Adicionalmente, alíquota de 1mL da solução placebo (2.2.9.5) também foi transferida para balão de 10mL, o volume foi completado com o mesmo solvente. Todas as soluções foram transferidas para vials de 2mL utilizando filtros Millex®-HV-PVDF 13mm de diâmetro, tamanho de poro 0,45µm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e analisadas conforme método proposto por Costa et al., 2019.

Foram injetadas no equipamento: soluções padrão, solução amostra, diluente (fase móvel) e placebo. Os respectivos cromatogramas foram comparados, a fim de avaliar possíveis interferências quanto aos excipientes presentes na formulação do produto comercial e quanto ao Povacoat®, presente na fórmula otimizada. Além disso, foi avaliada a pureza do pico resultante da solução amostra.

2.2.4.8 Linearidade

Três soluções estoque de cloridrato de besifloxacino SQR (500µg/mL) foram preparadas: S1, S2 e S3. A partir dessas foram preparadas três curvas de calibrações nas concentrações: 20,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0 e 80,0µg/mL, equivalentes aos níveis: 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160%, respectivamente. Todas as concentrações foram preparadas, filtradas em Millex®-HV-PVDF 13mm de diâmetro, tamanho de poro 0,45µm e injetadas em triplicata. As áreas dos picos dos cromatogramas foram plotadas em relação as respectivas concentrações do fármaco e as curvas foram avaliadas por análise de variância, empregando os softwares Chromeleon™ e Minitab® 17.

2.2.4.9 Precisão

Foi preparada uma solução na concentração de 50µg/mL de cloridrato de besifloxacino SQR e injetada seis vezes para a obtenção da curva de calibração. Em seguida, foram preparadas seis soluções na concentração de 50µg/mL de cloridrato de besifloxacino amostra da suspensão oftálmica. As soluções foram filtradas (Millex®-HV-PVDF 13mm de diâmetro, tamanho de poro 0,45µm) para vials de 2mL e injetadas em triplicata. Os resultados foram determinados por meio da avaliação do desvio padrão relativo (DPR) entre as áreas dos picos obtidos (software Chromeleon™).

2.2.4.10 Exatidão

Quantidades conhecidas de cloridrato de besifloxacino SQR foram adicionadas a amostras na concentração de 40µg/mL, para a obtenção da recuperação e determinação da exatidão (ICH 2005; USP 43, 2021; Brasil, 2017). A recuperação foi realizada em três níveis, R1 (100%), R2 (120%) e R3 (140%), as soluções foram preparadas conforme Tabela 2, em triplicata.

Tabela 2 - Preparo das soluções para o teste de recuperação e determinação da exatidão. Balão volumétrico de 10mL, cada nível de concentração em triplicata.

	Amostra (500 µg/mL) (mL)	SQR (500 µg/mL) (mL)	SQR adicionado (µg/mL)	Concentração teórica final (µg/mL)	Níveis de recuperação (%)
Amostra	0,8	-	0	40	-
R1	0,8	0,2	10	50	100
R2	0,8	0,4	20	60	120
R3	0,8	0,6	30	70	140
Padrão	-	0,8	-	40	-

R1: recuperação 1 (100%), R2: recuperação 2 (120%), R3: recuperação 3 (140%); (-): não adicionado

2.2.5 Estudo exploratório para o desenvolvimento de nanocristais de besifloxacino empregando moagem via úmida em escala reduzida

Para essa etapa foram preparadas formulações de besifloxacino e estabilizante na concentração 1:1 e 1:1,6 a 0,6% (m/m) em solução tampão fosfato (hidrogenofosfato dipotássico/hidrogenofosfato dissódico) pH 7,0 Certipur® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) (qsp 10g). Foram realizados três estudos: Estudo exploratório I, estudo exploratório II e estudo exploratório III, e a composição geral para as fórmulas estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição geral das formulações para obtenção dos nanocristais de besifloxacino.

Estudo	Besifloxacino (mg)	Estabilizante (mg)	Tampão (mg)	Proporção
Exploratório I e II	60	60	9880	1:1
Exploratório III	60	60 e 100	9840	1:1 e 1:1,6

Para o preparo das formulações foram transferidos o cloridrato de besifloxacino, o estabilizante, 3 g (30% m/m, em relação ao total da formulação) de esferas de zircônio de diâmetro 0,1mm e 3 barras magnéticas em formato de cruz para recipiente de vidro (vial) com capacidade para 10mL. Em seguida foi adicionado o tampão e o sistema foi submetido a agitação magnética a 1200 rpm por 4 dias. As medidas de diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) da partícula e índice de polidispersão (IP) foram determinadas em intervalo de 24h do processo de moagem.

2.2.6 Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) da partícula e índice de polidispersão (IP) por espalhamento de luz dinâmica (DLS)

O DHM e o IP das partículas dos nanocristais foram determinados por espalhamento de luz dinâmica (DLS). Para as leituras, as amostras foram diluídas na razão de 1:24 (para o total de 1mL) em solução saturada de besifloxacino em tampão fosfato pH 7,0. Para a preparação da solução saturada de besifloxacino, foi adicionado excesso do fármaco a um béquer contendo o tampão. O sistema ficou sob agitação magnética por um período de 24h. O volume de 1mL foi transferido para cubeta e as medições foram realizadas em triplicata, utilizando ângulo de 90° no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido).

2.2.7 Distribuição e tamanho das partículas da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m por difração a laser (DL)

A distribuição e o tamanho das partículas da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m foi realizada por espalhamento a laser de baixo ângulo utilizando o equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido), equipado com módulo Hydro 2000MU (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). O equipamento foi programado para o método de via úmida com faixa de medida de 50 nm a 1 mm, empregando tampão fosfato pH 7,0 para dispersão. Índice de refração do grânulo: 1,67. Os resultados foram apresentados com base na distribuição de volume (D10, D50 e D90), os quais indicam a porcentagem de partículas existentes abaixo do tamanho dado (nm).

2.2.8 Potencial zeta (PZ)

O potencial zeta foi determinado empregando equipamento Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Nesse equipamento, o resultado é obtido a partir das medidas de mobilidade eletroforética (U_E), relação entre a velocidade da partícula e o campo elétrico aplicado, que é convertido em potencial zeta (ζ), conforme equação de Henry (Equação 2) (Bhattachrjee, 2016).

Equação 2:

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

Onde: η é a viscosidade e ε é a constante dielétrica do solvente a 25°C. U_E e ζ são mobilidade eletroforética e potencial zeta, respectivamente. A força do campo aplicada foi de 20 V/cm. Para evitar flutuações inerentes de diferenças do pH e da condutividade na análise do potencial zeta, as amostras foram diluídas em solução tampão pH 7,0 (condutividade = 2238 μ S/cm) na razão de 1:24, para o total de 1mL, o volume foi transferido para célula capilar e as leituras realizadas em triplicata.

2.2.9 Densidade

A densidade da formulação otimizada (nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m) foi determinada utilizando densímetro DMA 4500 M (Anton Paar GmbH, Graz, Austria). Para a medição a amostra foi colocada diretamente no equipamento, em quantidade suficiente para enchimento da mangueira/canaleta. A densidade foi determinada em relação a água, à temperatura de 25° C.

2.2.10 Viscosidade

A viscosidade da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m foi realizada utilizando viscosímetro LVDV-I PRIME (Brookfield, Middleboro, EUA). Esse equipamento mede a viscosidade pela velocidade angular do elemento cônico (*spindle*). Ao ser inserido na amostra, o *spindle* gira em várias velocidades fixas, cortando o material continuamente a taxas de cisalhamento definidas. O *spindle* utilizado para as análises foi o LV-3 (63) e a velocidade foi de 50 rpm. Para o teste, foi transferido 15 mL da nanossuspensão para o recipiente de amostras SC4-13RPY (Brookfield, Middleboro, EUA). A determinação foi em triplicata à 25°C.

2.2.11 pH

O pH foi determinado com potenciômetro Orion™ Versa Star Pro™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Para as análises, as amostras da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m foram medidas diretamente, sem diluição, em triplicata, à 25°C.

2.2.12 Osmolalidade

A osmolalidade da formulação otimizada foi determinada utilizando osmômetro A₂O Advanced Automated Osmometer (Advanced Instruments, Norwood, EUA). Para tanto, 1mL da amostra foi transferido para tubo de vidro e esse foi acondicionado no disco do equipamento que realiza a injeção automaticamente. Nesse equipamento, as medidas são determinadas a partir da depressão do ponto de congelamento da amostra. A depressão do ponto de congelamento é a diferença entre o ponto de congelamento da água pura e o ponto de congelamento da amostra (USP 43, 2021). O volume de injeção da amostra foi de 100µL e a faixa de temperatura para determinar o ponto de congelamento foi de -40°C a +45°C. As medições foram feitas em triplicata.

2.2.13 Quantificação do teor de besifloxacino na nanossuspensão por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

2.2.13.1 Preparo do padrão calibração e padrão verificação (solução de cloridrato de besifloxacino SQR)

Para o padrão calibração, foi preparado solução de 500µg/mL de cloridrato de besifloxacino SQR, conforme descrito no item 2.2.9.3. Depois disso foi transferida alíquota de 1mL para balão volumétrico de 10mL, o volume foi ajustado com fase móvel (concentração 50 µg/mL). A solução foi transferida para vial de 2mL utilizando filtro Millex®-HV-PVDF 13mm de diâmetro, tamanho de poro 0,45µm e foi analisada em quintuplicata (5 injeções) para determinação do desvio padrão relativo (DPR) e adequabilidade do sistema (*system suitability*), conforme determina a Farmacopeia Americana (USP 43, 2021). Para isso foi utilizado o software do equipamento (Chromeleon™).

O preparo do padrão verificação foi realizado da mesma forma e analisado em duplicata (duas injeções) para verificação da recuperação.

2.2.13.2 Preparação da solução amostra (nanossuspensão 0,6% m/m)

Primeiramente foi determinada a densidade da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m, conforme item 2.2.6, o resultado obtido foi de 1,0081g/mL, esse resultado foi considerado para pesagem da alíquota da nanossuspensão. Depois disso, foi preparada solução amostra, com concentração de 50µg/mL de cloridrato de besifloxacino. Para isso, foi pesada, analiticamente, alíquota de 826mg da nanossuspensão 0,6% m/m, equivalente a 5mg de cloridrato de besifloxacino. Essa quantidade foi transferida diretamente para balão volumétrico de 10mL, com a adição de aproximadamente 7mL de água ultrapura. A mistura foi submetida a ultrassom por 25 minutos em banho de gelo, agitando vigorosamente a cada 5 minutos. Decorrido o tempo, o balão foi retirado e o volume completado até 10mL com o mesmo solvente (concentração 500µg/mL). Depois disso, foi transferido 1mL dessa solução para balão de 10mL e o volume foi ajustado utilizando a fase móvel como diluente (concentração 50 µg/mL). A solução amostra foi preparada em duplicata, transferida para vial de 2mL utilizando filtros Millex®-HV-PVDF 13mm de diâmetro, tamanho de poro 0,45µm e analisada em triplicata (três injeções).

2.2.14 Liofilização

Para o processo de liofilização foi utilizado o equipamento Christ Alpha 2-4 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Alemanha). Para isso, alíquotas de 1,5 mL de nanossuspensão foram congeladas a – 45°C com pressão de 0,120mbar, por 48 horas. Após a liofilização, os nanocristais de besifloxacino foram ressuspensos no mesmo volume de tampão pH 7,0 (proporcional ao volume da formulação inicial) e foram determinados o DHM, o IP e o PZ para verificar a eficiência da liofilização. As amostras liofilizadas foram utilizadas para as análises que precisam das amostras secas (pó liofilizado).

2.2.15 Microscópio eletrônico de varredura (MEV)

A matéria-prima (cloridrato de besifloxacino) e os nanocristais (nanossuspensão liofilizada) foram analisados utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV) Quanta™ 650 FEG (FEI Company, Hillsboro, EUA). As amostras foram metalizadas com platina, utilizando metalizador MED-020 high-vacuum coating system (Baltec, Pfäffikon, Suíça). Essa metalização (camada entre 10-15nm de espessura) garante a condução do feixe de elétrons na amostra analisada. Para análise foi aplicado 10 kV de tensão de aceleração de elétrons. O besifloxacino matéria-prima foi analisado com aumento de 5.000 a 30.000 vezes e o nanocristal foi analisado com aumento de 5.000 a 100.000 vezes.

Complementarmente, o besifloxacino (matéria-prima) foi analisado com microscópio óptico Nikon Eclipse E-200 (Nikon Corporation, Tóquio, Japão), equipado com objetiva 10x/0,25. Essa análise teve o objetivo de avaliar a característica cristalina do fármaco.

2.2.16 Análise térmica

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada utilizando equipamento DSC 7020 (Hitachi High-Tech Corporation, Tóquio, Japão). Todas as medições foram realizadas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹). O peso das amostras foi de aproximadamente 2 mg. As curvas de DSC foram obtidas por aquecimento em uma taxa de 10 °C.min⁻¹ na faixa de temperatura de 25 a 300 °C. Como referência, foi utilizado um cadinho de alumínio vazio selado.

As curvas de termogravimetria e termogravimetria derivada (TG / DTG) foram obtidas utilizando analisador STA 7200 (Hitachi High-Tech Corporation, Tóquio, Japão), com peso de amostra de aproximadamente 2 mg na faixa de temperatura de 30 a 600 °C, a uma taxa de 10 °C.min⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL.min⁻¹). A nanossuspensão liofilizada, o besifloxacino (matéria-prima) o Povacoat®, o cloreto de benzalcônio e a mistura de ambos (mesma proporção da formulação) foram caracterizados.

2.2.17 Difração de raios-X (DRX)

As análises de difração de raios-X foram realizadas em difratômetro Rigaku Miniflex 600-C (Rigaku Corporation, Tóquio, Japão). Para tanto, as amostras foram

trituras para obtenção de pó fino, em seguida o pó foi espalhado uniformemente no compartimento de amostra rotativo de vidro (fundo zero), com auxílio de uma lâmina de vidro. O equipamento foi configurado no modo de reflexão com faixa de varredura de $2,3^\circ$ a $50^\circ 2\theta$, foi aplicado velocidade de $10^\circ/\text{min}$ (*step* de $0,02^\circ$). Os difratogramas foram geradas pelo software SmartLab Studio II (Rigaku Corporation, Tóquio, Japão).

2.2.18 Solubilidade de saturação

A solubilidade de saturação (equilíbrio) foi avaliada por meio do método de agitação orbital em frascos (*shake-flask*) (BRASIL, 2011), utilizando estufa de agitação Tecnal TE 4080 (Tecnal, São Paulo, Brasil) à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ com agitação de 150 RPM. Para o estudo foram considerados os meios: água ultrapura (Milli-Q® Integral 10 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), tampão fosfato pH 4,0 (ácido cítrico/hidróxido de sódio/cloreto de hidrogênio) Certipur® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato pH 7,0 (hidrogenofosfato dipotássico/hidrogenofosfato dissódico) Certipur® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

Para o preparo da solução saturada do fármaco, 250 mg do besifloxacino (matéria-prima) foi transferido para erlenmeyer contendo 250 mL dos meios descritos anteriormente (concentração 1 mg/mL). Similarmente, foi transferido 4130 mg da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m (equivalente a 25 mg de besifloxacino, densidade 1,0081 g/mL) para erlenmeyer de 25 mL (concentração 1 mg/mL). Para esses preparos foi considerado a solubilidade declarada do besifloxacino de 0,143 mg/mL (DrugBank, 2022; Chemicalize, 2020; TÓTOLI; SALGADO, 2018).

As amostras foram incubadas e depois de 24 e 48h foi retirado alíquota de 1mL, filtrado Millex®-HV-PVDF 13mm de diâmetro, tamanho de poro $0,45\mu\text{m}$. Desse filtrado foi transferido 500 μL para balão volumétrico de 10 mL, o volume foi completado com o mesmo meio do estudo (água ultrapura, tampão pH 4,0, tampão pH 6,8 e tampão pH 7,0), concentração teórica 50 $\mu\text{g/mL}$. Depois disso as soluções amostras foram transferidas para vial de 2mL utilizando filtros Millex®-HV-PVDF 13mm de diâmetro, tamanho de poro $0,45\mu\text{m}$ e quantificadas em triplicata (três injeções) por CLAE.

2.2.19 Toxicidade em larvas da *Galleria mellonella*

As larvas da *Galleria mellonella* foram criadas no Laboratório de Quimioterapia Antifúngica (Departamento de Microbiologia ICB/USP), sendo incubadas a 30°C e alimentadas com pólen e cera de abelha. Larvas adultas foram selecionadas ao final do estágio de desenvolvimento, com 2 a 2,5 cm de comprimento e 150 a 200 mg de peso corporal (BASTIANI, F. W. M. S, 2018; SPADARI et al., 2019).

Para determinar a toxicidade, foi injetado 10µL da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m, na última pró-perna esquerda das larvas (n=16 larvas por grupo), o equivalente a dose de 500 mg/kg (0,06 mg/larva) de nanocristais de besifloxacino e 750 mg/kg de Povacoat® (0,09 mg/larva). Além disso, solução salina tamponada com fosfato estéril (pH 7,0) foi injetada em um grupo de larvas para controle de lesão mecânica e veículo. As larvas foram mantidas a 37°C e a sobrevivência de todos os grupos foi monitorada diariamente por 5 dias (BASTIANI, F. W. M. S, 2018; SPADARI et al., 2019).

Todos os materiais utilizados no processo de obtenção dos nanocristais e preparo das amostras foram esterilizados.

2.3 Concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m

A concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) foi determinada para o cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e para nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m frente a *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa*. O método utilizado foi o de diluição seriada. A determinação da inibição e/ou crescimento dos microrganismos foi realizada por espectrofotômetro (BRASIL, 2020; HAAS et al., 2010). A amostra da matéria-prima foi preparada conforme item 2.2.3.1 e para a nanossuspensão, foi transferido 1mL da formulação para balão de 10mL, obtendo a concentração de 600µg/mL de cloridrato de besifloxacino. Os microrganismos, meios de cultura e preparação das suspensões microbiana foram realizados conforme itens 2.2.3.1, 2.2.3.2 e 2.2.3.3.

2.3.1 Estudos de estabilidade da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m

Os estudos de estabilidade da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m foram conduzidos em câmara climática Climacell Eco Line (MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg, Alemanha) considerando os principais guias regulatórios (FDA, 2003; ICH Q1, 2009) e RDC 318/2019 da ANVISA (BRASIL, 2019). Para tanto, foram preparados três lotes da formulação, as amostras foram transferidas para frascos de vidro tipo I âmbar, fechados com tampas butílicas, lacrados com selo de alumínio e acondicionados para estabilidade acelerado na condição: $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \text{UR} \pm 5\% \text{UR}$ e estabilidade de acompanhamento na condição: $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 60\% \text{UR} \pm 5\% \text{UR}$.

Mensalmente, foram determinados o DHM, o IP, o PZ, o pH, o teor e avaliação do aspecto. Essa última para verificar possíveis alteração da coloração, separação das fases e/ou sedimentação significativa nas amostras, sendo o resultado “de acordo” ou “em desacordo”. Foi realizada análise de variância (ANOVA) pelo software Excel.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Determinação do tamanho de partícula do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e do Besivance® por difração a laser

Como análise preliminar foi determinada a distribuição do tamanho de partícula inicial para o cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e do produto comercial (Besivance® suspensão oftálmica 0,6% m/m). Os resultados estão apresentados na Figura 4 e na Tabela 4.

Figura 4: Distribuição do tamanho de partícula para o produto comercial Besivance® e do cloridrato de besifloxacino. Os picos representam a média de 3 leituras.

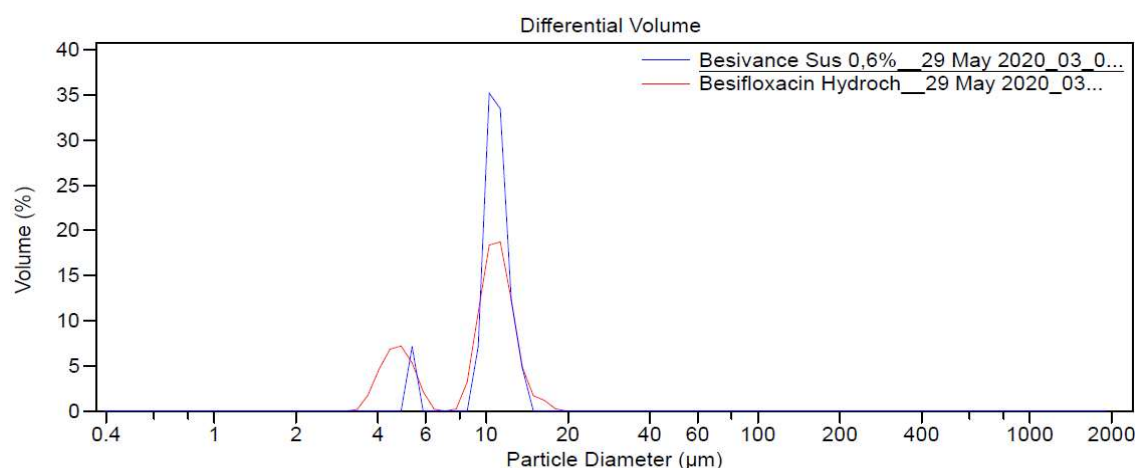


Tabela 4 - Tamanho das partículas referentes ao cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e ao produto comercial Besivance® (suspensão oftálmica 0,6% m/m). N = 3.

Amostra	Média (µm)	Moda (µm)	D ₁₀ (µm)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)
Cloridrato de Besifloxacino	9,334±3,217	11,29	4,450	10,20	12,80
Besivance®	10,620±1,758	10,29	9,296	10,79	12,50

Com relação à distribuição do tamanho de partícula (Figura 4), observa-se a formação de distribuição bimodal para ambas as amostras, produto e matéria-prima. Nota-se que o pico principal apresenta a maior distribuição das partículas com diâmetro próximo a 10µm (Figura 4), conforme apresentado na Tabela 4. Além disso, o D90 evidencia que 90% das partículas possuem diâmetro menor que 13µm.

Quanto aos valores de referência para o tamanho das partículas, a *Therapeutic Goods Administration* (TGA) relata que a substância ativa do produto comercial é micronizada e o tamanho das partículas é controlado para diâmetro médio não superior a $6\mu\text{m}$ e D90 não superior a $9\mu\text{m}$ (TGA, 2014). Os tamanhos médios e D90 (Tabela 3) não atendem a esse critério, entretanto, não foram encontrados valores especificados pela ANVISA e FDA.

É importante considerar que o tamanho da partícula pode influenciar a biodisponibilidade do fármaco. A Farmacopeia Americana (USP 43, 2021) recomenda tamanho de partícula menor que $10\mu\text{m}$. Essa recomendação tem como objetivo o conforto do paciente. Partículas maiores que $10\mu\text{m}$ podem provocar lacrimejamento, com consequente expulsão do produto.

Portanto, esses resultados evidenciam que a matéria-prima cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) se apresenta em escala micrométrica, próxima aos valores de referência (produto comercial). Assim, justifica-se a obtenção dos nanocristais por moagem via úmida em escala reduzida.

3.2 Microscopia óptica do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima)

A microscopia óptica foi realizada para verificar a característica cristalina do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima). Nesse sentido, a microfotografia do fármaco (Figura 5) apresenta cristais prismáticos irregulares, predominantemente. Portanto, a matéria-prima utilizada para o desenvolvimento dos nanocristais está conforme descrito na literatura. De acordo com a *Therapeutic Goods Administration* (TGA) não são conhecidos polimorfos do cloridrato de besifloxacino (TGA, 2014).

Figura 5 - Microfotografia do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima), objetiva: 10x/0,25.



3.3 Concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e do Besivance®

A concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) está relacionada a sensibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos, ou seja, corresponde à menor concentração do fármaco capaz de inibir o desenvolvimento visível do microrganismo (BRASIL, 2020). Essa concentração é avaliada por meio da avaliação do crescimento *in vitro* de um isolado específico (HAAS et al., 2010).

Nesse sentido, foi analisada a atividade antimicrobiana *in vitro* do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima), antibiótico adquirido para o desenvolvimento de nanocristais. Adicionalmente, foi analisada a atividade antimicrobiana *in vitro* do produto comercial Besivance®, empregando microrganismos frequentemente causadoras da conjuntivite bacteriana.

Os resultados das absorbâncias (Tabela 5) e da curva de inibição do crescimento bacteriano (Figura 6) revelaram que a CIM para *Pseudomonas aeruginosa* frente ao cloridrato de besifloxacino e do produto Besivance® foi de 1,58 e 0,99 µg/mL, respectivamente. Os valores reportados na literatura estão entre 0,5 e 8 µg/mL (COMSTOCK et al., 2010; HAAS et al., 2009; HAAS et al., 2010; SILVERSTEIN et al., 2012).

Com relação ao *Staphylococcus aureus*, a curva de inibição do crescimento bacteriano (Figura 6) e os resultados (Tabela 6) revelaram que a CIM foi de 0,0957 e 0,0959 µg/mL frente ao cloridrato de besifloxacino e do produto Besivance®, respectivamente. Os valores reportados na literatura estão entre 0,03 e 8 µg/mL (BAUSCH & LOMB INCORPORATED, 2020; COMSTOCK et al., 2010; HAAS et al., 2009; HAAS et al., 2010; SILVERSTEIN et al., 2012).

Tabela 5 - Absorbâncias para CIM das suspensões de cloridrato de besifloxacino (matéria prima) e Besivance® frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Para o padrão (microrganismo 10^6 UFC/mL) foi obtido absorbância de 1,093. Para o branco (meio de cultura TSB sem inóculo bacteriano) foi obtido absorbância de 0,004.

Cloridrato de besifloxacino (matéria-prima)			Besivance®	
Concentração (µg/mL)	Absorbância	Crescimento microbiano	Absorbância	Crescimento microbiano
60	0,003	-	0,002	-
30	0,009	-	0,046	-
15	0,017	-	0,003	-
7,5	0,011	-	0,008	-
3,75	0,700	+	0,066	-
2	0,896	+	0,437	+
1	0,258	+	0,519	+
0,5	0,350	+	0,712	+
0,25	0,881	+	0,914	+
0,125	0,969	+	1,016	+

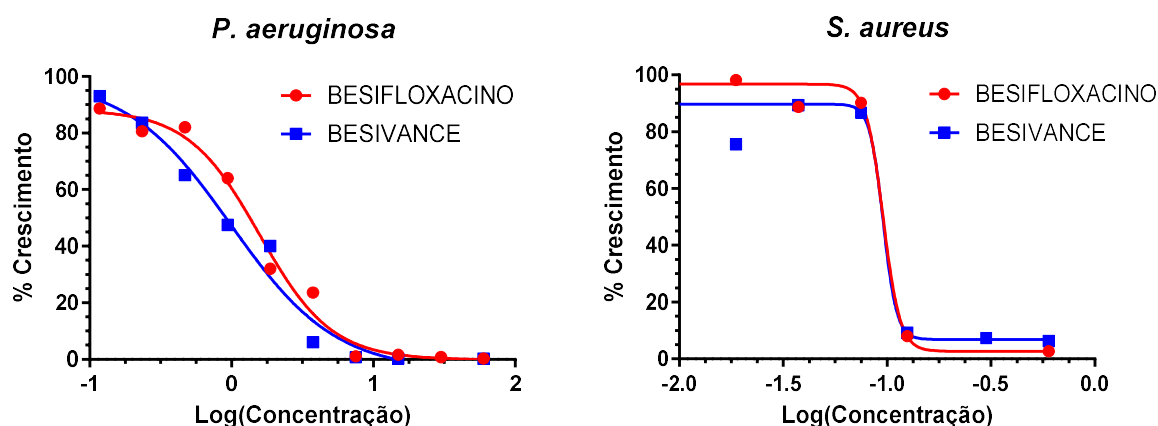
(-): Negativo; (+): Positivo

Tabela 6 - Absorbâncias para CIM das suspensões de cloridrato de besifloxacino (matéria prima) e Besivance® frente a *Staphylococcus aureus*. Para o padrão (microrganismo 10^6 UFC/mL) foi obtido absorbância de 1,093. Para o branco (meio de cultura TSB sem inóculo bacteriano) foi obtido absorbância de 0,004.

Cloridrato de besifloxacino (matéria-prima)			Besivance®	
Concentração (µg/mL)	Absorbância	Crescimento microbiano	Absorbância	Crescimento microbiano
0,6	0,023	-	0,053	-
0,3	0,057	-	0,063	-
0,15	0,068	-	0,078	-
0,075	0,765	+	0,735	+
0,04	0,752	+	0,758	+
0,02	0,833	+	0,640	+
0,01	0,823	+	0,723	+
0,005	0,926	+	0,853	+
0,0025	0,864	+	0,905	+
0,00125	0,83	+	0,830	+

(-): Negativo; (+): Positivo

Figura 6 - Curvas de inibição do crescimento bacteriano para determinação da CIM do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e do produto Besivance® frente a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.



3.4 Desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de besifloxacino

O desenvolvimento do método foi realizado conforme COSTA e colaboradores (2019). De acordo com a Resolução RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017) a revalidação é a repetição parcial ou total da validação de um método analítico. A validação parcial tem o objetivo de demonstrar, por meio de alguns parâmetros de validação, que o método analítico previamente validado tem as características necessárias para a análise proposta.

Para a FDA (2015) e USP (2021) a revalidação total ou parcial deve ser considerada quando houver mudança no procedimento analítico, como por exemplo, alteração de equipamentos, reagentes ou formulações. Ainda, esse guia esclarece que se deve revalidar, para garantir que o método analítico mantenha as características críticas de desempenho. O grau de revalidação depende da natureza da mudança (FDA, 2015).

No presente estudo foi efetuada a validação parcial do método para determinação do teor de besifloxacino. As seguintes características de desempenho foram determinadas: linearidade, seletividade, precisão e exatidão, os critérios de aceitação foram de acordo com ICH Q2(R1).

3.4.1 Teste de filtro

Esse teste é utilizado para avaliar a compatibilidade e possíveis interferências dos filtros no preparo da amostra, conforme recomenda a RDC 166/2017 (ANVISA, 2017). Nessa validação parcial, foram avaliadas possíveis interferências dos filtros Millex®-HV-PVDF 13mm de diâmetro, poros de 0,45µm. Assim, as áreas obtidas nos picos das amostras e padrões (Tabela 7) mostram que não houve qualquer influência nas respostas analíticas a partir da filtração das soluções.

Tabela 7 - Áreas do padrão e amostras obtidas nos cromatogramas do teste de filtro Millex®-HV-PVDF 13mm de diâmetro, poros de 0,45µm.

Descarte (mL)	Amostra	Padrão
	Área mAU*min	Área mAU*min
0	46,8143	42,0312
1	46,8856	41,7377
2	46,6735	41,9911
5	46,7079	42,0635
Média	46,7700	41,9560
*DPR (%)	0,2080	0,3540

*DPR: desvio padrão relativo.

3.4.2 Seletividade

A seletividade do método analítico é demonstrada pela capacidade de esse identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente (ICH 2005; USP 42, 2019; Brasil, 2017). Essa característica de desempenho foi determinada por COSTA e colaboradores (2014) por meio da degradação forçada das soluções amostras e padrões. Além disso, no estudo foram avaliadas as possíveis interferências dos excipientes presentes no produto comercial (Besivance®) em todas as soluções analisadas. O estudo não apresentou interferências na resposta analítica do besifloxacino provenientes do diluente, da matriz, de impurezas ou de produtos de degradação.

Adicionalmente, nessa validação parcial, foi considerado placebo contendo o Povacoat® (estabilizante), o glicerol (isotonizante) e cloreto de benzalcônio (conservante), utilizados na formulação otimizada. Os cromatogramas do diluente, do

placebo e da amostra da fórmula otimizada (nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m) foram plotados (Figura 7). A comparação entre eles mostra que não houve qualquer interferência nas respostas analíticas do besifloxacino e que o sistema estava adequadamente estabilizado.

Além disso, a pureza do pico do cloridrato de besifloxacino foi confirmada. No cromatograma (Figura 8), o valor de 1000 (*match*) corresponde a 100% de pureza do pico com detecção UV em 295nm, utilizando matriz de diodo (DAD) (Figura 9), indicando que o método é seletivo para a quantificação, conforme método proposto.

Figura 7 - Cromatogramas da amostra de nanossuspensão de besifloxacino (preto) do diluente/fase móvel (azul) e do placebo (rosa), para avaliação da seletividade do método.

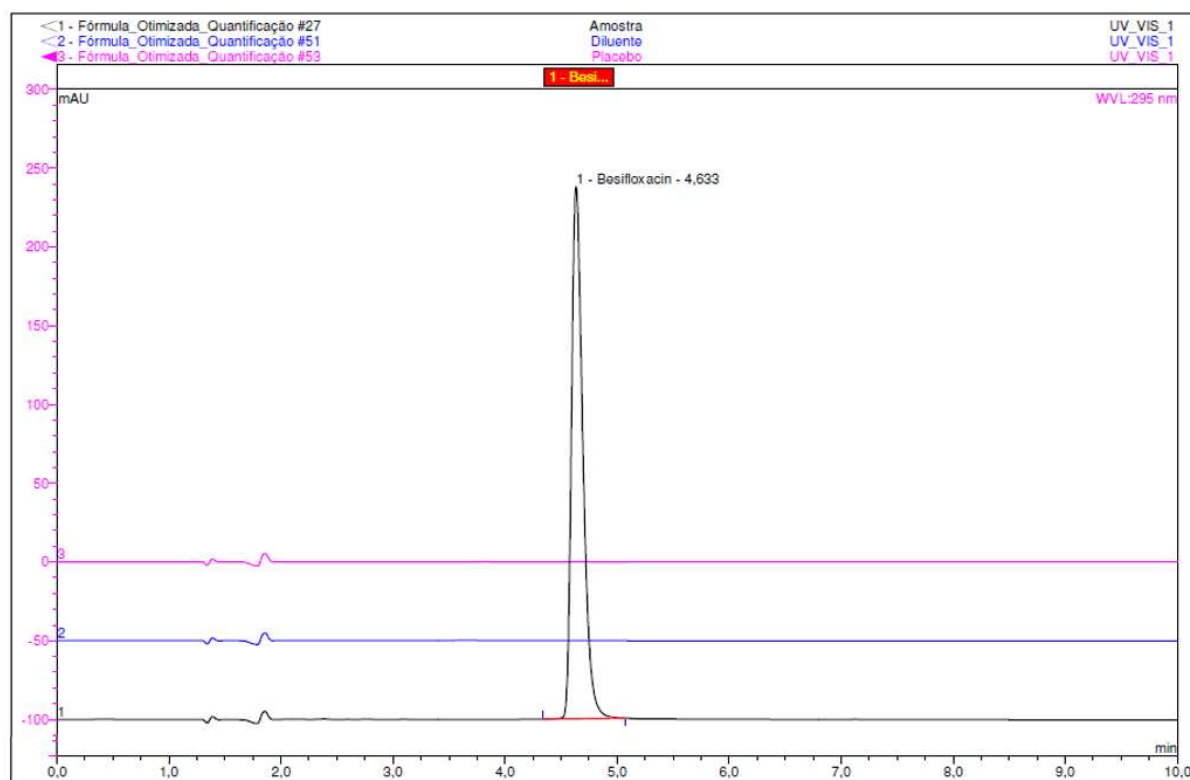


Figura 8 - Pureza do pico de besifloxacino obtido a partir dos cromatogramas das amostras do produto Besivance® e da fórmula otimizada (nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m).

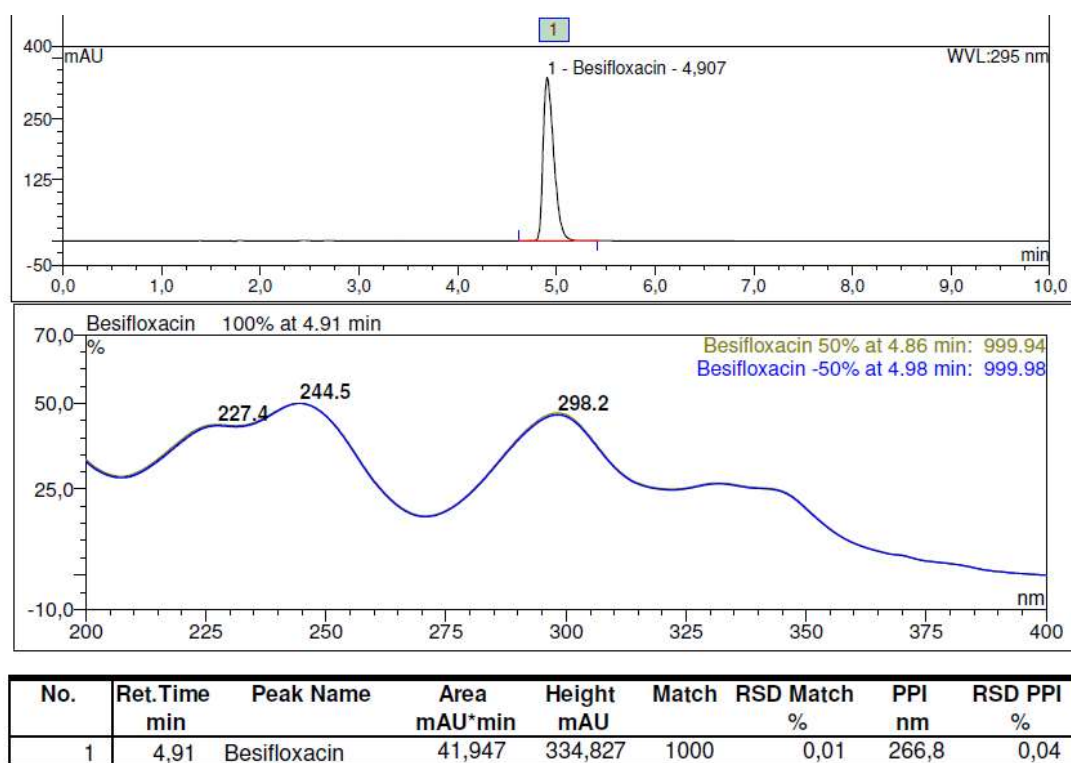
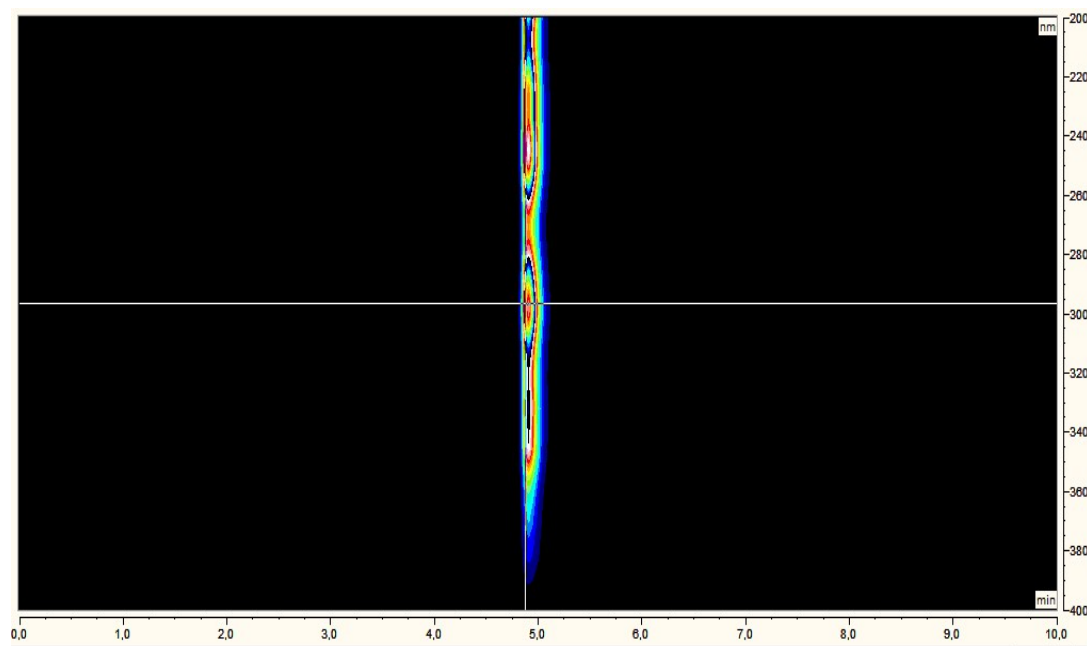


Figura 9 - Intensidade de detecção UV do pico de besifloxacino a 295nm.



3.4.3 Linearidade

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (ICH 2005; USP 42, 2019; Brasil, 2017).

De acordo com os valores das áreas dos picos com relação as concentrações (Tabela 8), o método foi linear apresentando coeficiente de correlação $r=0,9996$ ($R^2=99,96\%$) para as concentrações do fármaco na faixa de 20 a 80 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 10). A equação de regressão para o ajuste linear foi $y = 0,8427x + 0,2336$, onde x é concentração e y é a área (Figura 11). De acordo com a análise estatística o método apresentou regressão linear ($p<0,05$) e não apresentou desvio para a linearidade ($p>0,05$). Além disso, os gráficos de linha ajustada (Figura 11) e versus ajustados (Figura 12) apresentaram baixa dispersão dos resultados e indicam que os erros foram aleatórios, evidenciando a homocedasticidade do método.

Tabela 8 - Valores das áreas referentes aos picos de cloridrato de besifloxacino SRQ para a construção da curva analítica (CLAE).

Nível	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área (mAU*min)	DPR* (%)
40%	20	16,88178	1,030319
		17,10275	
		17,23003	
60%	30	25,16472	0,823094
		25,45344	
		25,57206	
80%	40	33,62921	0,907158
		34,15813	
		34,17338	
100%	50	42,00641	0,96242
		42,75946	
		42,66674	
120%	60	50,56150	0,675787
		50,80584	
		51,23943	
140%	70	58,80348	0,671757
		59,30284	
		59,59082	
160%	80	66,87052	0,851824
		67,83293	
		67,90575	

*DPR: desvio padrão relativo

Figura 10 - Curva analítica de cloridrato de besifloxacino SQR com correlação 0,99963 calculado pelo software Chromeleon® Version 6.80.

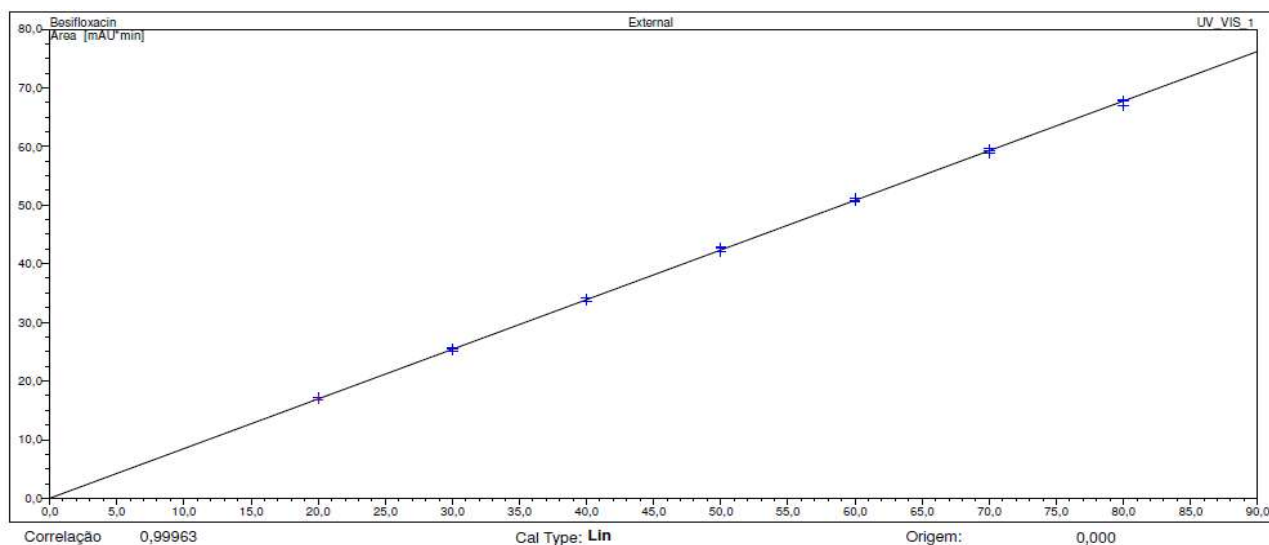


Figura 11 - Gráfico de linha ajustada de área versus concentração: curva de calibração da linearidade.

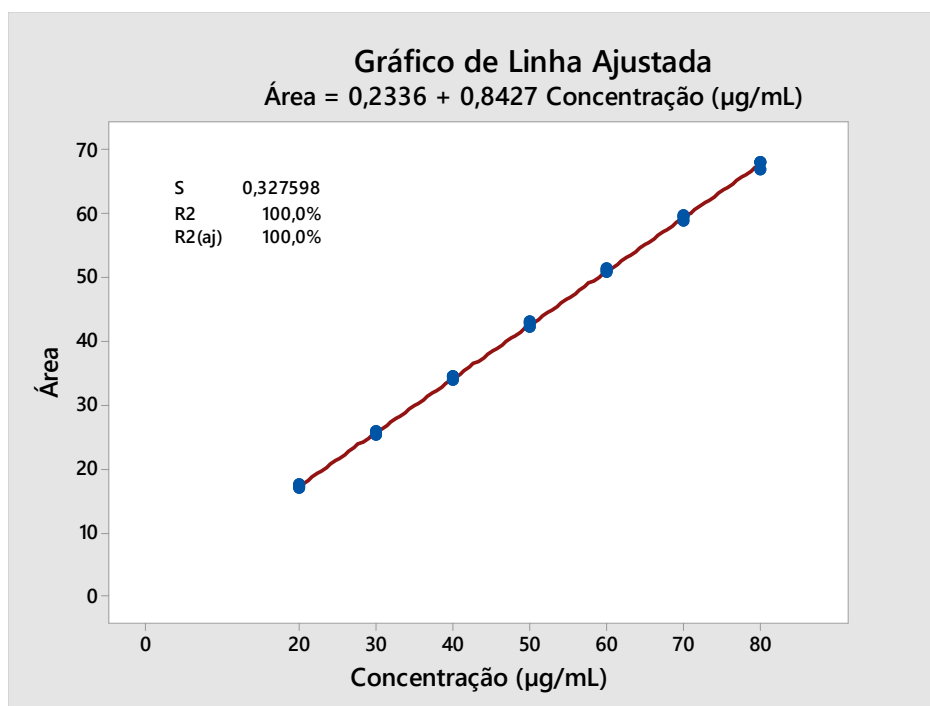
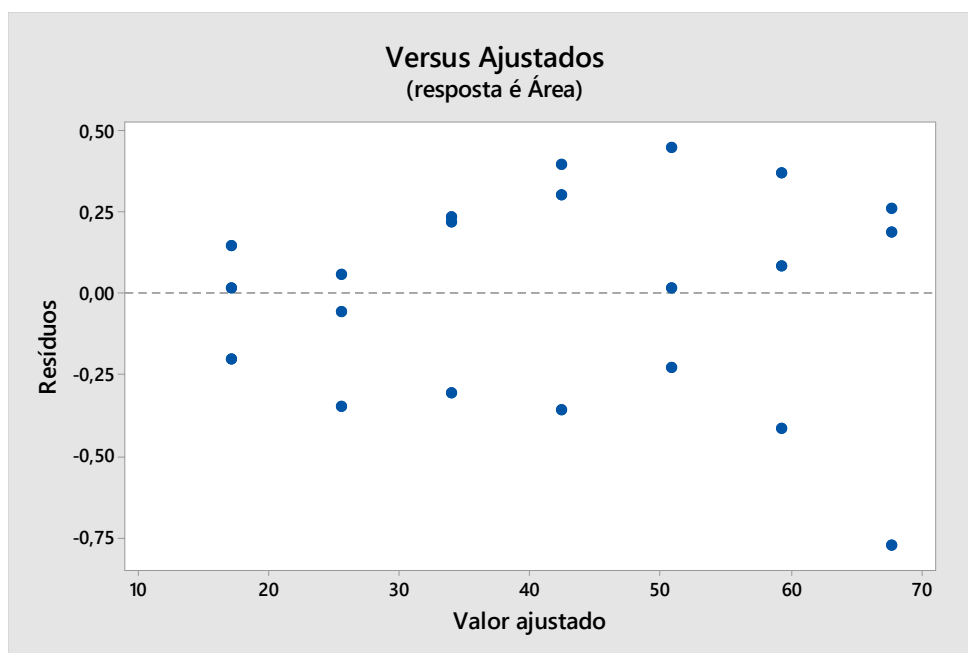


Figura 12 - Gráfico de dispersão dos resíduos para análise da linearidade do método por CLAE.



3.4.4 Precisão

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado (ICH 2005; USP 42, 2019; Brasil, 2017). Portanto, para a precisão foram avaliados dois aspectos diferentes: intradia (precisão por repetibilidade) e interdias (precisão intermediária).

Na repetibilidade, as seis amostras (concentração de 50µg/mL de cloridrato de besifloxacino da suspensão oftálmica) foram preparadas e analisadas considerando as mesmas condições analíticas, mesmo analista e mesmo equipamento (injetadas em triplicata). Foram obtidos os valores de desvio padrão relativo (DPR) de 1,20% no primeiro dia, 0,84% no segundo dia e 0,39% no terceiro dia. Esses valores representam os resultados médios de 49,43µg/mL (98,9%), 49,83µg/mL (99,7%) e 49,85µg/mL (99,7%) para os doseamentos dos três dias, respectivamente.

A precisão intermediária foi avaliada pela determinação do DPR, entre os resultados dos três dias. Nesse caso, as análises (54 determinações) forneceram o valor de DPR de 0,94%. Portanto, esses resultados (intradia e interdia) evidenciam precisão adequada do método analítico.

3.4.5 Exatidão

A exatidão de determinado método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (ICH 2005; USP 42, 2019; Brasil, 2017). Para isso, foi utilizado o ensaio de recuperação considerando três níveis de concentração: 100, 120 e 140% (R1, R2 e R3). A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos, mostrando exatidão satisfatória para o método.

Tabela 9 - Determinação da exatidão do método por CLAE para análise do cloridrato de besifloxacino em suspensão oftálmica.

	Quantidade de SQR adicionado (µg)	Concentração SQR encontrada (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)	Recuperação média (%)
R1	10,00	49,49	98,98	0,08	99,03
R2	20,00	59,44	99,07	1,31	
R3	30,00	69,32	99,03	1,32	

3.4.6 Comparação entre a validação parcial com a validação do método referência

A validação parcial do método evidenciou a capacidade de quantificar o cloridrato de besifloxacino em suspensão oftálmica (0,6%). Assim, esse método tem capacidade de quantificar o besifloxacino em diferentes matrizes, assumindo que a preparação da amostra seja adequada. Os resultados comparativos entre a validação parcial e a validação do método referência (COSTA, et al. 2019) estão apresentados na Tabela 10.

No que se refere a seletividade, embora nessa validação parcial não tenha sido realizado estudos de degradação forçada, o método foi desenvolvido tal qual o método referência. Complementarmente, nesse estudo foi considerado placebo contendo o estabilizante Povacoat[®], o glicerol (isotonizante) e cloreto de benzalcônio (conservante), os resultados (Figura 8) evidenciaram que esses não interferem nas respostas analíticas. Portanto, o método é seletivo para o besifloxacino na nanossuspensão (formulação otimizada). Para linearidade, precisão e exatidão, os resultados mostram equivalência entre as validações (Tabela 10).

Ainda, é importante considerar que, embora não tenha sido realizado ensaio de robustez na validação parcial, a obtenção do tempo de retenção em 4,9 minutos, evidencia que a separação do pico do cloridrato de besifloxacino é idêntica ao método referência. A única alteração relacionada ao método referência foi a utilização da coluna com diâmetro de partícula 1,5µm menor.

A coluna utilizada por COSTA e colaboradores (2019) foi a coluna C-18 Agilent® Eclipse Plus (150mm x 4.6mm x 5µm). Nesse estudo foi utilizado a coluna C-18 Agilent® Eclipse Plus (150mm x 4.6 mm x 3,5µm). Nesse caso, essa diferença não interfere na capacidade do método, a diminuição do diâmetro das partículas da fase estacionária só aumenta a eficiência da coluna (LANÇAS, 2011).

Adicionalmente, nessa validação parcial foi realizado o teste de filtro, o qual não apresentou interferência proveniente do filtro Millex®-HV-PVDF 13mm de diâmetro, poros de 0,45µm. Esse teste não foi demonstrado por COSTA e colaboradores (2019).

Tabela 10 - Comparação entre a validação do método referência e a validação parcial para o desenvolvimento do método para quantificação de cloridrato de besifloxacino em suspensão oftálmica (0,6% m/m).

Parâmetro	Método referência (COSTA, et al. 2019)	Validação parcial
Seletividade	Seletivo	Seletivo
Linearidade	$r = 0,9998$; $p = > 0,05$	$r = 0,9996$; $p = > 0,05$
Precisão	Repetibilidade DPR = 0,74%, 1,73% e 0,88% Intermediária DPR = 1,41%	Repetibilidade DPR = 1,20%, 0,84% e 0,39% Intermediária DPR = 0,94%
Exatidão	Recuperação = 101,00%	Recuperação = 99,03%
Robustez*	Tempo de retenção 4,9 min	Tempo de retenção 4,9 min
Teste de filtro	Não demonstrado	Sem interferências

*Parâmetro não avaliado na validação parcial, entretanto, a comparação pode ser feita pelo tempo de retenção obtido entre os métodos.

3.5 Estudo exploratório para o desenvolvimento de nanocristais de besifloxacino empregando moagem via úmida em escala reduzida

A moagem via úmida em escala reduzida apresenta como principal vantagem sua simplicidade e viabilidade econômica. Nesse sistema atuam as forças de impacto

entre as partículas de fármaco, entre essas com as esferas de zircônio e as forças de impacto entre as partículas com a parede de vidro do recipiente de moagem. As condições de elevada energia de impacto e cisalhamento permitem a nanopulverização do material (ROMERO et al., 2016).

A forma farmacêutica comercial do besifloxacino foi desenvolvida a partir da tecnologia de administração de medicamentos denominada DuraSite™ (InSite Vision, Inc., Alameda, EUA). Nessa tecnologia, um veículo constituído de polímero sintético (ácido poliacrílico reticulado) permite aumentar o tempo de retenção do fármaco na superfície do olho (BAUSCH & LOMB INCORPORATED, 2020; COSTA et al., 2014; TÓTOLI; SALGADO, 2018). Apesar do uso dessa tecnologia, é necessário administrar o medicamento 3 vezes ao dia (MAHVAN et al., 2014).

Nesse sentido, a obtenção de nanocristais de cloridrato de besifloxacino possibilita aumentar a bioadesividade às membranas biológicas (superfície do olho), permitindo a redução da dose (BARBOSA et al., 2016; CHEN et al., 2017; DAVIS et al., 2018; TYNER et al., 2017). No presente estudo foram testados diferentes estabilizantes visando a obtenção dos nanocristais. Esses estabilizantes foram comparados considerando a sua eficiência na redução do tamanho de partícula e os resultados preliminares para sua estabilidade física.

Os estabilizantes foram testados na concentração de 0,6% (m/m) na razão 1:1 com o cloridrato de besifloxacino, utilizando tampão fosfato pH 7,0 como diluente. Esse diluente foi utilizado para evitar alterações nas formulações provenientes de flutuações do pH. Nessa condição de pH o fármaco não é solubilizado, diferentemente do processo de fabricação do produto referência (Besivance®). Nesse processo, o cloridrato de besifloxacino é dissolvido, e após a dissolução, promove-se precipitação do fármaco a pH 6,5 (forma *zwitterion* do ativo) (TGA, 2014).

Adicionalmente, a utilização desse tampão permite manter o pH das formulações na faixa do pH lacrimal. O pH da lágrima varia de 6,5 a 7,6, sendo o valor médio de 7,0 (ABELSON et al., 1981). Esses pesquisadores utilizaram microsonda de vidro para realizar medições do pH lacrimal em pacientes saudáveis. Considerar essas características fisiológicas é essencial para o desenvolvimento da formulação adequada.

3.5.1 Estudo exploratório I: Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) da partícula, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (PZ)

As determinações do DHM e do IP foram efetuadas em intervalos de 24h do processo de moagem (tempo de processo: 4 dias). Apenas os estabilizantes poloxamer 407 e o polissorbato 80 apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) das partículas na escala nanométrica, após 24h de moagem (Tabela 10). No segundo dia (48h de moagem), o TPGS apresentou redução do DHM, entretanto, a partir do terceiro dia, foi observado aumento do tamanho das partículas ou a não redução significativa do tamanho (Tabela 11).

Tabela 11 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm e índice de polidispersão (IP) para estudo exploratório I do desenvolvimento de nanocristais de besifloxacina 0,6% (m/m). Condições: 1200 RPM e 30% (m/m) esferas de zircônio.

Estabilizante	Tempo de processo (moagem)							
	1 dia		2 dias		3 dias		4 dias	
	DHM	IP	DHM	IP	DHM	IP	DHM	IP
Poloxamer P 407	275,5±1,7	0,155±0,029	381,6±11,1	0,017±0,021	1020,0±179,1	0,217±0,099	948,7±159,1	0,231±0,030
Poloxamer P188	1790,0±600,5	0,245±0,208	2164,0±656,5	0,069±0,048	2164,0±854,2	0,158±0,066	2512±858,8	0,177±0,094
TPGS	1180,0±145,6	0,135±0,093	715,6±71,7	0,214±0,042	1010,0±228,1	0,277±0,066	1618±275,5	0,329±0,094
Polissorbato 80	518,9±9,3	0,129±0,070	1324,0±261,3	0,219±0,032	1451,0±227,7	1324,0±261,3	1437,0±325,7	0,311±0,052
BAC	2181,0±538,6	0,798±0,335	3566,0±844,0	0,092±0,050	2171,0±607,8	0,255±0,205	3043,0±756,7	0,300±0,260
CPC	2731,0±957,3	0,165±0,059	2935,0±637,5	0,168±0,123	2171,0±607,8	0,255±0,205	2789,0±655,2	0,159±0,056
16-BAC	2037,0±739,7	0,165±0,059	1915,0±377,4	0,168±0,123	1742,0±284,0	0,321±0,204	1570,0±191,3	0,474±0,124

No que se refere aos poloxamers 188 e 407, esperava-se resultados similares quanto a estabilização na redução do tamanho das partículas. Esses estabilizantes são polímeros em bloco de polioxietileno e polioxipropileno. O poloxamer 407 é constituído de 70% de polioxietileno e 30% polioxipropileno, massa molecular média de 12600 (g/mol), 33% a mais comparado ao poloxamer 188 (massa molecular média de 8400 (g/mol)) (MCLAIN, V. C, 2008). Além disso, o poloxamer 188 tem maior grau de hidrofilicidade, o que pode propiciar menor interação com a molécula de besifloxacina.

Quanto ao tempo de moagem, foi observado aumento do tamanho de partícula a partir do segundo dia para o poloxamer 407, estabilizante com melhor resultado preliminar (Tabela 11). Essa mudança pode ser explicada a partir do fenômeno de maturação de Ostwald (*Ostwald ripening*), responsável pelas alterações do tamanho e distribuição das partículas. Nesse fenômeno ocorre agregação ou crescimento progressivo das partículas maiores a partir das partículas menores (nanocristais) em função do tempo de processo (SKRDLA, P. J.; YANG, H, 2019).

Considerando esses resultados insatisfatórios (Tabela 11), foram preparadas novas formulações contendo os estabilizantes poloxamer 407, TPGS e polissorbato 80. A concentração do fármaco, dos estabilizantes e os parâmetros de processo foram mantidos, entretanto, o tempo de moagem foi reduzido para 24h. Esse tempo de moagem foi definido com o objetivo de avaliar os resultados iniciais e monitorar a estabilidade das formulações imediatamente após a moagem (tempo zero), após 48h, 72h, 7 dias e 15 dias, por meio das medidas de DHM, IP (Tabela 12) e potencial zeta (PZ) (Tabela 13).

Com referência ao DHM, apenas o poloxamer 407 apresentou distribuição monomodal com DHM médio de aproximadamente 337,7 nm, após 24h de moagem. Entretanto, foi observado variabilidade nas medidas do DHM entre o tempo zero e 15 dias. Ainda relacionado ao poloxamer 407, é importante considerar que não houve variação significativa do IP. Esse apresentou valor médio de aproximadamente 0,2. Isso confirma que a distribuição do diâmetro das partículas se encontra em estreita faixa. Os estabilizantes polissorbato 80 e TPGS não permitiram a redução do DHM, portanto, não foram avaliados nos tempos seguintes.

Tabela 12 - Estabilidade do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm e índice de polidispersão (IP) para os estabilizantes poloxamer 407, TPGS e polissorbato 80 nos intervalos de tempo: imediatamente após a moagem, após 48h, 7 dias e 15 dias.

Estabilizante*	24h		48h		7 dias		15 dias	
	DHM	IP	DHM	IP	DHM	IP	DHM	IP
Poloxamer P 407	337,7±14,6	0,190±0,025	405,3±19,7	0,212±0,021	418,5±9,9	0,151±0,050	415,5±7,9	0,150±0,050
TPGS	796,5±56,7	0,200±0,050	1570,0±191,3	0,475±0,124	-	-	-	-
Polissorbato 80	1100,0±33,5	0,192±0,076	-	-	-	-	-	-

(-): não houve medição; *tempo do processo de moagem: 24h

Quanto ao potencial zeta (Tabela 13), os resultados para o poloxamer 407 permaneceram similares, indicando que não houve alteração na carga superficial. O potencial zeta para o polissorbato 80 e o TPGS não foram monitorados nos tempos de 48h, 72h e 7 dias e 15 dias por não ter apresentado redução do DHM.

Alguns fatores que influenciam diretamente no valor do potencial zeta são pH, a força iônica do meio e a concentração dos componentes da formulação. Em concentrações muito elevadas a luz dispersa não é detectada (BHATTACHARJEE, 2016). A medição do potencial zeta é influenciada, também, pela condutividade do meio dispersante (Varenne et al., 2019). Por isso, foi feita diluição 1:24 da amostra em tampão fosfato pH 7,0 com condutividade de 2238 $\mu\text{S}/\text{cm}$, obtendo atenuador (7), adequado para as leituras e sem variações.

O potencial zeta é o potencial no plano de cisalhamento (entre a camada de Stern e a camada difusa), baseado na mobilidade das partículas em função da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre elas (BHATTACHARJEE, 2016; MALVERN, 2020). Partículas de cargas semelhantes se repelem, aquelas com cargas elevadas são menos suscetíveis à flotação e agregação e tornam as amostras mais estáveis (MALVERN, 2020). Essa medida tem o objetivo de prever a estabilidade física das nanosuspensões (FDA, 2017).

Tabela 13 - Determinação do potencial zeta para os estabilizantes poloxamer 407, TPGS e polissorbato 80 nos intervalos de tempo: imediatamente após a moagem, após 48h, 72h e 7 dias e 15 dias.

Fórmula	24h	48h	72h	7 dias	15 dias
Poloxamer P 407	-1,13 $\pm$ 0,31	-1,28 $\pm$ 0,03	-1,32 $\pm$ 0,14	-1,34 $\pm$ 0,45	-1,30 $\pm$ 0,40
TPGS	-2,77 $\pm$ 0,20	-2,54 $\pm$ 0,19	-	-	-
Polissorbato 80	-1,54 $\pm$ 0,32	-	-	-	-

(-): não houve medição; *tempo do processo de moagem: 24h

Assim sendo, o poloxamer 407, polímero não iônico, permitiu a estabilização da nanosuspensão por impedimento estérico (Tabela 13). De acordo com Boles e colaboradores (2016), o impedimento estérico ocorre por meio da adsorção de moléculas dos estabilizantes na superfície das nanopartículas. Tal fenômeno impede fisicamente o contato entre as partículas, reduzindo a atuação das forças de atração de Van der Waals.

Como o poloxamer 407 faz parte da formulação do Besivance®, foi proposto continuar o estudo exploratório (estudos exploratórios II e III) com o objetivo de identificar estabilizante alternativo visando a obtenção de formulação inovadora.

3.5.2 Estudo exploratório II: Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) da partícula e índice de polidispersão (IP)

Nesse estudo foram preparadas novas formulações, com objetivo de testar outros estabilizantes e combinações entre eles e o Poloxamer 407. Os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm e índice de polidispersão (IP) para estudo exploratório II do desenvolvimento de nanocristais de besifloxacino 0,6% (m/m). Condições: 1200 RPM e 30% (m/m) esferas de zircônio.

Estabilizante	Tempo de processo (moagem)			
	1 dia		4 dias	
	DHM	IP	DHM	IP
BSF 60mg + KL 60mg	2550,0±196,6	0,296±0,037	3426,0±427,4	0,185±0,089
BSF 60mg + POVA 60mg	782,9±8,9	0,247±0,008	972,8±21,4	0,298±0,017
BSF 60mg + P407 30mg + KL 30mg	949,4±105,5	0,286±0,024	4267,0±626,2	0,173±0,134
BSF 60mg + P407 30mg + POVA 30mg	3473,0±102,8	0,329±0,053	1056,0±53,2	0,213±0,058
BSF 60mg + HS 15 100mg	1427,0±380,6	0,097±0,042	1002,0±223,8	0,276±0,030
BSF 60mg + HS 15 50mg + POVA 50mg	812,8±26,3	0,086±0,072	1122,0±81,5	0,132±0,038

As determinações do DHM e do IP foram efetuadas após 1 dia e 4 dias do processo de moagem (tempo de processo: 4 dias). Apenas os estabilizantes Povacoat® e a combinação de P407 + Kollicoat® apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) das partículas na escala nanométrica, após 24h de moagem (Tabela 14). Após 4 dias de processo de moagem foi observado aumento do tamanho das partículas de todas as fórmulas, assim, como no estudo exploratório I (3.3.1). Esse evento também pode ser explicado pelo fenômeno *Ostwald ripening*, conforme mencionado anteriormente.

Diante desses resultados, ainda insatisfatórios, foi procedido o terceiro estudo exploratório (Estudo exploratório III).

3.5.3 Estudo exploratório III: Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) da partícula e índice de polidispersão (IP)

Os estabilizantes Povacoat® e Quitosana se mostraram promissores para a redução do tamanho das partículas nos estudos I e II. Nessa terceira etapa eles foram testados em diferentes concentrações e combinações com outros estabilizantes. O tempo de processo foi de 4 dias e as medidas de DHM e IP foram realizadas a cada 24h de processo. Os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm e índice de polidispersão (IP) para estudo exploratório III do desenvolvimento de nanocristais de besifloxacin 0,6% (m/m). Condições: 1200 RPM e 30% (m/m) esferas de zircônio.

Fórmula	Tempo de processo (moagem)							
	1 dia		2 dias		3 dias		4 dias	
	DHM	IP	DHM	IP	DHM	IP	DHM	IP
BSF 60mg + POVA 100mg	598,5±3,5	0,096±0,094	586,6±18,4	0,131±0,020	607,8±9,9	0,118±0,032	607,2±11,56	0,216±0,013
BSF 60mg + POVA 30mg + TPGS 30 mg	1828,0±63,9	0,188±0,033	1372,0±150,8	0,075±0,052	1435,0±83,7	0,178±0,043	1692,0±237,0	0,195±0,075
BSF 60mg + TPGS 100mg	2290,0±561,6	0,275±0,080	2883,0±580,0	0,168±0,025	3374,0±118,8	0,670±0,025	-	-
BSF 60 mg + KL 30mg + QUITO 30mg	717,5±17,1	0,141±0,071	683,6±16,4	0,091±0,067	688,3±25,0	0,155±0,038	594,7±22,57	0,195±0,019
BSF 60mg + QUITO 60mg	1671,0±196,8	0,256±0,059	1724,0±109,0	0,814±0,098	1403,0±162,9	0,439±0,077	-	-
BSF 60mg + QUITO 100mg	2029,0±52,8	0,270±0,037	1889,0±268,6	0,346±0,068	2200,0±54,3	0,417±0,060	-	-
BSF 60mg + P407 50mg + QUITO 50mg	400,2±14,54	0,196±0,036	380,90±2,7	0,202±0,072	329,6±9,5	0,189±0,016	267,6±1,5	0,215±0,005
BSF 60mg + P407 30mg + QUITO 30mg	514,1±36,1	0,010±0,059	519,8±33,64	0,200±0,039	417,5±25,3	0,199±0,023	355,3±7,1	0,192±0,019
BSF 60mg + POVA 50mg + QUITO 50mg	1904,0±615,6	0,240±0,097	2080,0±804,2	0,150±0,066	2181,0±804,2	0,150±0,066	-	-
BSF 60mg + POVA 100mg + QUITO 30mg	621,5±19,6	0,163±0,033	912,0±35,6	0,271±0,020	1012,0±35,6	0,271±0,020	-	-
BSF 60mg + QUITO 30mg	1462,0±224,4	0,213±0,050	1801,0±546,6	0,741±0,262	1988,0±546,6	0,741±0,262	-	-

(-): não houve medição.

Nesse sentido, o Povacoat® permitiu a redução das partículas após 24h de processo. Entretanto, não foi observada redução significativa do tamanho das

partículas após 4 dias de processo de moagem. Já para a combinação dos estabilizantes P407 e quitosana, a redução do tamanho das partículas foi progressiva, logo após o primeiro dia de processo. Em contrapartida, embora combinações com a quitosana tenha apresentado redução do tamanho das partículas, esse estabilizante isolado não permitiu a redução do DHM. As outras formulações contendo combinação do Povacoat® e TPGS e somente o TPGS (Tabela 15), não apresentaram redução do tamanho das partículas.

Diante disso, foi realizado estudo para avaliar a estabilidade das formulações dessa etapa (estudo exploratório III), as quais permitiram a redução do tamanho das partículas para escala nanométrica. As formulações e respectivos resultados de DHM e IP estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Estabilidade do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm e índice de polidispersão (IP) para o estudo exploratório III, nos intervalos de tempo: imediatamente após a moagem (T0), 7 dias, 15 dias e 30 dias. Tempo de processo 4 dias.

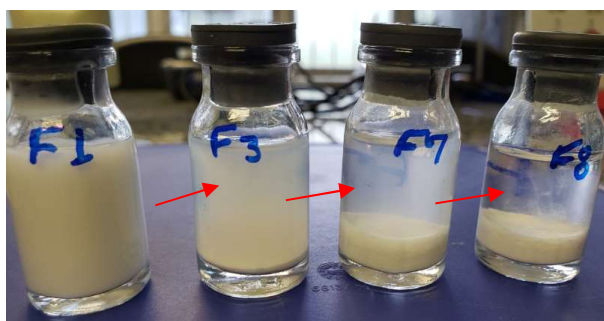
Fórmula	T0		7 dias		15 dias		30 dias	
	DHM	IP	DHM	DHM	DHM	IP	DHM	IP
BSF 60mg + POVA 100mg	607,2±11,56	0,0,216±0,013	662,2±10,7	0,252±0,040	660,9±15,5	0,254±0,020	679,4±1,8	0,233±0,013
BSF 60 mg + KLT 30mg + QUITO 30mg	594,7±22,57	0,195±0,019	1205,0±173,9	0,259±0,046	2098,0±466,7	0,267±0,121	-	-
BSF 60mg + P407 50mg + QUITO 50mg	267,6±1,5	0,215±0,005	398,0±5,6	0,235±0,027	428,8±10,8	0,224±0,014	-	-
BSF 60mg + P407 30mg + QUITO 30mg	355,3±7,1	0,192±0,019	570,1±18,67	0,266±0,074	479,2±19,35	0,208±0,020	-	-

(-): não houve medição.

A única fórmula que manteve estabilidade do tamanho (DHM), após 30 dias, foi a fórmula contendo o estabilizante Povacoat®. A combinação dos estabilizantes Kollicoat® e quitosana dobrou de tamanho (aumento de 102,6%), logo após 7 dias, em 15 dias o DHM teve aumento de 252,8%. Embora as fórmulas contendo a combinação de P407 e quitosana apresentem tamanho abaixo de 500 nm, as duas fórmulas apresentaram aumento progressivo do DHM durante o período avaliado. As fórmulas contendo P407 50mg + quitosana 50mg e P407 30mg + quitosana 30mg

apresentaram aumento de 60,2% e 34,9%, respectivamente. Além disso, no 15º dia foi observado sedimentação nas formulações, conforme Figura 13.

Figura 13 - Estabilidade (aspecto) das fórmulas BSF 60mg + POVA 100mg (F1), BSF 60 mg + KLT 30mg + QUITO 30mg (F3), BSF 60mg + P407 50mg + QUITO 50mg (F7) e BSF 60mg + P407 30mg + QUITO 30mg (F8). Após 15 dias.



No que se refere ao tempo de processo, os resultados mostraram que combinações dos estabilizantes Kollicoat e Poloxamer 407 com a quitosana auxiliam na redução do tamanho das partículas. Nesse caso, quanto maior o tempo de processo, foi observada maior redução do tamanho das partículas. Entretanto, as combinações desses estabilizantes não permitiram a estabilidade das fórmulas (Figura 13). Observou-se incompatibilidade desses estabilizantes com o besifloxacino.

Ainda, considerando o tempo de processo, foi observado que 24h é suficiente para obtenção de nanocristais com o estabilizante Povacoat®, além disso, a fórmula se manteve estável pelo período de 30 dias (Tabela 16) e o aspecto da formulação foi preservado no período avaliado, ou seja, não foi observada sedimentação (Figura 13).

Para confirmar o tempo de processo, a fórmula contendo Povacoat® foi preparada novamente. Foram mantidas as mesmas condições de processo, entretanto, foram utilizadas apenas 2 barras magnéticas. Essa alteração permitiu verificar se a quantidade de barras magnéticas constitui variável importante para o processo.

A Tabela 17 indica o tempo adequado de processo de 24h, além disso, foi observado que apenas duas barras magnéticas são suficientes para a redução do tamanho das partículas.

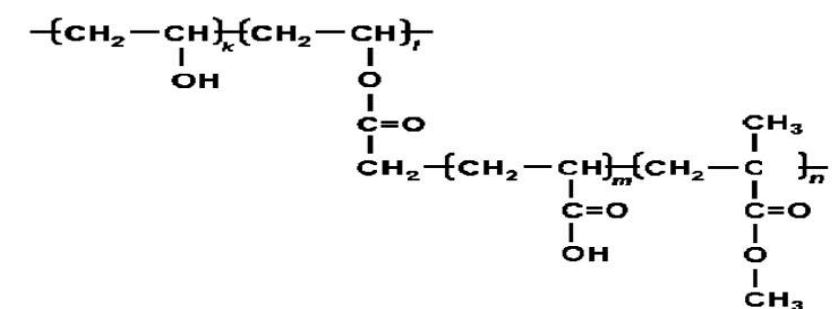
Tabela 17 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm e índice de polidispersão (IP) para estudo exploratório III do desenvolvimento de nanocristais de besifloxacina 0,6% (m/m). Condições: 1200 RPM, 30% (m/m) esferas de zircônio e duas barras magnéticas.

Fórmula	Tempo de moagem (processo)			
	1 dia		4 dias	
	DHM	IP	DHM	IP
BSF 60mg + POVA 100mg	578,3±4,2	0,098±0,067	616,6±15,9	0,197±0,049

Tendo em vista os resultados obtidos (Tabelas 15, 16 e 17), o estabilizante Povacoat® permitiu a obtenção de nanocristais de besifloxacina. Esse componente estabilizou a nanossuspensão no período de 30 dias. Portanto, esse composto foi selecionado para a etapa de planejamento experimental.

Desenvolvido como excipiente farmacêutico, com utilização já consolidada para processos de revestimentos e de granulação úmida, o Povacoat® (Figura 14) tem pKa de 3,56 em ácido forte e 9,5 em base forte, com carga de 0,03 em pH 6,5. Esse copolímero vem sendo estabelecido como agente estabilizante, prevenindo agregações de nanocristais (COMPRI, et al., 2019; LIN, et al., 2016; MELO, et al. 2020; OCHI, et al., 2014; UEDA, et al., 2014; YUMINOKI, et al., 2014; YUMINOKI, et al., 2016; ZUO, et al., 2020).

Figura 14 - Estrutura Química do Povacoat®.



C₄₇H₇₈N₁₂O₁₂S

Fonte: DAIDO Drug Master File No. 18033.

Melo e colaboradores (2020) desenvolveram nanocristais de rifampicina utilizando o Povacoat® como estabilizante. Os pesquisadores obtiveram nanocristais com DHM menor que 500nm, a redução do tamanho de partículas foi de 100 vezes com relação ao fármaco na forma micronizada (~ 50 µm). Além disso, esse

estabilizante permitiu manter a estabilidade física da nanossuspensão por dois anos à 4°C.

Nesse mesmo sentido, o Povacoat® possibilitou a obtenção de nanocristais de ácido orótico com tamanho médio de 100-200nm, redução de 500 vezes em relação ao fármaco, o qual tem tamanho de partículas de 44,3µm. No estudo, os pesquisadores destacaram a melhora na solubilidade de saturação dos nanocristais, a qual foi aumentada em até 13 vezes em relação ao fármaco micronizado (COMPRI, et al., 2019).

Com a mesma abordagem, Zuo e colaboradores (2020) desenvolveram nanossuspensão de esculetina com Povacoat® (1:1). Os pesquisadores também relataram aumento significativo da solubilidade de saturação dos nanocristais (200nm) em comparação ao fármaco na forma de pó micronizado (ZUO et al., 2020).

Esses estudos suportam o desenvolvimento de nanocristais de besifloxacino utilizando o estabilizante Povacoat®, possibilitando a obtenção de formulação inovadora para o tratamento da conjuntivite bacteriana.

3.6 Otimização da nanossuspensão de besifloxacino + Povacoat® aplicando desenho de experimento Box-Behnken

O planejamento Box-Behnken se refere à experimento de superfície de resposta (Minitab® 18). Para esse modelo são considerados, pelo menos, três fatores. Nesse sentido, os estudos exploratórios permitiram estabelecer a velocidade de agitação como parâmetro crítico do processo (variáveis independentes), assim como, a concentração do estabilizante (Povacoat®) e a concentração do fármaco (Tabela 18). Assim, esse experimento foi utilizado para avaliar a resposta ou variável dependente, o diâmetro hidrodinâmico médio (DHM).

Tabela 18 - Variáveis independentes e níveis selecionados para o experimento Box-Behnken.

Nível	Besifloxacino (m/m)	Estabilizante (Povacoat®) (m/m)	Velocidade (rpm)
Mínimo (-1)	0,4	0,6	800
Ponto central (0)	0,6	0,8	1000
Máximo (+1)	0,8	1,0	1200

A concentração de Povacoat® (1,0% m/m) obtida nos estudos exploratórios foi considerada para estabelecer a concentração máxima desse estabilizante no desenho experimental. A concentração mínima estabelecida foi de 0,6% (m/m). Essa concentração refere-se à relação ao fármaco de 1:1 e também foi testada nos ensaios preliminares. Os fatores para a concentração do fármaco (Tabela 18) foram selecionados, com objetivo de avaliar efeito sinérgico na redução do DHM. Os valores de DHM estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) obtidos para as preparações de nanocristal de besifloxacino. Matriz de planejamento de experimentos Box-Behnken. Condições: 30% (m/m) esferas de zircônio e duas barras magnéticas.

Fórmula	Ordem	Ponto Central	Besifloxacino	Povacoat®	Velocidade	DHM (nm)
1	1	2	0,4	0,6	1000	641,2±45,2
2	12	2	0,6	1,0	1200	596,7±27,6
3	11	2	0,6	0,6	1200	651,7±61,8
4	8	2	0,8	0,8	1200	677,5±78,4
5	5	2	0,4	0,8	800	638,6±33,0
6	13	0	0,6	0,8	1000	585,3±21,7
7	4	2	0,8	1,0	1000	592,9±28,1
8	10	2	0,6	1,0	800	608,3±18,6
9	2	2	0,8	0,6	1000	748,4±47,6
10	7	2	0,4	0,8	1200	595,4±35,2
11	3	2	0,4	1,0	1000	666,7±37,6
12	9	2	0,6	0,6	800	666,7±51,6
13	6	2	0,8	0,8	800	661,5±35,4
14	15	0	0,6	0,8	1000	587,6±30,1
15	14	0	0,6	0,8	1000	578,9±12,3

Diante desses resultados (Tabela 19) é possível observar que os valores máximos e mínimos de DHM foram de 748,4±47,6 nm e 578,9±12,3 nm, respectivamente. Os resultados das fórmulas 6, 14 e 15 (585,3±21,7 nm, 587,6±30,1 nm e 578,9±12,3 nm) evidenciaram que as concentrações de besifloxacino, de Povacoat® e a velocidade de agitação com maiores impactos na redução do DHM foram aqueles estabelecidos no ponto central (0). No que se refere a concentração do fármaco, foi mantida a mesma concentração do produto referência (0,6% m/m), importante para garantir a concentração mínima inibitória (MIC) do antibiótico. Os valores de IP foram menores que 0,2.

Para essa otimização, a análise de variância (Tabela 19) mostrou que o modelo quadrático foi significativo (valor de p menor que 0,05; $\alpha < 0,05$) e apresentou valor não significativo para falta de ajuste (p-valor = 0,154). Todas as variáveis apresentaram os termos quadráticos significativos: besifloxacino*besifloxacino, povacoat*povacoat, velocidade*velocidade. Além disso, foram observadas interações entre besifloxacino e povacoat e besifloxacino e velocidade de agitação. A interação entre o besifloxacino e o povacoat resultou na redução do tamanho de partícula, enquanto que a interação entre o besifloxacino e a velocidade de agitação favoreceu o seu aumento (Eq. 1). Adicionalmente, os resultados revelaram que os termos quadráticos influenciam no aumento do DHM. Essas influências também estão apresentadas nos gráficos de contorno e de superfície de DHM (Figura 15 e Figura 16).

Tabela 20 - Análise de variância para testar a significância dos termos obtidos para a variação de DHM de partícula das preparações de nanocristal de besifloxacino. As variáveis são: concentração de besifloxacino (% m/m), concentração de Povacoat® (% m/m) e velocidade (rpm).

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	30471,9	3808,99	45,16	0,0001
Linear	3	9902,4	3300,82	39,14	0,0001
Besifloxacino	1	2791,2	2791,17	33,09	0,001
Povacoat	1	6749,5	6749,48	80,03	0,0001
Velocidade	1	361,8	361,81	4,29	0,084
Quadrado	3	10474,4	3491,47	41,40	0,0001
Besifloxacino*Besifloxacino	1	7149,8	7149,80	84,77	0,0001
Povacoat*Povacoat	1	3688,1	3688,06	43,73	0,001
Velocidade*Velocidade	1	865,7	865,70	10,26	0,019
Interação com 2 Fatores	2	10095,0	5047,52	59,85	0,0001
Besifloxacino*Povacoat	1	9218,9	9218,88	109,30	0,0001
Besifloxacino*Velocidade	1	876,2	876,16	10,39	0,018
Erro	6	506,1	84,34		
Falta de ajuste	4	465,4	116,35	5,72	0,154
Erro puro	2	40,6	20,32	*	*
Total	14	30977,9			

GL: grau de liberdade; SQ (Aj.): soma dos quadrados ajustados; QM (Aj.): média quadrática ajustada; Valor-F: F estatístico; Valor-P: nível de significância; * valor não calculado pelo software Minitab®18.

A equação de regressão obtida para o modelo matemático do experimento está descrito na Equação 3.

Equação 3:

$$\begin{aligned}
 DHM = & 1608 - 637 \text{ Besifloxacino} - 689 \text{ Povacoat} - 1,021 \text{ Velocidade} \\
 & + 1100 \text{ Besifloxaino} * \text{Besifloxacino} + 790 \text{ Povacoat} * \text{Povacoat} \\
 & + 0,000383 \text{ Velocidade} * \text{Velocidade} - 1200 \text{ Besifloxacino} * \text{Povacoat} \\
 & + 0,370 \text{ Besifloxacino} * \text{Velocidade}
 \end{aligned}$$

Onde, DHM: diâmetro hidrodinâmico médio.

O coeficiente de determinação e o coeficiente de determinação ajustado ($R^2 = 98,37\%$ e $R^2 \text{ (Aj.)} = 96,16\%$) estão próximos, permitindo concluir que valores não significativos não foram considerados para o modelo (Tabela 21). O R-quadrado previsto indica quão bem um modelo de regressão prevê respostas para novas observações. Nesse caso, o $R^2 \text{ (prev)}$ foi de 75,85%, geralmente, valores acima de 70% indicam boa previsão.

Tabela 21 - Significância dos coeficientes de regressão codificados e índice de ajuste do modelo selecionado na avaliação DHM nanocristais de besifloxacino.

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	583,93	5,30	110,13	0,000	
Besifloxacino	18,68	3,25	5,75	0,001	1,00
Povacoat	-29,05	3,25	-8,95	0,000	1,00
Velocidade	-6,72	3,25	-2,07	0,084	1,00
Besifloxacino*Besifloxacino	44,00	4,78	9,21	0,000	1,01
Povacoat*Povacoat	31,60	4,78	6,61	0,001	1,01
Velocidade*Velocidade	15,31	4,78	3,20	0,019	1,01
Besifloxacino*Povacoat	-48,01	4,59	-10,45	0,000	1,00
Besifloxacino*Velocidade	14,80	4,59	3,22	0,018	1,00
S: 9,18% R^2 : 98,37% $R^2 \text{ (Aj.)}$: 96,16% $R^2 \text{ (prev)}$: 75,85%					

Coef: coeficiente; EP de Coef: erro padrão de coeficiente; Valor-p: nível de significância dos termos; VIF: fator de inflação da variância; S: desvio; R^2 : coeficiente de determinação; $R^2 \text{ (Aj.)}$: coeficiente de determinação ajustado; $R^2 \text{ (prev)}$: coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado.

Figura 15 - Gráfico de contorno relativo à avaliação do DHM do nanocristal de besifloxacino, cujas variáveis são: concentração de besifloxacino (% m/m), concentração de Povacoat® (% m/m) e velocidade (rpm).

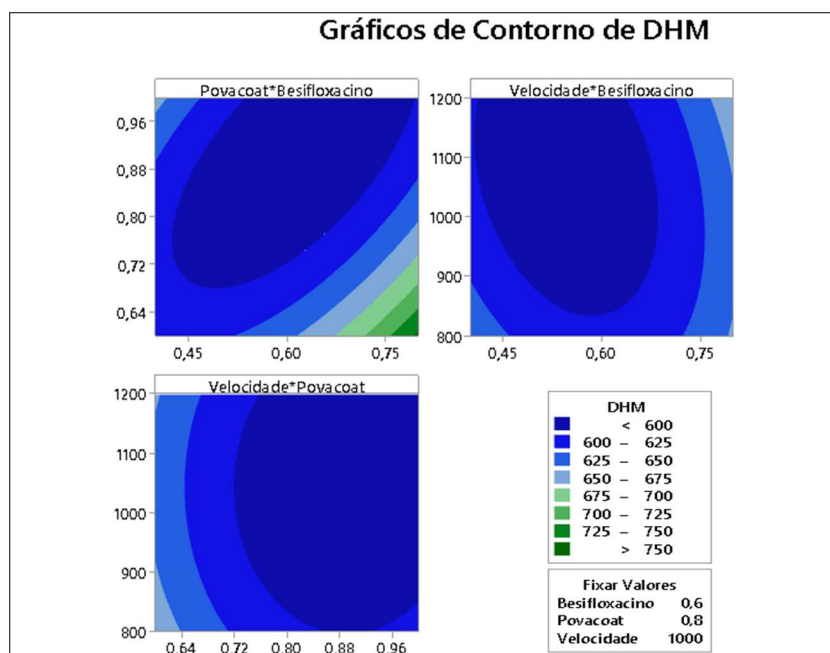
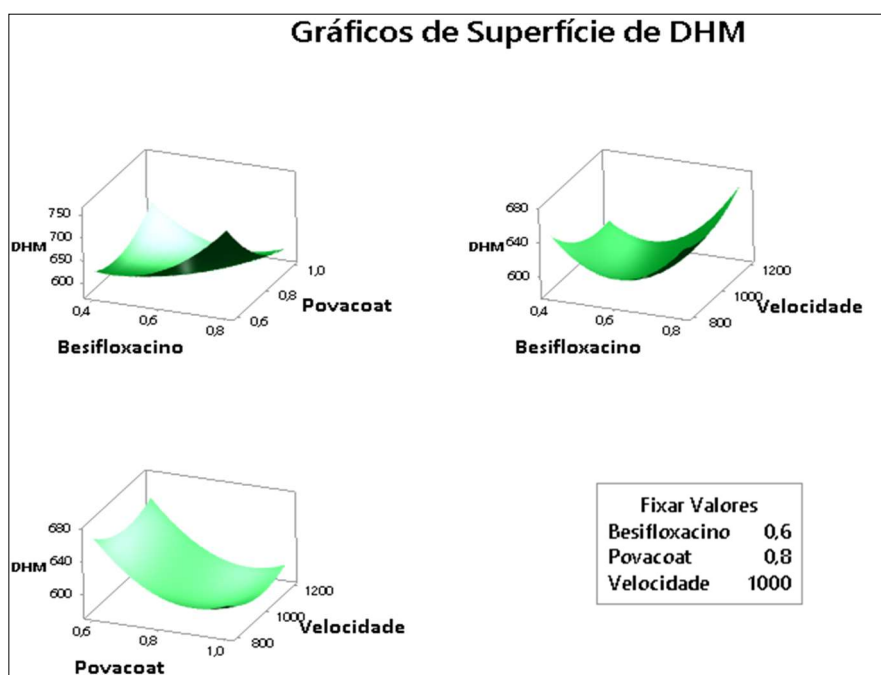
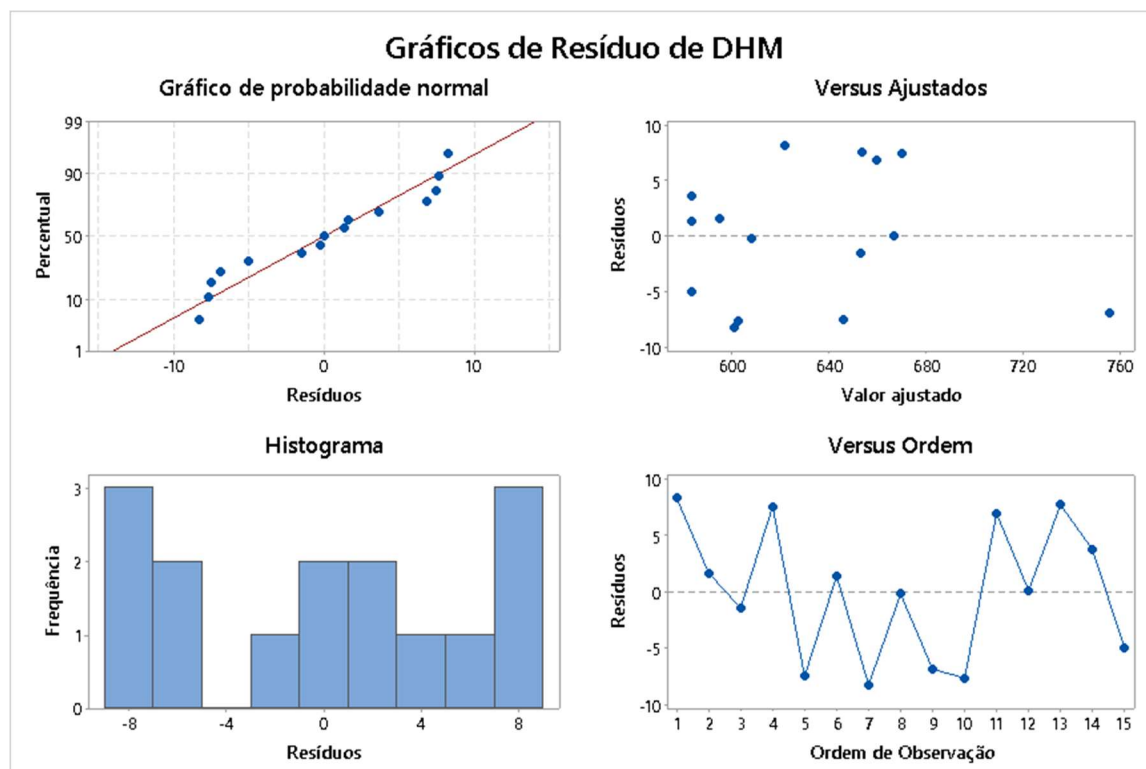


Figura 16 - Gráfico de superfície relativo à avaliação do DHM do nanocristal de besifloxacino, cujas variáveis são: concentração de besifloxacino (% m/m), concentração de Povacota® (% m/m) e velocidade (rpm).



No gráfico de probabilidade normal (Figura 17), a proximidade dos pontos na linha central indicam que provavelmente os resíduos estão distribuídos normalmente. O histograma se refere as características dos resíduos, nesse caso, a distância dos resíduos (barras) indicam que a predição de normalidade pode ter sido afetada. Essa característica pode ser observada em amostra pequena, pois, cada barra não possui pontos de dados considerável para mostrar assimetria ou *outliers*. Individualmente, os gráficos Versus ajustados e Versus Ordem evidenciam que os resíduos são independentes e os erros são casuais.

Figura 17 - Gráfico de resíduos para o modelo estatístico da formulação de nanocristal de besifloxacino 0,6% m/m com o estabilizante Povacoat®.



Sendo, DHM: Diâmetro hidrodinâmico médio.

3.6.1 Verificação do modelo estatístico de otimização da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m

Para a verificação do modelo foram preparadas duas formulações com tamanhos de partículas alvo (F1: alvo 600 nm, F2: alvo 576 nm). As formulações foram mantidas as seguintes condições: 30% de esferas de zircônio e duas barras

magnéticas, quantidade total ajustada para 10g com tampão fosfato pH 7,0. Os resultados de DHM experimental (F1 e F2) foram próximos aos valores teóricos de cada formulação, portanto, evidenciam a validade do modelo (Tabela 22).

Tabela 22 - Variáveis obtidas no desenho experimental de Box-Behnken para as preparações de nanocristal otimizadas e respectivos valores de diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) teórico e experimental.

Formulação	Besifloxacino (% m/m)	Povacoat® (% m/m)	Velocidade (rpm)	DHM teórico (nm)	EP do ajustado	DHM Experimental	IP
F1	0,6	0,8	834	600	5,18	639,9±30,3	0,101±0,056
F2	0,6	0,9	1044	576	4,97	560,3±4,2	0,098±0,067

Tendo em vista a estabilidade microbiológica da formulação, foi proposta a adição de 0,01% m/m de cloreto de benzalcônio. Esse componente é regulatoriamente aceito como conservante antimicrobiano de colírios e é utilizado em nanossuspensões (EMA, 2017; PETERS, et al., 2021). Para tanto, foi preparada a formulação alvo 576 nm (F2) com adição e sem adição desse conservante. Os resultados (Tabela 23) mostram que a adição desse conservante (0,01%) não influencia no DHM, IP e PZ da formulação. Esse resultado demonstra que mesmo sendo um componente catiônico, a concentração adicionada não influenciou nos valores de potencial zeta. Portanto, essa formulação foi considerada para as análises subsequentes: caracterização e estudos de estabilidade, visando a garantia da qualidade da nanossuspensão.

Tabela 23 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm, índice de polidispersão (IP) e Potencial Zeta (PZ) em mV obtidos para as preparações de nanocristal otimizadas (nanossuspensão 0,6% m/m), sem adição de conservante e com adição de 0,01% de cloreto de benzalcônio (conservante).

Fórmula	DHM	IP	PZ
Nanossuspensão sem adição de cloreto de benzalcônio	560,3±4,2	0,098±0,067	-10,1±0,15
Nanossuspensão com adição de 0,01% m/m de cloreto de benzalcônio	552,1±14,3	0,145±0,140	-10,2±0,10

3.7 Distribuição e tamanho das partículas da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m por espalhamento de luz dinâmica (DLS) e por difração a laser (DL)

Tendo em vista a importância do tamanho das partículas nas nanossuspensões e sendo essa uma das principais características dos produtos em escala nanométrica (FDA, 2014), é fundamental a determinação por duas técnicas distintas. Para tanto, foi preparado novo lote de nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m e analisado por difração laser (DL) e por espalhamento de luz dinâmico (DLS), sendo essa última a principal técnica, utilizada no decorrer desse estudo.

A determinação por DLS está relacionada ao movimento browniano das partículas, o qual promove espalhamento de luz laser em diferentes intensidades. Em consequência, o tamanho da partícula é determinado utilizando a relação Stokes-Einstein. Já a distribuição de tamanho de partículas por DL está relacionada a modificação da intensidade de luz espalhada em função do ângulo de espalhamento, fundamentada pela teoria de Mie (HORIBA, 2010; MALVERN, 2021).

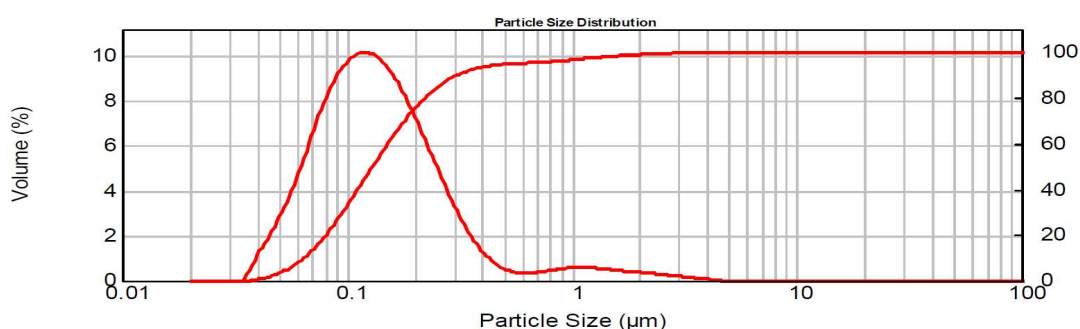
Para evitar alterações do tamanho, do índice de polidispersão e prevenir dissolução dos nanocristais de besifloxacino durante as medições, foi utilizada solução saturada do fármaco para dispersão na técnica DLS e tampão fosfato pH 7,0 para a técnica DL. Essas precauções são fundamentais para manter as características físicas dos nanocristais (MELO, et al., 2020).

A análise por DLS apresentou DHM = $531,1 \pm 2,7$ nm e IP = $0,102 \pm 0,031$, já a análise por DL apresentou D90 = $0,309$ μ m (Tabela 24), em que 95,08% das partículas apresenta tamanho $\leq 0,564$ μ m (Figura 18). Assim, a nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m apresenta tamanho da partícula aproximadamente 17 vezes menor quando comparada ao tamanho médio das partículas do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e do produto comercial (Besivance®) (aproximadamente 10 μ m). Além disso, a similaridade entre os resultados das duas técnicas (DLS e DL) evidenciaram que o processo de moagem foi adequado.

Tabela 24 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e índice de polidispersão (IP) por espalhamento de luz dinâmica (DLS) e distribuição das partículas por difração a laser (DL) da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m.

Espalhamento de Luz Dinâmica (n = 3)			
DHM		IP	
531,1±2,7 nm		0,102±0,031	
Difração a Laser (n = 3)			
D10	D50	D90	Média
0,064 µm	0,130 µm	0,309 µm	0,212 µm

Figura 18 - Distribuição das partículas da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m por difração a laser (DL).



3.8 Osmolalidade

A pressão osmótica exerce função fundamental em todos os processos biológicos nos quais ocorre difusão de solutos ou transferência de fluidos através das membranas. Essa é uma propriedade coligativa dependente do número de moles de solutos presentes na solução. Portanto, determinar o número de soluto em solução para as formulações de administração parenteral ou oftálmico é essencial e tem objetivo de prever e controlar potenciais danos aos tecidos biológicos (USP 43, 2021).

Comumente, a quantidade de moles de soluto em solução é reportada por meio da osmolaridade, a qual expressa a quantidade teórica em osmoles L (Osmol/L) de uma solução em relação ao volume. Entretanto, a osmolaridade não pode ser medida pelos métodos instrumentais, para isso, pode ser realizado cálculos teóricos a partir das medidas instrumentais de osmolalidade (USP 43, 2021).

A osmolalidade é determinada pelo número de moles de solutos por quilograma de solvente (mOsmol/kg), a partir das propriedades coligativas da solução (USP 43, 2021). Os resultados da osmolalidade da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m otimizada estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 - Resultados de osmolalidade da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m (fórmula otimizada). Para as medidas foram consideradas amostra sem adição de glicerol e a amostra com adição de glicerol (1,0% m/m).

Amostra	Osmolalidade (mOsmol/kg)	Média (mOsmol/kg)
Nanossuspensão otimizada (sem adição de glicerol)	166,0	164,3±1,5
	164,0	
	163,0	
Nanossuspensão otimizada com adição de glicerol (1,0% m/m)	304,0	303,7±0,6
	303,0	
	303,0	

De acordo com esses resultados (Tabela 25), é possível observar que a formulação otimizada sem ajuste de tonicidade tem osmolalidade abaixo do determinado pela Farmacopeia Americana. Esse compêndio estabelece que o valor padrão para solução isoosmótica é a solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, que apresenta osmolalidade de 285 mOsmol/kg e osmolaridade de 284 mOsmol/L (USP 43, 2021). Ainda, esses valores estão abaixo com relação ao produto referência (Besivance®), o qual é uma suspensão isotônica com osmolalidade de aproximadamente 290 mOsm/kg (BAUSCH & LOMB INCORPORATED, 2020; TÓTOLI; SALGADO, 2018).

Diante disso, foi proposto o ajuste da osmolalidade da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m (fórmula otimizada). Normalmente, o ajuste de osmolalidade pode ser realizado com solução de cloreto de sódio 0,9% m/m, entretanto, esse não é indicado para o ajuste das nanossuspensões, já que pode alterar o potencial zeta e desestabilizar a formulação. Para isso, foi considerado o glicerol, o qual é um agente osmótico neutro (BAZÁN HENOSTROZA, et al., 2021).

Após a adição de 1,0% (m/m) de glicerol, os resultados (Tabela 25) obtidos para a nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m ficaram próximos aos valores padrão de solução de cloreto de sódio 0,9%, conforme preconiza a Farmacopeia Americana. É importante considerar que valores entre 171 e 1711 mOsm/kg podem ser tolerados, sem desconforto ao paciente (USP 43, 2021). Além disso, esses resultados estão similares em relação aos valores declarados para o produto referência (Besivance®). Ainda, essa osmolalidade está equivalente a osmolalidade da lágrima durante o sono (280 a 293 mOsm/kg) e ao decorrer do dia (231 a 446 mOsm/kg) (TERRY, J. E.; HILL, R. M., 1978).

3.9 pH

O pH obtido para a formulação otimizada (nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m) foi de 6,52, mesmo pH do produto comercial Besivance® (pH = 6,5). Esse valor está dentro dos valores de referência da Farmacopeia Americana (USP 43, 2021), a qual estabelece que valores de pH entre 3,0 e 8,6 são toleráveis para as formulações oftálmicas. Além disso, esse resultado pode ser considerado ideal, sem promover desconforto aos pacientes, já que o pH lacrimal varia de 6,5 a 7,6, sendo o valor médio de 7,0 (Abelson et al., 1981). Ainda, esse resultado mostra que a nanossuspensão está devidamente tamponada evitando flutuações de pH, contribuindo com a sua estabilidade.

3.10 Viscosidade e densidade

A determinação da viscosidade das preparações oftálmicas não é um requisito compendial, mas, deve ser considerada para especificações dos produtos e depende da formulação proposta (USP, 43). Do ponto de vista das nanossuspensões, esse atributo é fundamental, pois o aumento da viscosidade permite melhor estabilidade do DHM das partículas, evitando agregação (*Ostwald ripening*). Além disso, o aumento da viscosidade favorece o aumento do tempo de residência do medicamento no olho, melhorando a biodisponibilidade. Entretanto, preparações com elevada viscosidade pode inibir a difusão do fármaco da formulação para o olho (USP, 43). Ainda, alta viscosidade pode aumentar o desconforto do paciente (dor e visão turva) e pode causar variabilidade de dose (SANTOS, et al., 2020). No caso do produto comercial (Besivance®) a tecnologia DuraSite™ oferece viscosidade de aproximadamente 1500 cps (BAUSCH & LOMB INCORPORATED, 2021), aumentando ainda mais esses inconvenientes.

No que se refere a nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m (formulação otimizada), apresentou densidade de 1.0081g/mL e viscosidade média de 2,40±0,01 cP. Esses valores estão dentro da faixa da viscosidade do fluído lacrimal, a qual varia de 1,05 a 5,97 cP. Além disso, preparações com viscosidade abaixo de 20 cP não causam desconforto aos pacientes (ALDRICH et al., 2013). No caso das

nanossuspensões, o aumento da área superficial do fármaco possibilita maior interação com os meios biológicos.

3.11 Quantificação do teor de besifloxacino na nanossuspensão 0,6% m/m por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O ensaio de quantificação tem o objetivo de medir o analito presente em uma determinada amostra (ICH Q2 R1, 2005). Esse, é um atributo de qualidade fundamental aplicado aos produtos farmacêuticos em escala nanométrica (FDA, 2017). Além disso, trata-se de um requisito legal para avaliação dos níveis de qualidade dos medicamentos (USP 43, 2021). Assim, foi determinado o teor do besifloxacino na nanossuspensão 0,6% m/m (fórmula otimizada).

Para essa quantificação, primeiramente foi verificado a adequabilidade do sistema cromatográfico (*system suitability*), conforme Tabela 26. Para isso, foi injetado o padrão calibração em quintuplicata para obtenção da curva de calibração. O tempo de retenção foi de 4,9 minutos, conforme validado, o coeficiente de correlação obtido (concentração x área) foi $r = 0,9934$ ($R^2 = 99,34$) e dessas replicatas foi obtido desvio padrão relativo (RSD) de 0,18%. Esses resultados encontram-se de acordo com o especificado ($\leq 2,0\%$) pela Farmacopeia Americana (USP 43, 2021) e indicam que os requisitos de precisão foram atendidos para o método.

O número de pratos teóricos indica eficiência da coluna e adequabilidade para a nitidez do pico, a qual é fundamental para a detecção dos componentes (USP 43, 2021). No que se refere ao fator resposta e ao fator de cauda indicam separação adequada com relação ao sinal analítico e a concentração do analito (ANVISA, 2017). O fator de capacidade (K') é uma indicação de quanto tempo um composto pode ser retido pela coluna, ou seja, se refere a razão do tempo de retenção para o tempo morto (*dead time*) da fase estacionária. De acordo com o manual do software Chromeleon™, o valor de K' adequado para esse sistema CLAE deve ser entre 1 e 5 (Thermo, 2005), mostrando que para essa análise esse item foi atendido adequadamente.

Tabela 26 - Avaliação da adequabilidade do sistema cromatográfico (system suitability) obtidos a partir do padrão calibração (50µg/mL) para quantificação do besifloxacino na nanossuspensão (0,6% m/m). Software Chromeleon™ versão 6.80.

	Tempo de retenção	Área mAU*min	Fator resposta	Assimetria	Pratos teóricos	Fator de capacidade (K')	Fator de cauda
	4,903	40,89969	1,22250	1,36	10249	1,77	1,43
	4,903	40,73877	1,22733	1,39	10304	1,77	1,46
	4,903	40,76167	1,22664	1,38	10249	1,77	1,45
	4,840	40,75934	1,22671	1,40	10249	1,74	1,46
	4,843	40,71097	1,22817	1,35	10282	1,74	1,42
Média	4,879	40,77409	1,22627	1,38	10267	1,76	1,44
*DPR (%)			0,17900				

*DPR: desvio padrão relativo.

No que se refere a quantificação, a fórmula otimizada apresentou teor médio de 98,24% (Tabela 27). Esse resultado indica que além do método recuperar adequadamente, conforme validado, evidencia a capacidade do processo. A determinação do teor será realizada para avaliação nos estudos de estabilidade e será considerada a faixa de 90,0 a 110,0% da concentração declarada.

Tabela 27 - Resultados da quantificação de besifloxacino na nanossuspensão otimizada (0,6% m/m), concentração teórica: 50µg/mL.

	Tempo de retenção	Área mAU*min	Concentração encontrada (µg/mL)	Média por amostra (µg/mL)	Média por amostra (%)	*DPR (%)
Amostra 1	4,833	39,8396	48,85	48,86	97,72	0,04
	4,833	39,8565	48,87			
	4,843	39,8290	48,84			
Amostra 2	4,840	40,1219	49,20	49,38	98,76	0,33
	4,840	40,3783	49,51			
	4,840	40,3142	49,44			
Média (geral)	4,832	40,0566	49,12	49,12	98,24	-
*DPR (%) (geral)						0,63

*DPR: Desvio padrão relativo.

3.12 Liofilização da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m

A liofilização da nanossuspensão foi realizada para a obtenção de amostras sólidas visando as análises de caracterização morfológica e análises térmicas. Os resultados do DHM, do IP e do PZ antes e após o processo de secagem estão apresentados na Tabela 28. O DHM da formulação após liofilização permaneceu

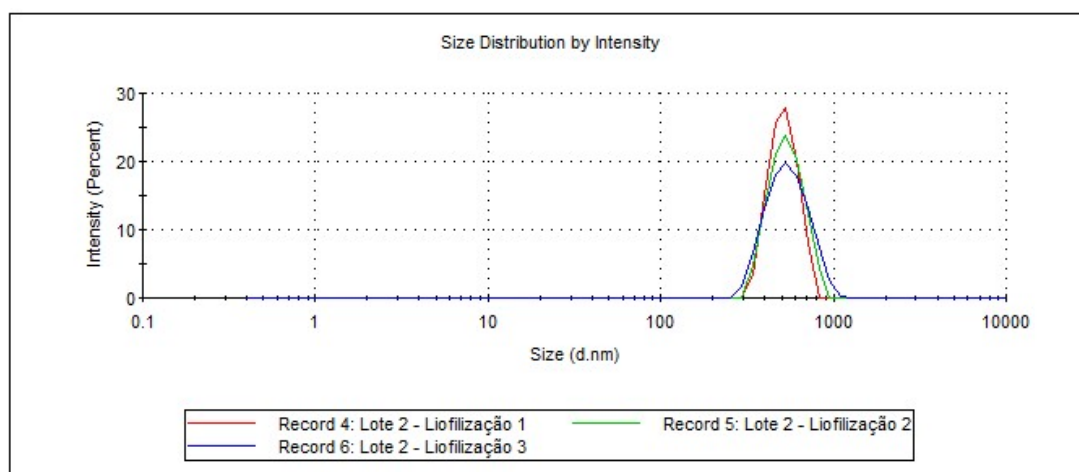
inalterado em relação ao DHM da formulação antes do processo de secagem, com distribuição monomodal (Figura 19). Além disso, não houve alteração significativa do potencial zeta e índice de polidispersão, indicando a eficiência da liofilização. Adicionalmente, foi verificado que o tempo de redispersão dos nanocristais foi rápido e sem observar agregados aparentes.

Tabela 28 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm, índice de polidispersão (IP) e Potencial Zeta (PZ) em mV, para verificar a eficiência do processo de liofilização. Fórmula otimizada (nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m).

	DHM	IP	PZ
Antes da liofilização	510,5±8,5	0,052±0,060	-9,66±0,27
Após liofilização (ressuspensão)	514,4±27,0	0,153±0,118	-8,66±0,68

Em geral, são utilizadas substâncias com funções crioprotetoras e lioprotetoras nas formulações, como por exemplo, o manitol. Esses excipientes evitam alterações nos nanocristais durante o processo de liofilização (MELO et al., 2020). Entretanto, para a nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m não foi necessária essa adição. Nesse sentido, considerando a possibilidade de liofilização do produto para uso oftálmico, tem a vantagem de menor número de substâncias adicionadas na formulação, com menor risco ao paciente.

Figura 19 - Distribuição (monomodal) do DHM das partículas da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m por espalhamento de luz dinâmica (DLS), para verificar a eficiência do processo de liofilização.



3.13 Análise térmica

Os resultados de calorimetria exploratório diferencial (DSC) (Figura 20) mostraram o perfil de temperatura térmica esperado para cada componente da formulação analisados individualmente. No que se refere ao besifloxacino (matéria-prima), não foi observado eventos térmicos na faixa de temperatura estudada, mesmo comportamento observado por Santos e colaboradores (2020). Complementarmente, as análises Termogravimétrica (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG) comprovaram perda de massa desse antibiótico após 255°C, quando todos os demais componentes da formulação também já estavam em processo de decomposição térmica (Figura 21 e Figura 22).

Para os nanocristais foi observado curva endotérmica em aproximadamente 180°C, nesse caso, essa teve deslocamento em temperatura anterior com relação a mistura (197°C). Entretanto, é possível evidenciar que essa curva está relacionada a soma dos eventos térmicos dos componentes individuais, principalmente, do Povacoat® (Figura 20). Portanto, a análise mostrou a estabilidade térmica dos nanocristais considerando que não foram observados eventos de degradação até 180°C. Além disso, a semelhança das curvas de DSC dos nanocristais e da mistura mostram que a forma cristalina foi mantida. Ainda, essa análise permite evidenciar a compatibilidade entre os componentes.

Figura 20 - Curvas DSC dos componentes da formulação, da mistura (mesma proporção da formulação) e dos nanocristais de besifloxacino.

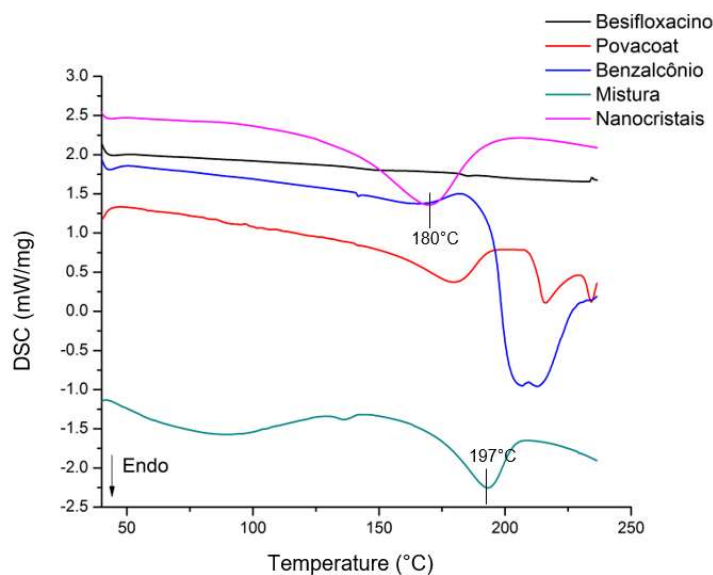


Figura 21 - Termogravimetria (TG) dos componentes da formulação, da mistura (mesma proporção da formulação) e dos nanocristais de besifloxacino.

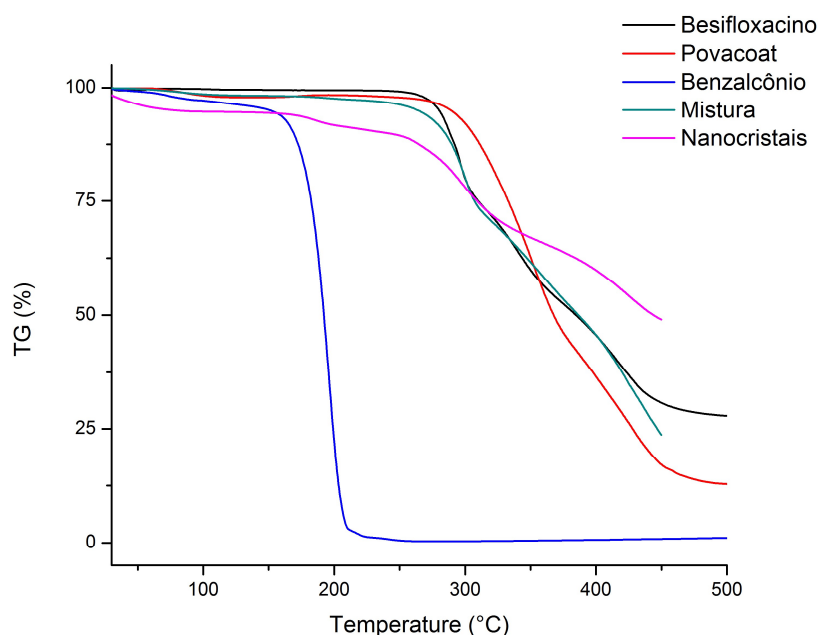
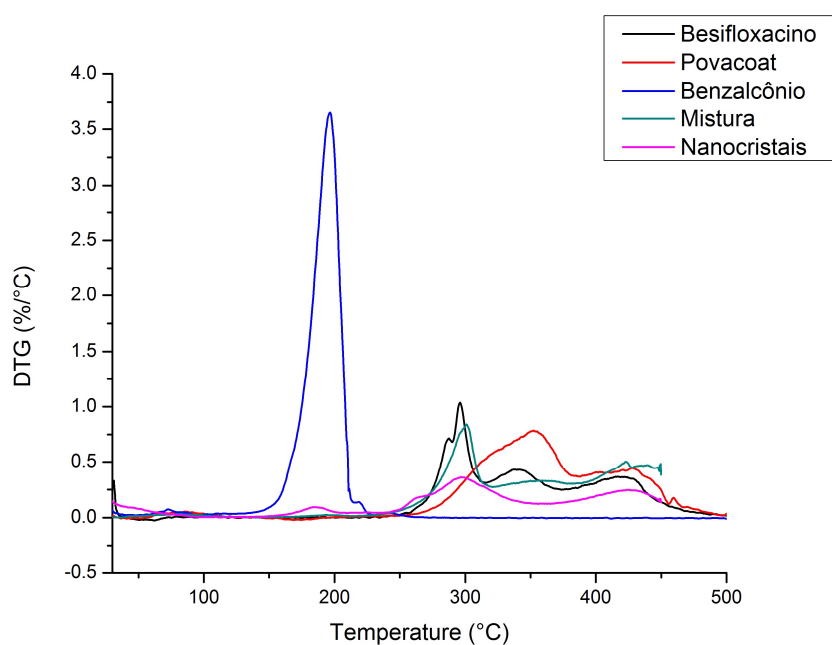


Figura 22 - Termogravimetria Derivada (TG) dos componentes da formulação, da mistura (mesma proporção da formulação) e dos nanocristais de besifloxacino.



3.14 Difração de raios-X (DRX)

De acordo com os resultados de DRX obtidos para os nanocristais (Figura 23) é possível observar os principais picos do besifloxacino nos ângulos 2θ de 10,6, 19,7 e 21,1°, permitindo garantir que a forma cristalina é predominante na formulação liofilizada. Ainda, esse resultado está conforme apresentado por King e colaboradores (2010), patente: WO 2010/111116, em que o cloridrato de besifloxacino é caracterizado por difratogramas com picos em ângulos 2θ de 10,6, 15, 19,7, 21,1 e $22^\circ \pm 0,2$.

No que se refere aos picos formados após o ângulo 2θ 30°, esses estão relacionados, principalmente, a base livre do besifloxacino que apresenta baixa solubilidade em pH 6,5, condição do processo de moagem e da nanossuspensão. Mesmas características observadas durante o processo de fabricação do produto Besivance®, onde o sal de HCl é convertido em base livre (KING, et al., 2010). Ainda, é possível que esses picos estejam relacionados a interação da base livre do fármaco com o estabilizante Povacoat® (Figura 24), para formação do nanocristal. Portanto, esses resultados permitem confirmar que a fase cristalina é predominante na nanossuspensão.

Figura 23 - Difração de raios-X do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e dos nanocristais (nanossuspensão 0,6% m/m liofilizada).

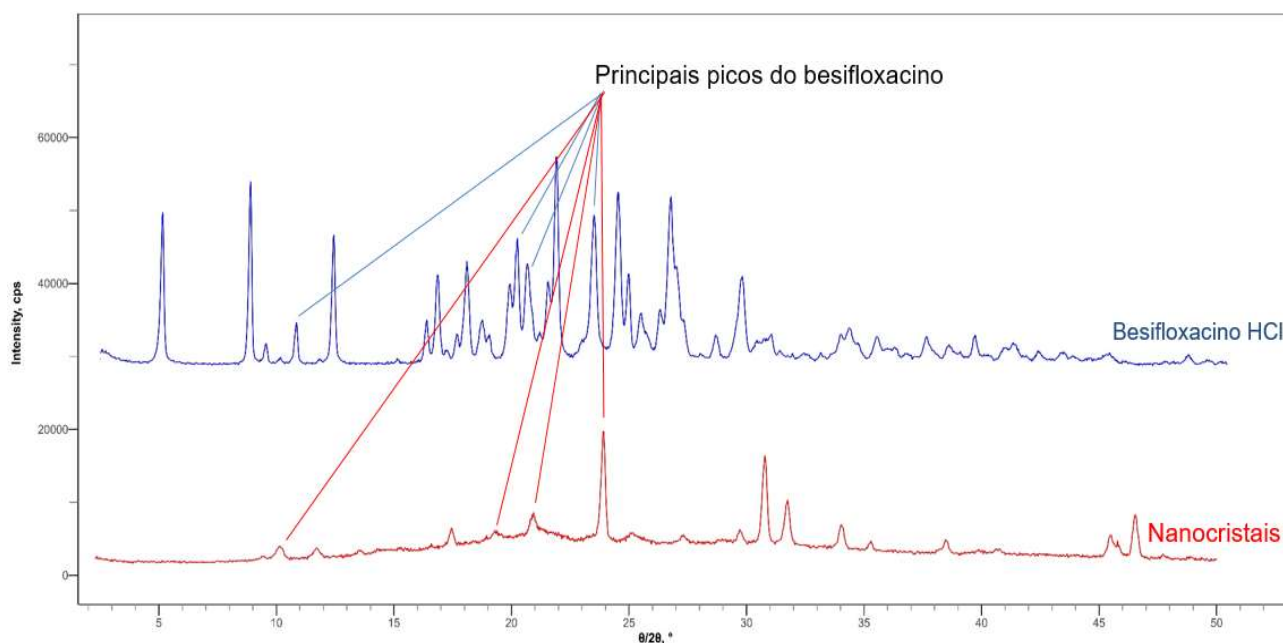
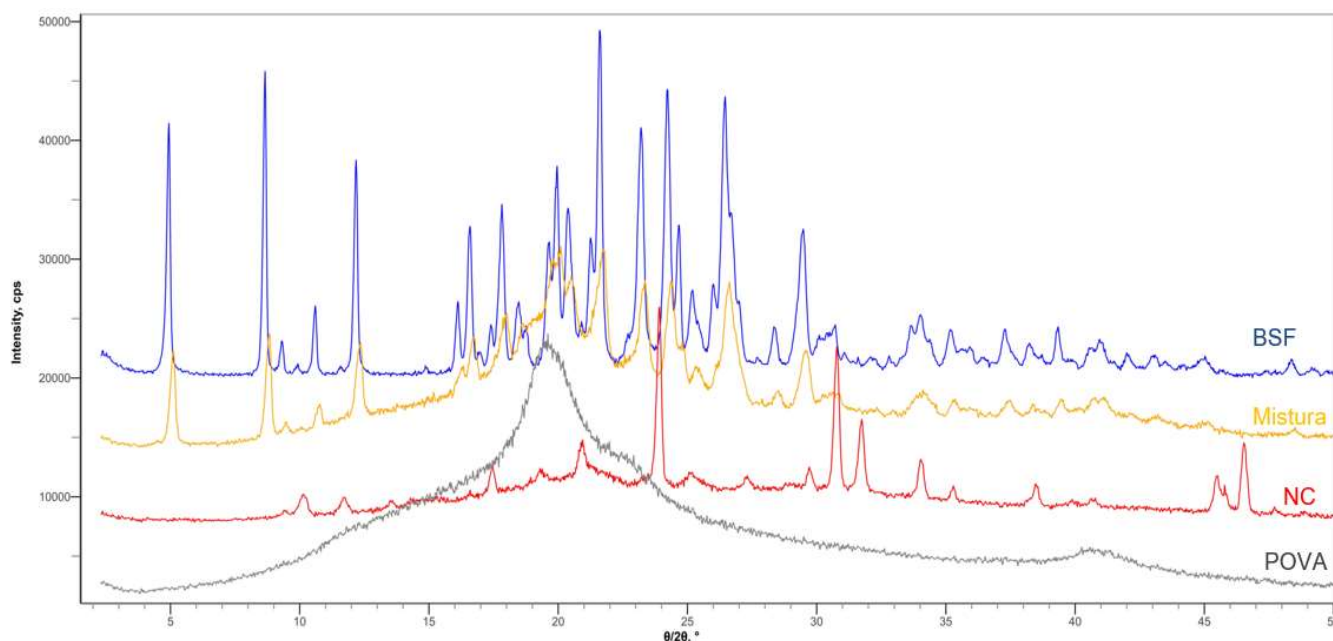


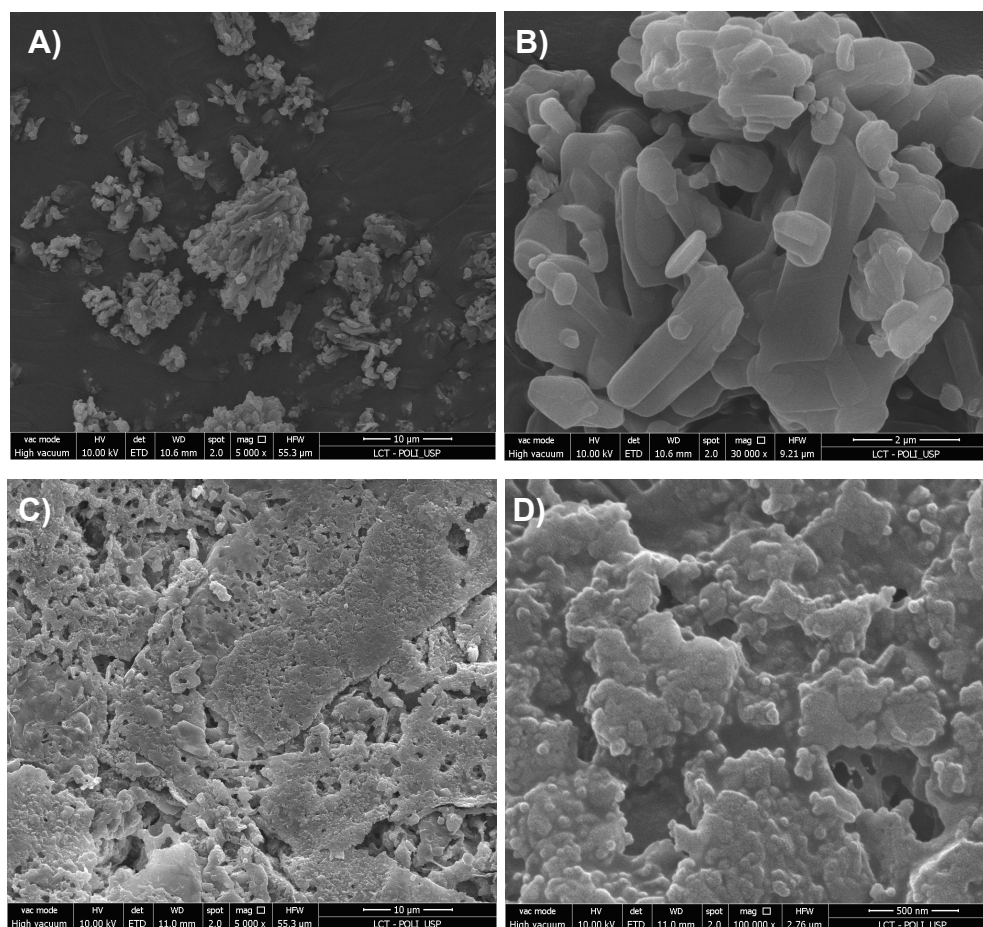
Figura 24 - Difração de raios-X do besifloxacino (BSF), da mistura dos componentes da formulação, do Povacoat® (POVA) e dos nanocristais (NC) (nanossuspensão 0,6% m/m liofilizada).



3.15 Microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Os resultados da microscopia eletrônica de varredura (MEV) apresentaram a morfologia do besifloxacino matéria-prima (Figura 25a,b) e dos nanocristais de besifloxacino (Figura 25c,d). As microfotografias mostraram alteração da forma cristalina prismática irregular (Figura 25) para forma aproximadamente esférica, após o processo de moagem. Ainda, as micrografias evidenciaram que os nanocristais estão envolvidos em uma leve camada, provavelmente, relacionada ao estabilizante Povacoat®.

Figura 25 - Microfotografia do besifloxacino matéria-prima (A, B) e dos nanocristais de besifloxacino (C, D).



3.16 Solubilidade de saturação

As análises para determinação da solubilidade de saturação foram conduzidas em quatro condições de pH (água ultrapura, tampão fosfato pH 4,0, pH 6,0 e pH 7,0), acima do mínimo determinado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2011). A concentração de besifloxacino dissolvido em cada meio foi determinada por CLAE, utilizando o método validado para quantificação e indicativo de estabilidade. Os testes foram realizados em triplicata para cada condição (Tabela 29) e apresentaram desvio padrão relativo abaixo de 1,5% para todos os meios, atendendo aos requisitos da RDC 37 (BRASIL, 2011).

A solubilidade da matéria-prima em água está de acordo com a literatura (0,143 mg/mL) (DrugBank, 2022; Chemicalize, 2020; TÓTOLI; SALGADO, 2018). Entretanto, a nanossuspensão apresentou solubilidade menor nesse meio (Tabela 29), isso se

deve a elevação do pH a neutralidade quando a nanossuspensão (tamponada em pH 7,0) é adicionada nesse meio no início dos testes, conforme observado na Tabela 30 e Figura 27. Em tampão pH 4,0 os resultados para matéria-prima e nanossuspensão foram próximos, sendo que a nanossuspensão apresentou resultados relativamente maiores.

A Figura 26 mostra os resultados da solubilidade de saturação do cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e da nanossuspensão. No que se refere ao tempo de incubação, não foram observadas alterações significativas após 24 e 48h. Os nanocristais aumentaram a solubilidade em aproximadamente duas vezes em tampão fosfato pH 6,8 e pH 7,0, com relação a matéria-prima. É importante ressaltar, que essa é a faixa de pH do Besivance®, produto referência (TGA, 2014). Além disso, essa é a faixa de pH ideal para formulações oftálmicas, considerando o pH lacrimal (ABELSON et al., 1981).

Portanto, a obtenção dos nanocristais estabilizados com o Povacoat® permitiu aumento da solubilidade do besifloxacino em pH 6,8 e pH 7,0. Essa característica permite aumentar a biodisponibilidade da formulação oftálmica em relação ao fármaco na escala micrométrica (BARBOSA et al., 2016; CHEN et al., 2017; DAVIS et al., 2018; MELO et al., TYNER et al., 2017).

Tabela 29 - Concentrações obtidas para avaliação da solubilidade de saturação do besifloxacino (matéria-prima) e da nanossuspensão (besifloxacino 0,6% m/m).
Condição: 37 ± 1 °C à 150 RPM. Concentração teórica analisada 50 µg/mL. N = 3.

Meio	Besifloxacino (MP)						Nanossuspensão					
	µg/mL	24h Média (µg/mL)	DPR%	µg/mL	48h Média (µg/mL)	DPR%	µg/mL	24h Média (µg/mL)	DPR%	µg/mL	48h Média (µg/mL)	DPR%
Água	52,02 51,92 52,09	52,01	0,17	52,06 52,20 52,24	52,17	0,18	11,10 11,16 11,07	11,11	0,43	9,08 9,06 9,07	9,07	0,13
TF pH 4,0	50,46 50,83 50,10	50,46	0,72	50,73 50,16 51,07	50,65	0,91	51,40 51,19 50,79	51,12	0,71	51,45 51,60 51,46	51,50	0,19
TF pH 6,8	6,17 6,18 6,12	6,16	0,52	5,57 5,56 5,52	5,55	0,44	9,91 9,84 9,88	9,84	0,35	9,74 9,71 9,65	9,70	0,47
TF pH 7,0	6,06 6,09 6,10	6,08	0,32	4,82 4,87 4,85	4,85	0,45	9,88 9,90 9,93	9,90	0,25	9,55 9,58 9,54	9,56	0,25

DPR%: Desvio padrão relativo; TF: Tampão fosfato; MP: Matéria-prima.

Figura 26 - Solubilidade de saturação do besifloxacinio (matéria-prima) e da nanossuspensão (besifloxacinio 0,6% m/m). A) Solubilidade após 24 horas de incubação. B) Solubilidade após 48h de incubação.

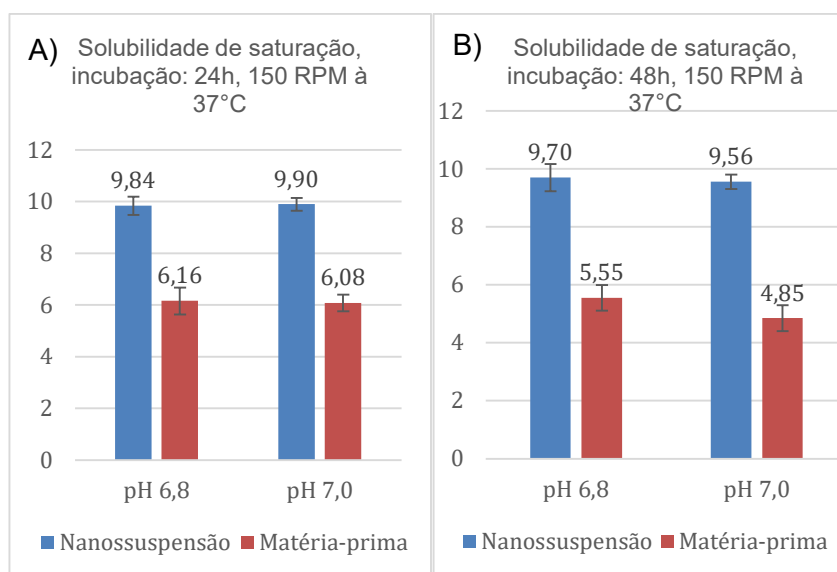


Figura 27 - pH das amostras ao final da incubação (período 48h, 150 RPM à 37 ± 1 °C) para a determinação da solubilidade de saturação. N = 3.

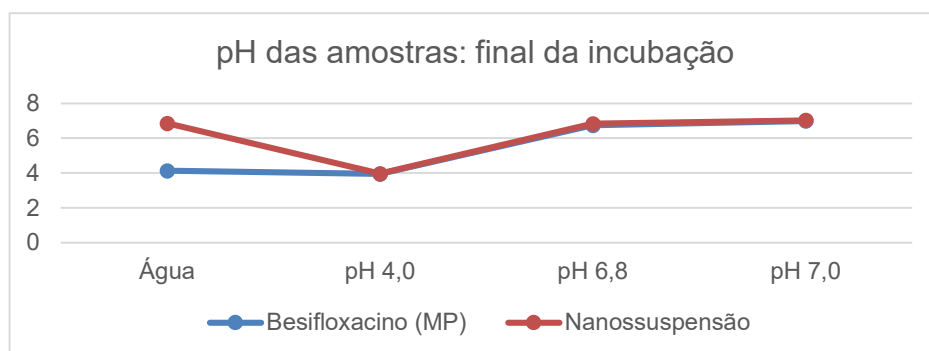


Tabela 30 - pH inicial e final (após 48h) das amostras durante a avaliação da solubilidade de saturação do besifloxacinio (matéria-prima) e da nanossuspensão (besifloxacinio 0,6% m/m). Condição: 37 ± 1 °C à 150 RPM. N = 3.

Meio	Besifloxacinio (matéria-prima)		Nanossuspensão	
	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final
Água	4,14±0,03	4,13±0,02	6,97±0,02	6,84±0,02
TF pH 4,0	3,93±0,02	3,95±0,03	3,95±0,01	3,97±0,02
TF pH 6,8	6,76±0,01	6,73±0,05	6,81±0,01	6,83±0,01
TF pH 7,0	6,96±0,04	6,99±0,01	6,99±0,01	7,02±0,01

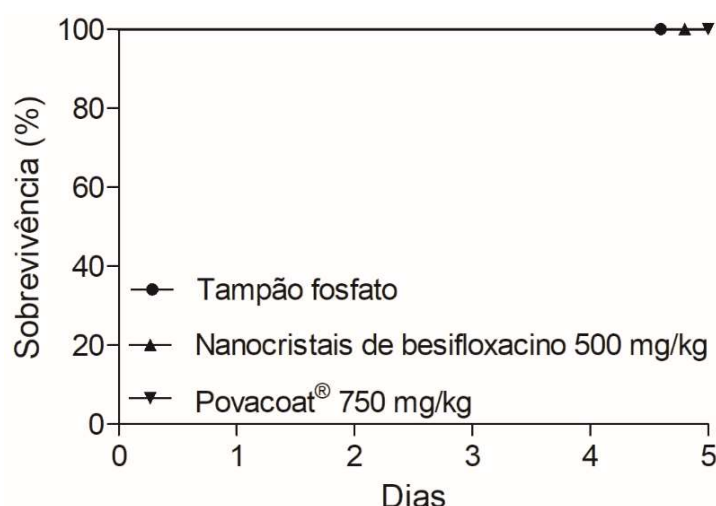
TF: Tampão Fosfato.

1.1 Toxicidade da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m em larvas da *Galleria mellonella*

A toxicidade do besifloxacino em suspensão oftálmica 0,6% m/m é baixa, pois, a sua exposição sistêmica é mínima (COMSTOCK, et al., 2010; COSTA, et al., 2014; PROKSCH, et al., 2009). Para avaliação da toxicidade dos nanocristais de besifloxacino (nanossuspensão 0,6% m/m) foi utilizado o modelo *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella*. Esse modelo vem sendo utilizado como procedimento de triagem para estudos de toxicidade, em alternativa a utilização de mamíferos (BASTIANI, F. W. M. S, 2018; PIATEK, et al., 2021; SPADARI et al., 2019).

Para tanto, larvas de *Galleria mellonella* (n=16) submetidas à injeção da dose máxima da formulação dos nanocristais de besifloxacino ou Povacoat® e o grupo tampão fosfato como controle do veículo foram incubados a 37°C e observados diariamente por 5 dias para a construção da curva de sobrevivência (Figura 28). Portanto, a nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m (nanocristais) na dose máxima (500 mg/kg) e o estabilizante Povacoat® (750 mg/kg) não apresentaram toxicidade nas larvas de *G. mellonella*. Todos os grupos apresentaram 100% de sobrevivência ao final do experimento (Figura 28).

Figura 28 - Toxicidade dos nanocristais de besifloxacino (500 mg/kg) e Povacoat® (750 mg/kg) em modelo larvário de *Galleria mellonella*.



1.2 Concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m

Os valores da CIM foram determinados em função da presença/ausência de crescimento microbiano para os tubos de ensaio contendo as diluições seriadas (0,125 a 60 µg/mL). A CIM para o cloridrato de besifloxacino (matéria-prima) e para a nanossuspensão frente a *Pseudomonas aeruginosa* foi de 1,60 µg/mL. Frente a cepa de *Staphylococcus aureus*, os resultados da CIM para o besifloxacino (matéria-prima) e para a nanossuspensão foram de 0,0958 e 0,0960 µg/mL, respectivamente. Esses resultados são similares aqueles observados nas análises preliminares da matéria-prima e do produto referência (item 3.3). Além disso, estão de acordo com os valores reportados por HAAS e colaboradores (2009).

1.3 Estudos de estabilidade da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m

Os estudos de estabilidade foram realizados com objetivo de avaliar possíveis alterações físico-químicas da nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m no decorrer do tempo. Quanto ao aspecto, foi realizada avaliação das amostras em cada tempo dos estudos, com todos os resultados “de acordo”, indicando homogeneidade, sem alteração da coloração, do odor, separação das fases e/ou sedimentação significativa nas amostras. Em cada tempo foi visualizado pequeno sedimento de aproximadamente 1mm de espessura no fundo dos frascos, esse sedimento se desfaz, por meio de homogeneização manual.

Para o estudo de estabilidade acelerado (Tabela 31), foi observado aumento do DHM acima de 50 nm entre a análise inicial (tempo 0) e 30 dias, para os três lotes. Por isso, a análise de variância (ANOVA) apresentou alteração estatisticamente significativa (valor-p = 0,00033) para o período avaliado. Tal resultado pode estar relacionado ao pequeno sedimento (≈1mm de espessura) observado na análise visual. Entretanto, para as análises dos períodos posteriores, foi observado estabilidade do DHM, sendo que entre 30 e 90 dias não foi observada diferença estatisticamente significativa (valor-p = 0,93582).

Adicionalmente, foi observada distribuição monomodal (Figura 31) após 90 dias de incubação, com índice de polidispersão (IP) ≤ 0,2, sem alteração estatisticamente

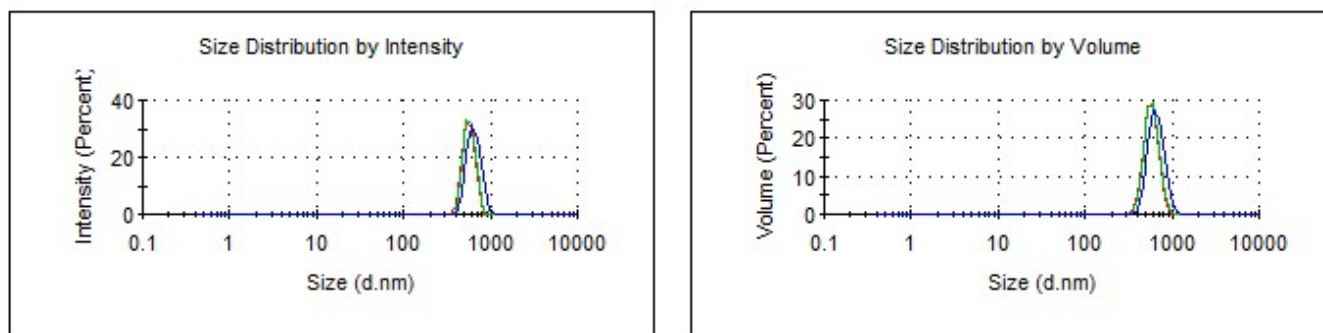
significativa (valor-p = 0,22239). Similarmente, não foram observadas alterações significativas do pH (valor-p = 0,78369) e do potencial zeta (valor-p = 0,18212) no período avaliado. Os resultados de PZ obtidos durante a estabilidade acelerada (Tabela 31) foram os esperados, pois o fármaco possui carga neutra em pH 7,0 e o Povacoat® permite estabilidade estérica (YUMINOKI et al., 2014, 2016). No que se refere a concentração do besifloxacino, foi determinado o teor no tempo 0 e no final do estudo (90 dias). Os resultados (Tabela 31) evidenciaram estabilidade do conteúdo do fármaco no período do estudo.

Tabela 31 - Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm, índice de polidispersão (IP), Potencial Zeta (PZ) em mV, teor e pH, para estudo de estabilidade acelerado da formulação otimizada (nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m), nos intervalos de tempo: T0, 30, 60 e 90 dias. Condição do estudo: 40°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR.

Lote	Intervalo de tempo	Aspecto	DHM	IP	PZ	pH	Teor (µg/mL)	Teor (%)*
1	Tempo 0	De acordo	528,1±33,4	0,103±0,080	-10,30±0,45	6,52±0,01	48,69±0,20	97,38
	30 dias	De acordo	583,7±53,4	0,216±0,200	-10,20±0,50	6,52±0,01	-	-
	60 dias	De acordo	572,3±42,1	0,200±0,188	-10,11±0,87	6,52±0,01	-	-
	90 dias	De acordo	582,3±32,1	0,202±0,108	-10,10±0,90	6,52±0,01	50,81±0,17	101,62
2	Tempo 0	De acordo	510,3±31,6	0,086±0,071	-10,30±1,11	6,49±0,01	47,54±0,23	97,08
	30 dias	De acordo	605,2±41,6	0,091±0,026	-10,20±0,50	6,50±0,01	-	-
	60 dias	De acordo	608,6±65,9	0,172±0,133	-10,30±0,40	6,50±0,01	-	-
	90 dias	De acordo	608,0±60,9	0,182±0,123	-10,30±0,40	6,50±0,01	50,36±0,07	100,72
3	Tempo 0	De acordo	518,6±22,5	0,175±0,105	-10,37±0,14	6,48±0,01	48,38±0,34	96,76
	30 dias	De acordo	597,2±54,5	0,152±0,100	-10,20±1,25	6,50±0,00	-	-
	60 dias	De Acordo	606,2±47,7	0,194±0,115	-10,10±0,40	6,50±0,01	-	-
	90 dias	De acordo	608,6±65,9	0,172±0,093	-10,30±0,40	6,50±0,01	50,36±0,07	100,72

*(%): Porcentagem recuperada da solução amostra com concentração teórica de 50 µg/mL; (-): Não determinado.

Figura 29 - Distribuição das partículas (monomodal), estabilidade acelerado: 90 dias. Condição do estudo: $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$.



Com referência à estabilidade na condição $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $60\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$, o DHM das partículas teve aumento mais acentuado após os dois primeiros meses de incubação (Tabela 32). Assim, a análise de variância para o período apresentou alteração significativa (valor-p = 0,00001), entretanto, nos três últimos meses do estudo houve manutenção da estabilidade do DHM. A distribuição das partículas foi monomodal, apresentando índice de polidispersão (IP) menor que 0,2, sem alteração estatisticamente significativa (valor-p = 0,57943). Similarmente, o potencial zeta (PZ) e o pH não tiveram mudanças estatisticamente significativas, apresentando valor-p de 0,53062 e de 0,07232, respectivamente. Adicionalmente, o teor do besifloxacino foi mantido após os 5 meses, evidenciando que houve a manutenção do fármaco na condição avaliada.

Tabela 32 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) em nm, índice de polidispersão (IP), Potencial Zeta (PZ) em mV, teor e pH, para estudo de estabilidade da formulação otimizada (nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m), nos intervalos de tempo: T0, 30, 60, 90 e 150 dias. Condição do estudo: $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $60\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$.

Lote	Intervalo de tempo	Aspecto	DHM	IP	PZ	pH	Teor ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)*
1	Tempo 0	De acordo	552,1 $\pm$ 14,3	0,145 $\pm$ 0,140	-10,20 $\pm$ 0,10	6,52 $\pm$ 0,00	49,51	99,02
	30 dias	De acordo	603,0 $\pm$ 14,1	0,105 $\pm$ 0,038	-9,60 $\pm$ 0,47	6,50 $\pm$ 0,00	-	-
	60 dias	De acordo	631,5 $\pm$ 24,0	0,075 $\pm$ 0,040	-9,23 $\pm$ 0,78	6,50 $\pm$ 0,01	-	-
	90 dias	De acordo	683,0 $\pm$ 10,3	0,140 $\pm$ 0,017	-9,47 $\pm$ 0,32	6,51 $\pm$ 0,00	-	-
	150 dias	De acordo	675,6 $\pm$ 36,8	0,074 $\pm$ 0,064	-10,7 $\pm$ 0,99	6,50 $\pm$ 0,00	50,89	101,78

Continua

Continuação

Lote	Intervalo de tempo	Aspecto	DHM	IP	PZ	pH	Teor (µg/mL)	Teor (%)*
2	Tempo 0	De acordo	544,5±19,3	0,069±0,003	-10,20±1,68	6,52±0,01	49,34	98,68
	30 dias	De acordo	597,4±23,1	0,064±0,065	-9,61±0,45	6,50±0,00	-	-
	60 dias	De acordo	643,4±23,5	0,089±0,056	-9,60±0,74	6,51±0,00	-	-
	90 dias	De acordo	672,2±20,7	0,157±0,063	-9,75±0,94	6,50±0,01	-	-
	150 dias	De acordo	675,3±33,5	0,122±0,097	10,30±0,71	6,51±0,00	49,76	99,52
3	Tempo 0	De acordo	557,5±9,5	0,112±0,039	-10,50±0,42	6,51±0,01	49,82	99,64
	30 dias	De acordo	596,2±38,7	0,077±0,041	-10,0±0,62	6,51±0,00	-	-
	60 dias	De acordo	646,3±37,4	0,064±0,050	-9,50±0,31	6,51±0,00	-	-
	90 dias	De acordo	682,5±24,9	0,047±0,026	-9,80±0,91	6,50±0,00	-	-
	150 dias	De acordo	692,6±34,5	0,146±0,051	-10,10±0,50	6,50±0,00	51,77	103,54

*(%): Porcentagem recuperada da solução amostra com concentração teórica de 50 µg/mL; (-): Não determinado.

Diante desses resultados, foi observado que o Povacoat® permite estabilização estérica da formulação, sem influenciar nos valores de PZ, isso devido ao seu alto peso molecular (40.000). Além disso, a distribuição das partículas é homogêneo com baixo índice de polidispersão (<0,2). As análises de teor do besifloxacino evidenciaram que não houve redução do teor do fármaco mesmo à 40°C (estabilidade acelerado), fundamental para garantir a eficácia do antibiótico.

Com relação ao DHM, embora tenha se observado aumento nos períodos avaliados, os resultados permitem garantir que o Povacoat® previne a agregação. É importante considerar que a formulação é composta apenas pelo estabilizante Povacoat®. Portanto, sua estabilidade pode ser melhorada aumentando a viscosidade, com adição de derivados da celulose, tais como: hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e carboximetilcelulose (CMC). Além disso, pode-se aumentar o impedimento estérico da formulação, por meio da adição dos conservantes quartenários de amônio, tais como: cloreto de benzalcônio e cloreto de cetilpiridínio, nas concentrações permitidas para uso oftálmico. Adicionalmente, deve-se avaliar o material de embalagem adequado para formulação, sendo o principal alvo frascos de polietileno de alta densidade (PEAD).

2. CONCLUSÃO

O método de moagem via úmida em escala reduzida permitiu a obtenção, com sucesso, de nanocristais de besifloxacino (0,6% m/m). O processo dependeu de diferentes fatores inerentes ao método e ao fármaco, tais como velocidade de agitação, concentração do fármaco, seleção adequada do tipo de estabilizante e sua concentração na formulação.

O estabilizante Povacoat® mostrou capacidade de estabilização e na redução do tamanho de partícula do cloridrato de besifloxacino. Dessa maneira, esse estabilizante foi selecionado para o desenvolvimento de nanocristais desse fármaco. Nesse sentido a redução do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) da partícula foi de aproximadamente 550 nm, cerca de 17 vezes menor que a matéria-prima na escala micrométrica. Essa redução de tamanho permitiu aumentar a solubilidade de saturação em aproximadamente duas vezes em relação a matéria-prima.

A nanossuspensão de besifloxacino 0,6% m/m (nanocristais) na dose máxima (500 mg/kg) e o estabilizante Povacoat® (750 mg/kg) não apresentaram toxicidade em larvas de *G. mellonella*. Adicionalmente, a concentração inibitória mínima (CIM) para a formulação foi de 0,0960 µg/mL e 1,60 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente, confirmando eficácia *in vitro*.

Além disso, foi validado o método para quantificação do besifloxacino por CLAE, esse foi utilizado para determinar a concentração do fármaco nos estudos de estabilidade acelerado (90 dias) (40°C±2°C/75%UR±5%UR) e estudo de estabilidade de acompanhamento (150 dias) (25°C ± 2°C / 60% UR ± 5% UR), os quais evidenciaram a estabilidade do conteúdo do fármaco no período avaliado. Os demais atributos críticos de qualidade (PZ, pH, IP e DHM) também foram satisfatórios. O estudo também permitiu evidenciar a oportunidade de melhorar a estabilidade da preparação por meio da adição de agentes viscoelásticos que permitam aumentar o impedimento estérico da formulação.

Portanto, esse estudo permitiu a obtenção de formulação inovadora, com resultados que permitem categorizar a possibilidade de obtenção de produto capaz de superar os desafios impostos pela baixa solubilidade do fármaco, aumentando a eficácia e segurança (biodisponibilidade) aos pacientes.

3. PERSPECTIVAS

Como perspectiva, pretende-se realizar novos estudos de estabilidade com adição de polímeros derivados de celulose, utilizando frascos de polietileno de alta densidade (PEAD). Além disso, pretende-se conduzir estudos de toxicidade e eficácia *in vivo* em modelo animal (cães/gatos), assim como transferência de tecnologia para escala industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELSON, M. B.; UDELL, I. J.; WESTON, J. H. Normal human tear ph by direct measurement. **Archives of Ophthalmology**, 1981.

ACHOURI, D., ALHANOUT, K., PICCERELLE, P., & ANDRIEU, V. Recent advances in ocular drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 2013.

ALDRICH, S. D. et al. Ophthalmic Preparations. **STIMULI TO THE REVISION PROCESS**, v.3, n.4, 2013.

ALFONSO, S. A.; FAWLEY, J. D.; LU, X. A. Conjunctivitis Primary Care - **Clinics in Office Practice**, 2015.

ALI, H. S. M. et al. Hydrocortisone nanosuspensions for ophthalmic delivery: A comparative study between microfluidic nanoprecipitation and wet milling. **Journal of Controlled Release**, 2011.

AMERICAN OPTOMETRIC ASSOCIATION. **Conjunctivitis**. Disponível em: <<https://www.aoa.org/patients-and-public/eye-and-vision-problems/glossary-of-eye-and-vision-conditions/conjunctivitis>>. Acesso em: 09 fev. 2022.

ASBELL, P. A.; PANDIT, R.T; SANFILIPPO, C. M. Antibiotic resistance among ocular pathogens in the United States five-year results from the Antibiotic Resistance Monitoring in Ocular Microorganisms (ARMOR) surveillance study. **JAMA Ophthalmology**, 2018.

ASBELL, P. A.; SANFILIPPO C. M. Antibiotic resistance trends among ocular pathogens in the US — cumulative results from the antibiotic resistance monitoring in ocular microorganisms (ARMOR) surveillance study. **US Ophthalmic Rev.**, 2017.

AZARI, A. A.; BARNEY, N. P. Conjunctivitis: A Systematic Review of Diagnosis and Treatment. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, 2013.

BABA, K.; NISHIDA, K.; HASHIDA, N., inventors; Osaka University, assignee. Method for producing an aqueous dispersion of drug nanoparticles and use thereof. **Osaka, US 20150087624**, 2015.

BARBOSA, S. F. et al. Physical–chemical properties of furosemide nanocrystals developed using rotation revolution mixer. **Pharmaceutical Development and Technology**, 2016.

BAZÁN HENOSTROZA, M. A. et al. Cationic rifampicin nanoemulsion for the treatment of ocular tuberculosis. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 597, 2020.

BASTIANI, Fernanda Walt Mendes da Silva de. Sistemas de liberação para anfotericina B e miltefosina no tratamento das candidíases. 2018. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. doi:10.11606/D.42.2019.tde-28012019-153532. Acesso em: 2022-03-24.

BAUSCH & LOMB INCORPORATED. **Bula**. Disponível em: http://www.bausch.com.br/fileadmin/media/documents/Bulas/BESIVANCE_BULA_PROFISSIONAL_DE_SAUDE.pdf. Acesso em: 20 abr. 2020.

BAUSCH & LOMB INCORPORATED. **Material Safety Data Sheet**. Disponível em: <https://s3-us-west-2.amazonaws.com/drugbank/msds/DB06771.pdf?1365982762>. Acesso em: 26 out. 2021.

BHATNAGAR, S. et al. Corneal delivery of besifloxacin using rapidly dissolving polymeric microneedles. **Drug Delivery and Translational Research**, 2017.

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

BOLES, M. A.; LING, D.; HYEON, T.; TALAPIN, D.V. The surface science of nanocrystals. **Nature Materials**, v.15, p.141-153, 2016.

BRASIL. RDC N. 166, de 25 de julho de 2017. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2017.

BRASIL. RDC N. 37, de 3 de agosto de 2011. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2011.

BRASIL. Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/propriedades4.htm. Acesso em 10 mar. 2022.

CHEMICALIZE. Instant Cheminformatics Solutions. Disponível em: <https://chemicalize.com/app/calculation/POVACOAT>. Acesso em 16 jul. 2020.

CHEMICALIZE. Instant Cheminformatics Solutions. Disponível em: <https://chemicalize.com/app/calculation/besifloxacin hydrochloride>. Acesso em 21 jun. 2020.

CHEN, M.-L. et al. Development Considerations for Nanocrystal Drug Products. **The AAPS Journal**, 2017.

COMSTOCK, T. L. et al. Besifloxacin: a novel anti-infective for the treatment of bacterial conjunctivitis. **Clin Ophthalmol**, 2010.

COSTA, M. C. N. et al. Quantitative evaluation of besifloxacin ophthalmic suspension by HPLC, application to bioassay method and cytotoxicity studies. **Talanta**, 2014.

DAVIS, B. M. et al. Topical Curcumin Nanocarriers are Neuroprotective in Eye Disease. **Scientific Reports**, 2018.

DRUGBANK. Besifloxacin. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06771>. Acesso em: 01 jan. 2022.

COMPRI, J. C. Z. et al. Highly Water-Soluble Orotic Acid Nanocrystals Produced by High-Energy Milling. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 5, 2019.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Questions and answers on benzalkonium chloride used as an excipient in medicinal products for human use. **Ema/Chmp/704195/2013**, v. 44, n. 828, 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **BESIVANCE. Highlights of prescribing information.** Disponível em:

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/022308s013lbl.pdf.

Acesso em: 25 mai. 2020.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. **Biotechnology Law Report**, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Draft Guidance for Industry Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials. 2017. Disponível em:<<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM588857.pdf>>. Acesso em: 25 mai. 2021.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **J Infect Public Health**, 2017.

GAO, L. et al. Drug nanocrystals: In vivo performances. **Journal of Controlled Release**, 2012.

GUPTA, S.; SAMANTA, M. K.; RAICHUR, A. M. Dual-Drug Delivery System Based on In Situ Gel-Forming Nanosuspension of Forskolin to Enhance Antiglaucoma Efficacy. **AAPS PharmSciTech**, 2010.

HAAS, W. et al. Besifloxacin, a Novel Fluoroquinolone, Has Broad-Spectrum In Vitro Activity against Aerobic and Anaerobic Bacteria. **J Antimicrob Chemother**, 2009.

HAAS, W. et al. Bactericidal activity of besifloxacin against staphylococci, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. **J Antimicrob Chemother**, 2010.

HONG, J. et al. Ambient air pollution, weather changes, and outpatient visits for allergic conjunctivitis: A retrospective registry study. **Scientific Reports**, 2016.

HORIBA. A Guidebook to Particle Size Analysis, 2010. Disponível em: <https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Products/Scientific/Particle_Characterization/Particle_Guidebook_06-2021.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2021.

HUGHES, B. 2009 FDA drug approvals. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2010.

ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. **International Conference on Harmonization**, 2005.

JENKINS, S. G.; SCHUETZ, A. N. Current concepts in laboratory testing to guide antimicrobial therapy. **Mayo Clinic Proceedings**, 2012.

KHIMDAS, S.; VISSCHER, K. L.; HUTNIK, C. M. L. Besifloxacin ophthalmic suspension: emerging evidence of its therapeutic value in bacterial conjunctivitis. **Ophthalmology and eye diseases**, 2011.

KIM, J. H. et al. Development of a novel ophthalmic ciclosporin A-loaded nanosuspension using top-down media milling methods. **Pharmazie**, 2011.

KING, Jr. **Fluoroquinolone carboxylic acid molecular crystals**. Depositante: **Bausch & Lomb Incorporated**. WO 2010/111116 Al. Depósito: 18 mar. 2010. Concessão: 30 set. 2010. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US8481526B2/en>. Acesso em: 18 out. 2021.

KIRSTAHLER, P. et al. Genomics-Based Identification of Microorganisms in Human Ocular Body Fluid. **Scientific Reports**, 2018.

LAM S.M.; et al. Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles. **J. Lipid Res**, 2014.

LANÇAS, F. M. Aumentando a eficiência das colunas de HPLC por meio da diminuição do diâmetro das partículas da fase estacionária: até onde? **Scientia Chromatographica**, 2011.

LIPSKY L.; BARRETT G. Intracameral antibiotics for prophylaxis of postoperative endophthalmitis in Australia. **Clin Exp Ophthalmol**. 2018.

LIN, S.-Y. et al. Povacoat affecting solid-state polymorphic changes of indomethacin after co-evaporation from different types of solvents via conventional and microwave drying techniques. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2016.

LIU, D. et al. Potential advantages of a novel chitosan-N-acetylcysteine surface modified nanostructured lipid carrier on the performance of ophthalmic delivery of curcumin. **Scientific Reports**, 2016.

LIU, K. K. C. et al. Synthetic approaches to the 2009 new drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2011.

Ludwig, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. **Drug Delivery Reviews**, 2005.

MAH, F. S.; SANFILIPPO, C. M. Besifloxacin: Efficacy and Safety in Treatment and Prevention of Ocular Bacterial Infections. **Ophthalmology and Therapy**, 2016.

MAHVAN, T. D. et al. The Role of Besifloxacin in the Treatment of Bacterial Conjunctivitis. **Annals of Pharmacotherapy**, 2014.

MALVERN. Material relationships. ZETASIZER NANO Series. Performance, simplicity, versatility. 2019. Disponível em: <https://www.malvernpanalytical.com/br/products/productrange/zetasizerrange/?gclid=EAlalQobChMI4eOymteT4AIVxQiRCh1JcQn_EAAYASAAEgl14vD_BwE>. Acesso em: 25 nov. 2021.

MCLAIN, V. C. Safety assessment of poloxamers 101, 105, 108, 122, 123, 124, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 212, 215, 217, 231, 234, 235, 237, 238, 282, 284, 288, 331, 333, 334, 335, 338, 401, 402, 403, and 407, poloxamer 105 benzoate, and poloxamer 182 dibenzoate as used in cosmetics. **International Journal of Toxicology**, 2008.

MEJÍA-LÓPEZ, H.; PANTOJA-MELÉNDEZ, C. A.; CLIMENT-FLORES, A.; LUCIO, V. M. B. Epidemiological Aspects of Infectious Conjunctivitis. Conjunctivitis Zdenek Pelikan, IntechOpen, November, ed. 23, 2011. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/conjunctivitis-a-complex-and-multifaceted-disorder/epidemiological-aspects-of-infectious-conjunctivitis>>. Acesso em: 22 abr. 2020.

MELO, K. J. C. et al. Rifampicin nanocrystals: Towards an innovative approach to treat tuberculosis. **Materials Science and Engineering C**, v. 112, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Blog da Saúde.** Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/index.php/34610-saiba-mais-sobre-a-conjuntivite>.

Acesso em: 25 jan. 2020.

MORALES, Ivan Andrés Cordova. **Nanocristais de artemeter: Preparação e caracterização físico-química.** 2016. 162 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

NAGAI, N. et al. Improved Corneal Toxicity and Permeability of Tranilast by the Preparation of Ophthalmic Formulations Containing Its Nanoparticles. **Journal of Oleo Science**, 2014.

NAGAI, N. et al. A nanoparticle formulation of disulfiram prolongs corneal residence time of the drug and reduces intraocular pressure. **Experimental Eye Research**, 2015.

NOYES, A. A.; WHITNEY, W. R. **The rate of solution of solid substances in their own solutions.** Journal of the American Chemical Society, v. 19, n. 12, p. 930-934. 1897.

OCHI, M. et al. Development of nanocrystal formulation of meloxicam with improved dissolution and pharmacokinetic behaviors. **International Journal of Pharmaceutics**, 2014.

OLIVEIRA, A. T. P. J. M. **Nanocristais: Aplicações em Tecnologia Farmacêutica.** Tese (Mestrado) – Curso de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal, 2014.

PATELLA et al. Urban air pollution and climate change: “The Decalogue: Allergy Safe Tree” for allergic and respiratory diseases care. **Clinical and Molecular Allergy**, 2018.

PAWAR, V. K. et al. Engineered nanocrystal technology: In-vivo fate, targeting and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, 2014.

PELTONEN, L.; STRACHAN, C. Understanding critical quality attributes for nanocrystals from preparation to delivery. **Molecules**, 2015.

PETERS, M. C. C. et al. The glucocorticoid derivative with the phthalimide group cationic nanocrystal for ophthalmic application: a design space development approach. **Materials Today Chemistry**, v. 19, 2021.

PIATEK, M.; SHEEHAN, G.; KAVANAGH, K. Galleria mellonella: The Versatile Host for Drug Discovery, In Vivo Toxicity Testing and Characterising Host-Pathogen Interactions. **Antibiotics**, v. 10, 2021.

PORTOLÉS, M.; REFOJO, M. F.; LEONG, F. -L. Poloxamer 407 as a bacterial adhesive for hydrogel contact lenses. **Journal of Biomedical Materials Research**, 1994.

PROKSCH, J. W. et al. Ocular pharmacokinetics of besifloxacin following topical administration to rabbits, monkeys, and humans. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, n. 4, 2009.

ROMERO, G. B. et al. Development of cationic nanocrystals for ocular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2016.

SAHER, O.; GHORAB, D. M.; MURSI, N. M. Levofloxacin hemihydrate ocular semi-sponges for topical treatment of bacterial conjunctivitis: Formulation and in-vitro/in-vivo characterization. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2016.

SAKURAI, E. et al. Effect of particle size of polymeric nanospheres on intravitreal kinetics. **Ophthalmic Research**, 2001.

SANTOS, G. A. et al. Besifloxacin liposomes with positively charged additives for an improved topical ocular delivery. **Scientific Reports**, 2020.

SATTAR, A. et al. Preparation, characterization and pharmacokinetics of cyadox nanosuspension. **Scientific Reports**, 2017.

SCHECHTER, B. A.; PAREKH, J. G.; TRATTLER, W. Besifloxacin Ophthalmic Suspension 0.6% in the Treatment of Bacterial Keratitis: A Retrospective Safety Surveillance Study. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, 2015.

SCHOPF, L. et al. Ocular Pharmacokinetics of a Novel Loteprednol Etabonate 0.4% Ophthalmic Formulation. **Ophthalmology and Therapy**, 2014.

SEIPLE, I. B. et al. A platform for the discovery of new macrolide antibiotics. **Nature**, 2016.

SHARMA, O. P., Patel, V., & Mehta, T. Nanocrystal for ocular drug delivery: hope or hype. In **Drug Delivery and Translational Research**. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13346-016-0292-0>. Acesso em: 10 mai. 2021.

SHIMAZAKI, J. et al. A Prospective, Randomized Trial of Two Mucin Secretagogues for the Treatment of Dry Eye Syndrome in Office Workers. **Scientific Reports**, 2017.

SILVERSTEIN, B.E. et al. Besifloxacin ophthalmic suspension 0.6% in the treatment of bacterial conjunctivitis patients with *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Clin Ophthalmol**, 2012.

SINGH, C. L. et al. BESIFLOXACIN THE FOURTH GENERATION FLUOROQUINOLONE: A REVIEW. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, 2014.

SINHA, B.; MÜLLER, R. H.; MÖSCHWITZER, J. P. Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: Formulations and factors affecting particle size International. **Journal of Pharmaceutics**, 2013.

SKRDLA, P. J.; YANG, H. On the Stability of Nano-formulations Prepared by Direct Synthesis: Simulated Ostwald Ripening of a Typical Nanocrystal Distribution Post-nucleation. **AAPS PharmSciTech**, 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE OFTALMOLOGIA. **Surto de conjuntivite já atinge 5 estados e tende a aumentar**. Disponível em: <<http://www.sboportal.org.br/links.aspx?id=10>>. Acesso em: 25 jan. 2020.

SPADARI, C. DE C. et al. Alginate nanoparticles as non-toxic delivery system for miltefosine in the treatment of candidiasis and cryptococcosis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, 2019.

TERRY, J. E.; HILL, R. M. Human Tear Osmotic Pressure: Diurnal Variations and the Closed Eye. **Archives of Ophthalmology**, v. 96, n. 1, 1978.

THERAPEUTIC GOODS ADMINISTRATION. Australian Public Assessment Report for besifloxacin hydrochloride. **Australian Government Department of Health and Ageing**, 2014.

THERMO SCIENTIFIC. **Chromeleon® Tutorial and User Manual Version: 6.70 April 2005**. Disponível em: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-Chromeleon-670-EN.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2021.

TÓTOLI, E. G AND NUNES SALGADO, H. R. Besifloxacin: A Critical Review of Its Characteristics, Properties, and Analytical Methods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 2018.

TÓTOLI, E. G. Análise Químico-Farmacêutica e Estudos de Estabilidade e Microbiológico de Besifloxacino em Suspensão Oftálmica. Tese (Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara, 2018.

TUOMELA, A. et al. Brinzolamide nanocrystal formulations for ophthalmic delivery: Reduction of elevated intraocular pressure in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, 2014.

TYNER, K. M. et al. How Has CDER Prepared for the Nano Revolution? A Review of Risk Assessment, Regulatory Research, and Guidance Activities. **The AAPS Journal**, 2017.

UEDA, H. et al. Anti-plasticizing effect of amorphous indomethacin induced by specific intermolecular interactions with PVA copolymer. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 9, 2014.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. (771) Ophthalmic Products - Quality Tests. **USP 43 - NF 38**, p. 6993, 2021.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. (1225) Validation of Compendial Procedures. **USP 43 - NF 38**, p. 8166, 2021.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. (785) Osmolality and Osmolarity. **USP 43 - NF 38**, p. 7008, 2021.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T : A peer-reviewed journal for formulary management**, 2015.

VEYRIES, M. L. et al. Control of staphylococcal adhesion to polymethylmethacrylate and enhancement of susceptibility to antibiotics by poloxamer 407. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2000.

WILLIAMS, H. D. et al. Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. **Pharmacological Reviews**, 2013.

Yuminoki, K. et al. Preparation and evaluation of high dispersion stable nanocrystal formulation of poorly water-soluble compounds by using Povacoat. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2014.

YUMINOKI, K. et al. Application of povacoat as dispersion stabilizer of nanocrystal formulation. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2016.

ZUO, J. et al. Design space approach in the development of esculetin nanocrystals by a small-scale wet-bead milling process. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2020.