

**Kaline Sandrelli Amorim Ferreira**



**Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo  
cloridrato de moxifloxacino**

Recife – PE

2016

**Kaline Sandrelli Amorim Ferreira**

**Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo cloridrato de  
moxifloxacino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

**Orientador:**

Prof. Dr. Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira

**Co-orientador:**

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

Recife – PE

2016

Catálogo na Fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB41010

F383d    Ferreira, Kaline Sandrelli Amorim.  
Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo  
cloridrato de moxifloxacino/Kaline Sandrelli Amorim Ferreira. – 2016.  
53f.:il.;tab.; 30cm.

Orientador: Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,  
CCS. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2016.  
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Lipossomas. 2. Nanotecnologia. 3. Antibióticos. 4. Endoftalmite. 5.  
Cirurgia. I. Lira, Rodrigo Pessoa Cavalcanti (Orientador). II. Título.

617.91            CDD (23.ed.)            UFPE (CCS2017-036)

Kaline Sandrelli Amorim Ferreira

Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo cloridrato de  
moxifloxacino

Aprovado em: 28/12/2016

Prof. Dr. Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira (presidente)

Instituição: CCS/UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Thiago Freire Pinto Bezerra

Instituição: CCS/UFPE

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Tiago Eugênio Faria e Arantes

Instituição: FAV

Assinatura: \_\_\_\_\_

Recife - PE

2016

*Dedico aos meus pais, pelo imenso amor a mim dedicado. Embora distantes, vocês sempre serão minha inspiração e meu exemplo!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pela graça da vida e pelas incontáveis bênçãos a mim concedidas.

Aos meus amados pais, pelo amor, dedicação e por se fazerem tão presentes em minha vida em todos os momentos.

Ao meu marido Rodrigo, pela paciência e incentivo durante as dificuldades que enfrentei no decorrer dos últimos dois anos.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Nereide Stela Santos Magalhães e aos doutores Milena, Rafaela e Anivaldo pelo apoio no desenvolvimento e concretização deste trabalho.

A Bruna, aluna de Iniciação Científica, que me deu valioso suporte no decorrer desta jornada.

A Adriana, veterinária do Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE, que possibilitou o experimento com os animais.

Aos demais familiares e amigos pela confiança, carinho e apoio.

Ao querido Prof. Dr. Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira pela orientação, carinho e entusiasmo e por inspirar sempre o melhor de todos que estão à sua volta.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência  
são como os timoneiros que entram no navio  
sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do  
seu destino”.

Leonardo da Vinci

## RESUMO

O objetivo foi estudar o perfil de liberação do moxifloxacino encapsulado em lipossomas, no humor aquoso, como um sistema de liberação controlada para aplicação intracameral. Lipossomas contendo moxifloxacino (MFLX-Lipo) foram obtidos através do método de hidratação do filme lipídico e foram caracterizados de acordo com o tamanho das partículas e sua eficiência de encapsulação. Quinze coelhas foram utilizadas para o estudo do perfil de liberação in vivo. MFLX-Lipo foi injetado na câmara anterior do olho direito de cada animal. As coelhas foram divididas em 5 grupos e uma amostra de humor aquoso (HA) foi coletada após 2, 4, 8, 24 e 48 horas após a administração de MFLX-Lipo. As concentrações de moxifloxacino (MFLX) no HA foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). MFLX-Lipo exibiu um tamanho médio de  $60.5 \pm 0.72$  nm e uma distribuição do tamanho da partícula de 0.307. A eficiência de encapsulação do MFLX nos lipossomas foi de  $92.24 \pm 0.24\%$ . No estudo de liberação in vivo do MFLX-Lipo, a concentração máxima de MFLX foi alcançada nas primeiras 2 horas após administração ( $4.16 \pm 2.07$  µg/mL) e foi seguida por um decréscimo na concentração intracameral, atingindo a concentração de  $0.34 \pm 0.05$  µg/mL após 48 horas. A formulação lipossomal obtida exibe propriedades que a tornam adequada para a administração intraocular e oferece estabilidade e elevada eficiência de encapsulação. No estudo in vivo, MFLX-Lipo exibiu um perfil de liberação satisfatório no humor aquoso, o que sugere que se trata de uma opção para a profilaxia de patógenos frequentemente envolvidos na endoftalmite.

**Palavras-chave:** Lipossomas. Nanotecnologia. Antibióticos. Endoftalmite. Cirurgia

## ABSTRACT

The purpose was to study the release profile of moxifloxacin encapsulated in liposomes in the aqueous humor as a controlled release system for intracameral application. Liposomes containing moxifloxacin (MFLX-Lipo) were obtained using the lipid film hydration method and were characterized by particle size and encapsulation efficiency. Female rabbits were used for the in vivo profile release study. MFLX-Lipo was injected into the anterior chamber of each animal's right eye. The rabbits were divided into 5 subgroups, and a sample of aqueous humor (AH) was collected 2, 4, 8, 24, and 48 hours after MFLX-Lipo administration. Moxifloxacin (MFLX) concentrations in the AH were analyzed using high performance liquid chromatography. MFLX-Lipo exhibited an average size of  $60.5 \pm 0.72$  nm and a particle size distribution of 0.307. The encapsulation efficiency of MFLX in liposomes was  $92.24 \pm 0.24\%$ . In the in vivo release study of MFLX-Lipo, the maximum concentration of MFLX was achieved within the first 2 hours after administration ( $4.16 \pm 2.07$   $\mu\text{g/mL}$ ) and was followed by a decrease in intracameral concentration ( $0.34 \pm 0.05$   $\mu\text{g/mL}$ ) until the 48-hour mark. The liposomal formulation obtained exhibits properties that make it suitable for intraocular administration and offers stability and high encapsulation efficiency. In the in vivo study, MFLX-Lipo exhibited a satisfactory aqueous humor release profile, which suggests that it is an option for the prophylaxis of frequent endophthalmitis pathogens.

**Keywords:** Liposomes. Nanotechnology. Anti-bacterial agents. Endophthalmitis. Surgery

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Estrutura molecular do moxifloxacino.....                                                                                                                                                      | 21 |
| <b>Figura 2.</b> Cromatograma do moxifloxacino em diferentes proporções de fase móvel ácido trifluoroacético 0,1%: acetonitrila : (A) 70:30; (B) 65:45; (C) 60:40; (D) 55:45, na concentração de 10 µg/mL. .... | 28 |
| <b>Figura 3.</b> Cromatograma do moxifloxacino em fase móvel ácido trifluoroacético 0,1%: acetonitrila 55:45, na concentração de 0,5 µg/mL .....                                                                | 28 |
| <b>Figura 4.</b> Cromatograma do moxifloxacino em fase móvel ácido trifluoroacético 0,1%: acetonitrila:metanol( 55:30:15), na concentração de 10 µg/mL.....                                                     | 29 |
| <b>Figura 5.</b> Curva analítica do moxifloxacino: (A) Cromatogramas; (B) Gráfico da análise de regressão linear .....                                                                                          | 31 |
| <b>Figura 6.</b> Fotografia dos materiais utilizados no procedimento cirúrgico.....                                                                                                                             | 35 |
| <b>Figura 7.</b> Fotografia do procedimento cirúrgico.....                                                                                                                                                      | 35 |
| <b>Figura 8.</b> Formulação de lipossomas contendo moxifloxacino com concentração de 1mg/mL .....                                                                                                               | 36 |
| <b>Figura 9.</b> Cromatogramas de moxifloxacino (10 µg/mL) e de humor aquoso (branco). .....                                                                                                                    | 37 |
| <b>Figura 10.</b> Gráfico representando a concentração de moxifloxacino na apresentação lipossomal em µg/mL encontrada nas amostras de humor aquoso. ....                                                       | 38 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Parâmetros dos cromatogramas de moxifloxacino obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência .....     | 29 |
| <b>Tabela 2.</b> Curva analítica do moxifloxacino a 296 nm.....                                                               | 30 |
| <b>Tabela 3.</b> Parâmetros do método de cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação do moxifloxacino ..... | 31 |
| <b>Tabela 4.</b> Resultados da exatidão da recuperação do moxifloxacino a partir dos lipossomas                               | 33 |
| <b>Tabela 5.</b> Resultados do doseamento e eficiência de encapsulação do moxifloxacino a partir dos lipossomas.....          | 36 |
| <b>Tabela 6.</b> Concentração por hora de lipossomas carregados com moxifloxacino .....                                       | 38 |

## LISTA DE ABREVIATÖES

|                         |                                                                                                                                           |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>CH</b>               | Colesterol                                                                                                                                |
| <b>ESCRS</b>            | Sociedade européia de cirurgiões de catarata e refrativa (European Society of Cataract and Refractive Surgeons)                           |
| <b>HA</b>               | Humor aquoso                                                                                                                              |
| <b>HPLC</b>             | Cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance LiquidChromatography)                                                          |
| <b>ICH</b>              | Conferência internacional em harmonização dos requisitos para registro de produtos farmacêuticos (InternationalConferenceonHarmonisation) |
| <b>LD</b>               | Limite de detecção                                                                                                                        |
| <b>LIO</b>              | Lente intraocular                                                                                                                         |
| <b>LQ</b>               | Limite de quantificação                                                                                                                   |
| <b>MFLX</b>             | Moxifloxacino                                                                                                                             |
| <b>MFLX-Lipo</b>        | Lipossomas carregados com moxifloxacino                                                                                                   |
| <b>MIC<sub>90</sub></b> | Concentração inibitória mínima necessária para inibir o crescimento de 90% dos patógenos                                                  |
| <b>PBS</b>              | Tampão fosfato-salino (PhosphateBuffered Saline)                                                                                          |
| <b>PC</b>               | Fosfatidilcolina de soja                                                                                                                  |
| <b>SA</b>               | Estearilamina                                                                                                                             |
| <b>TASS</b>             | Síndrome tóxica do segmento anterior (Toxic Anterior SegmentSyndrome)                                                                     |
| <b>TFA</b>              | Ácido trifluoroacético                                                                                                                    |

# SUMÁRIO

|                                                                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                                                                                          | <b>14</b> |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>                                                                                               | <b>16</b> |
| 2.1 ENDOLFTALMITE                                                                                                            | 16        |
| 2.2 MOXIFLOXACINO                                                                                                            | 20        |
| 2.3 LIPOSSOMAS                                                                                                               | 23        |
| <b>3 OBJETIVOS</b>                                                                                                           | <b>25</b> |
| 3.1 OBJETIVO GERAL                                                                                                           | 25        |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                                                                    | 25        |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                                                                  | <b>26</b> |
| 4.1 MATERIAL                                                                                                                 | 26        |
| 4.1.1 Substâncias, reagentes, matérias-primas e solventes                                                                    | 26        |
| 4.1.2 Equipamentos e acessórios                                                                                              | 26        |
| 4.1.3 Animais de laboratório                                                                                                 | 27        |
| 4.2 MÉTODOS                                                                                                                  | 27        |
| 4.2.1 Local do estudo                                                                                                        | 27        |
| 4.2.2 Tipo de estudo                                                                                                         | 27        |
| 4.2.3 Procedimentos técnicos e analíticos                                                                                    | 27        |
| 4.2.3.1 Metodologia analítica para quantificação do moxifloxacino por HPLC                                                   | 27        |
| 4.2.3.2 Desenvolvimento da curva analítica do MFLX por HPLC                                                                  | 30        |
| 4.2.3.3 Preparação dos lipossomas contendo MFLX                                                                              | 32        |
| 4.2.3.4 Ensaio de exatidão para a recuperação de MFLX nos lipossomas                                                         | 32        |
| 4.2.3.5 Aplicação do Método de HPLC: Doseamento do moxifloxacino nos lipossomas e determinação da eficiência de encapsulação | 33        |
| 4.2.3.6 Determinação do diâmetro médio dos lipossomas                                                                        | 34        |
| 4.2.3.7 Perfil de liberação in vivo de MFLX em preparações lipossomais <sup>34</sup>                                         |           |
| <b>5 RESULTADOS</b>                                                                                                          | <b>36</b> |
| 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONTENDO MFLX                                                                              | 36        |
| 5.2 PERFIL DE LIBERAÇÃO IN VIVO DOS LIPOSSOMAS CONTENDO MFLX                                                                 | 37        |
| <b>6 DISCUSSÃO</b>                                                                                                           | <b>39</b> |
| <b>7 CONCLUSÃO</b>                                                                                                           | <b>42</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>                                                                                                           | <b>43</b> |
| <b>APÊNDICE</b>                                                                                                              | <b>51</b> |
| APÊNDICE A - CONCENTRAÇÃO DE MOXIFLOXACINO NAS AMOSTRAS DE HUMOR AQUOSO                                                      | 51        |
| <b>ANEXOS</b>                                                                                                                | <b>53</b> |
| ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL                                                                                  | 53        |

## 1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde estima que aproximadamente 18 milhões de pessoas têm cegueira bilateral decorrente de catarata, representando quase metade de todos os casos de cegueira no mundo. Há uma disparidade na distribuição etária, sendo mais frequente observar baixa visual em indivíduos com idade superior a 50 anos. Apesar dos progressos nas intervenções cirúrgicas alcançados em muitos países ao longo das últimas décadas, a catarata relacionada à idade ainda é a causa mais comum de cegueira evitável no mundo.(THYLEFORS, 1995; BOURNE et al, 2013; PASCOLINI; MARIOTTI,2010)

O envelhecimento populacional é um fenômeno universal, presente tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. Segundo estimativas das Nações Unidas, em 2011, a população de idosos no mundo totalizava 800 milhões de pessoas, o que representava 11% da população. Em 2050, as projeções apontam para um contingente de mais de dois bilhões de idosos, o que constituirá 22% da população. Consequentemente, a incidência de catarata tende a aumentar de forma expressiva. (UNITED NATIONS, 2013)

Atualmente, nos EUA, a extração da catarata senil é a cirurgia mais frequentemente realizada em pacientes acima de 65 anos de idade (KHANNA; PUJARI; SANGWAN, 2011). Apesar de ser, na maioria das vezes, bem-sucedida, pode apresentar complicações como edema de córnea, dobras na membrana de Descemet, ruptura de cápsula posterior, perda vítrea e endoftalmite.Embora relativamente rara, a endoftalmitepós-operatória é uma complicação devastadora que pode levar à perda visual.Endoftalmite pós-operatória é uma condição ocular inflamatória, presumidamente decorrente de um processo infeccioso, tendo como principais agentes bactérias e fungos e, em raras ocasiões, parasitas que penetram no olho durante o período perioperatório.(FAROOQ; 2003; BARRY; CORDOVÉS; GARDNER, 2013)

Esforços para prevenir a endoftalmite incluem uma vasta quantidade de cuidados perioperatórios, incluindo o uso de antibióticos tópicos no pré- e pós-operatórios, antissépticos como iodo-povidine no momento da cirurgia e preparação cuidadosa do campo cirúrgico. No entanto, a literatura oferece dados limitados a respeito da escolha das intervenções profiláticas na cirurgia de catarata. (BARRY, CORDOVÉS, GARDNER, 2013; KESSEL et al., 2015; LINERTOVÁ et al., 2014)

Os guidelines do ESCRS para prevenção e tratamento de endoftalmite após cirurgia de catarata demonstraram que o uso profilático de antibiótico intracameral pode reduzir a incidência de endoftalmite pós-operatória em até 25% (BARRY, CORDOVÉS, GARDNER, 2013; KESSEL et al., 2015; LINERTOVÁ et al., 2014). Os antibióticos mais usados têm sido vancomicina e cefuroxime, entretanto, diversos efeitos adversos têm sido reportados para ambos os medicamentos (BRAGA-MELE et al., 2014; DAIEN et al., 2016; FILIP et al., 2006; KEATING, 2013; MOISSEIEV; LEVINGER, 2013)

Devido à ausência de outras alternativas bem estabelecidas, ambas as drogas, administradas por via intravítrea, permanecem como padrão-ouro no tratamento da endoftalmite e devem ser reservadas para esta indicação, sendo desencorajado seu uso como profilaxia.

Considerando a possibilidade de complicações com o uso intracameral de vancomicina e cefuroxime, moxifloxacino (MFLX) parece ser a melhor escolha de antibiótico para a profilaxia de endoftalmite devido ao seu amplo espectro de cobertura e modo de ação (HARUKI et al., 2014; KERNT et al., 2009; KOKTEKIR; ASLAN, 2012). No entanto, a injeção intracameral de MFLX apresenta, ainda, algumas limitações, como o tempo de meia-vida da droga na câmara anterior devido ao *turnover* do humor aquoso (HA).

Dessa sorte, a limitada penetração quando da administração local da droga e sua reduzida meia-vida intracameral suscitaram a necessidade de desenvolvimento de um método de administração mais eficaz.

Este estudo teve como proposta desenvolver um sistema de liberação sustentada de MFLX baseado em lipossomas para aplicação intracameral, a fim de promover um aumento no tempo de meia vida da droga no sítio de ação.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ENDOLFTALMITE

A endoftalmite é uma inflamação intraocular potencialmente grave que pode ocorrer como complicação de uma cirurgia intraocular, em consequência a um trauma não-cirúrgico (endoftalmite exógena) ou, ainda, decorrente de uma infecção sistêmica (endoftalmite endógena).(TABAN et al., 2005; YANOFF; DUKER, 2011)

Endoftalmite pós-operatória é uma condição ocular inflamatória, presumidamente decorrente de um processo infeccioso, tendo como principais agentes bactérias e fungos e, em raras ocasiões, parasitas que penetram no olho durante o procedimento cirúrgico. (BARRY, CORDOVÉS, GARDNER, 2013)

Esta patologia pode ser dividida em dois subgrupos (endoftalmite pós-operatória aguda e endoftalmite de início tardio), de acordo com o tempo de instalação da doença e com os patógenos mais comumente envolvidos.(BARRY, CORDOVÉS, GARDNER, 2013; TABAN et al., 2005; YANOFF; DUKER, 2011)

A endoftalmite aguda é definida como a que ocorre dentro de 6 semanas da cirurgia e os organismos infectantes mais frequentes são espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas e espécies de *Streptococcus*. Bactérias gram-negativas e anaeróbias são agentes etiológicos menos frequentes. (BARRY, CORDOVÉS, GARDNER, 2013; TABAN et al., 2005; YANOFF; DUKER, 2011)

A endoftalmite de início tardio é a que ocorre mais de 6 semanas após o procedimento cirúrgico. Tipicamente, estão envolvidos organismos de menor virulência como *Propionibacterium acnes*, *S. epidermidis* e fungos (BARRY, CORDOVÉS, GARDNER, 2013; YANOFF; DUKER, 2011).

Entretanto, é importante destacar que os agentes etiológicos mais comumente envolvidos na endoftalmite pós-operatória podem variar de forma expressiva de acordo com a região estudada. Em países como Índia e China, por exemplo, o percentual de bactérias gram-negativas e fungos pode ser muito mais elevado que na Europa e EUA, ao passo que uma taxa mais elevada de infecções estreptocócicas é relatada na Europa quando comparada aos EUA. As principais bactérias identificadas na endoftalmite pós-operatória em países ocidentais

incluem: *Staphylococcus* coagulase-negativa (*S. epidermidis*), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico, *E. faecalis* entre os organismos gram-positivos; dentre os gram-negativos ganham destaque *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa*. O espectro varia em casos de endoftalmite crônica, sendo o *P. acnes*, *Diphtheroids*, *S. epidermidis* e fungos os agentes mais comumente isolados (ANAND, 2000; BARRY, CORDOVÉS, GARDNER, 2013).

As taxas de incidência de endoftalmite têm flutuado ao longo dos últimos 50 anos, apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas (BARRY, CORDOVÉS, GARDNER, 2013; FRILING et al., 2013; TABAN et al., 2005).

No início do século XX, a incidência de endoftalmite após cirurgia de catarata era bastante elevada – aproximadamente 10%. O advento da extração extracapsular usando uma incisão limbar ou escleral em associação com medidas de higiene, propiciaram uma redução para 0,12% na Europa e para 0,072% nos EUA. Entre as décadas de 1990-2000, houve grande variação nas taxas de endoftalmite relatadas. Atualmente, a incidência de endoftalmite pós-operatória vem crescendo, variando de 0,3 a 0,5%. Isto se deve, possivelmente, à introdução da facoemulsificação com incisão em córnea clara (BARRY, CORDOVÉS, GARDNER, 2013; TABAN et al., 2005).

A técnica de incisão em córnea clara é historicamente associada ao aumento na incidência de endoftalmite após facoemulsificação devido a alterações pós-operatórias na pressão intraocular que podem gerar sucção e subsequente influxo de fluidos e partículas extraoculares para o interior da câmara anterior. Em uma extensa meta-análise, Taban e associados identificaram a incisão em córnea clara na facoemulsificação como fator de risco para endoftalmite, uma vez que elevadas taxas da infecção foram observadas quando comparadas às taxas encontradas após incisões em túnel escleral (0,189% *versus* 0,074%). Um fator relevante parece ser a construção do túnel. Enquanto que na incisão córneo-escleral o túnel é mais quadrático, nas incisões em córnea clara as proporções são frequentemente o dobro em largura quando comparadas ao raio e, por isso, estão mais propensas a ficarem abertas. Além disso, o período de cicatrização é mais prolongado nas incisões em córnea clara que nas incisões limbares e em túnel escleral (STEINERT, 2010; TABAN et al., 2005).

Para incisões limbares e esclerais, a cicatrização ativa da ferida começa dentro de 48 horas da cirurgia. A fase inicial é caracterizada pelo crescimento de tecido vascular episcleral. Nas semanas subsequentes, este tecido preenche toda a incisão, criando um tampão fibrovascular.

Após 2 anos ocorre remodelação, resultando na reorientação das fibras de colágeno presentes na cicatriz; estas tornar-se-ão paralelas ao colágeno escleral existente. Concorrentemente, a vascularização e a celularidade diminuem (STEINERT, 2010; TABAN et al., 2005).

Na primeira semana de pós-operatório, a força tênsil da ferida – capacidade de tração que o tecido cicatricial é capaz de suportar – é aproximadamente 10% daquela encontrada em tecidos normais que não sofreram incisão. Após oito semanas, este valor é cerca de 40% e em dois anos a ferida recupera 75 a 80% da força original. Por conseguinte, apesar de a ferida ser mais vulnerável à deiscência no início do período pós-operatório, em função do tamanho e construção da incisão, a incisão retém uma susceptibilidade permanente à deiscência traumática (STEINERT, 2010; TABAN et al., 2005).

A cicatrização das incisões corneanas, por sua vez, ocorre por meio do crescimento interno de ceratócitos que inicialmente estarão orientados paralelamente à incisão e, portanto, perpendiculares às lamelas do estroma corneano. Em comparação ao processo de cicatrização das incisões limbares e esclerais, a cicatrização corneana é muito mais lenta e produz uma incisão mais frágil, e, por isso, mais susceptível à deiscência (STEINERT, 2010; TABAN et al., 2005).

Com relação ao quadro clínico, aendofalmita na sua forma aguda é marcada por intensa inflamação intraocular (maior que o esperado para uma evolução pós-operatória típica), muitas vezes acompanhada por hipópio, hiperemia e quemose conjuntivais, edema corneano, edema palpebral, vitreíte e hemorragias retinianas, e periflebite difusa quando a retina é visível. Os sintomas incluem dor e perda acentuada da visão que, frequentemente, é desproporcional à acuidade visual esperada nos primeiros dias ou semanas após o procedimento cirúrgico. (YANOFF; DUKER, 2011)

A forma crônica ou de início tardio, por sua vez, pode apresentar um quadro clínico indistinguível daquele da uveíte anterior. Os precipitados ceráticos com rubor e celularidade da câmara anterior podem ser observados e os pacientes podem queixar-se de fotofobia, turvação visual e dor branda. Uma placa branca fibrosa na superfície posterior da lente configura a apresentação clássica nos casos de endofalmita por *P. acnes*, e inflamação resistente de início recente após capsulotomia com laser de neodímio: ítrio-alumínio-garnet (ND: YAG) pode sugerir a infecção, presumivelmente devida à liberação dos organismos de

baixa virulência previamente sequestrados dentro do humor vítreo.(YANOFF; DUKER, 2011)

Por se tratar de um quadro grave, medidas de prevenção têm sido propostas e incluem uma vasta quantidade de cuidados perioperatórios, como o uso de antibióticos tópicos no pré- e pós-operatório, antissépticos como iodo-povidine no momento da cirurgia e preparação cuidadosa do campo cirúrgico. No entanto, a literatura oferece dados limitados a respeito da escolha das intervenções profiláticas na cirurgia de catarata.(BARRY, CORDOVÉS, GARDNER, 2013; YANOFF; DUKER, 2011)

Os guidelines do ESCRS para prevenção e tratamento de endoftalmite após cirurgia de catarata demonstraram que o uso profilático de antibiótico intracameral pode reduzir a incidência de endoftalmite pós-operatória em até 25% (BARRY, CORDOVÉS, GARDNER, 2013). Os antibióticos mais usados têm sido vancomicina e cefuroxime, no entanto, diversos efeitos adversos têm sido reportados para ambos os medicamentos, dentre eles a síndrome tóxica do segmento anterior-“TASS”-(BRAGA-MELE et al., 2014; DAIEN et al., 2016; KEATING, 2013; MOISSEIEV; LEVINGER, 2013).

A TASS é uma inflamação estéril do segmento anterior subsequente a qualquer cirurgia do segmento anterior. O processo tipicamente tem início entre 12 e 48 horas após a cirurgia de catarata/segmento anterior, é limitada ao segmento anterior do olho e usualmente melhora após tratamento com corticosteroides. O principal diagnóstico diferencial é a endoftalmite pós-operatória (FILIP et al., 2006; STEINERT, 2010; YANOFF; DUKER, 2011).

Sua etiologia é vasta e qualquer substância usada durante ou imediatamente após uma cirurgia de catarata e que tenha acesso ao segmento anterior pode causar TASS. Todas as soluções oftálmicas que contêm conservantes ou agentes de estabilização de qualquer espécie podem ser tóxicas ao endotélio corneano. Anestésicosintracamerais são frequentemente utilizados em cirurgia de catarata e anestésicos sem conservantes numa dose apropriada não têm se mostrado tóxicos ao endotélio corneano; no entanto, doses de lidocaína sem conservantes numa concentração igual ou superior a 2%, causam opacificação e afinamento corneano significativos no pós-operatório. Os antibióticos, por sua vez, são uma fonte adicional de toxicidade quando utilizados em soluções de irrigação ou injetados no segmento anterior do olho ao final da cirurgia. (FILIP et al., 2006; STEINERT, 2010; YANOFF; DUKER, 2011).

Considerando a possibilidade de complicações com o uso intracameral de vancomicina e cefuroxime, como TASS, e ausência de outras alternativas bem estabelecidas, ambas as drogas, administradas por via intravítrea, permanecem como padrão-ouro no tratamento da endoftalmite. Entretanto, devem ser reservadas para esta indicação, sendo desencorajado seu uso como profilaxia. Para a profilaxia de endoftalmite, MFLX tem se mostrado uma alternativa bastante promissora devido ao seu amplo espectro de cobertura e modo de ação. Além disso, estudos recentes não evidenciaram toxicidade intraocular após injeção intravítrea ou intracameral desta droga (ARBISSER, 2008; ASENSA et al., 2013; KESSEL et al., 2015; KOKTEKIR; ASLAN, 2012; KOWALSKI et al., 2005; LANE et al., 2008).

## 2.2 MOXIFLOXACINO

MFLX é uma fluoroquinolona sintética de quarta geração com peso molecular de aproximadamente 437.9 D (Dalton). Não apresenta ponto de fusão e se decompõe em temperaturas superiores a 250° C. Seu pH varia de 3.9 a 4.6 e apresenta baixa solubilidade em água e metanol, sendo ligeiramente solúvel em ácido clorídrico e etanol e praticamente insolúvel em acetona e tolueno (VIGAMOX, 2004).

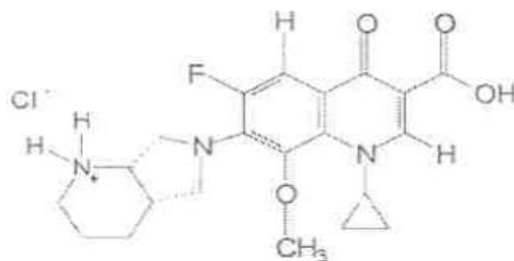
A solução oftálmica de MFLX a 0,5% (Vigamox®), por sua vez, é uma solução isotônica, formulada em um pH de 6.8 com uma osmolalidade de aproximadamente 290 mOsm/kg (VIGAMOX, 2004).

MFLX é rapidamente absorvido após administração oral e sua biodisponibilidade absoluta é de aproximadamente 91%. Uma única dose oral de 400 mg da droga produz concentrações plasmáticas de até 3,1 mg/L no intervalo de 0,5 - 4 h; enquanto que a mesma dose, quando administrada por via intravenosa durante uma hora gera um pico plasmático de 4,1mg/l ao final da infusão, o que corresponde a um aumento médio de aproximadamente 26% com relação à administração oral. A droga possui um tempo de meia vida plasmática de aproximadamente 13 horas (VIGAMOX, 2004).

Esta substância é largamente distribuída nos tecidos corporais e aproximadamente 50% da droga está ligada a proteínas séricas. Alcança concentrações elevadas em tecidos como pulmões, seios maxilar e etmoidal, além de sítios inflamatórios, onde são obtidas concentrações totais que ultrapassam as concentrações plasmáticas. Em contraste, apresenta

pouca penetração no fluido cérebro-espinhal e nos tecidos oculares.(KIM et al., 2005; VIGAMOX, 2004).

O sistema enzimático do citocromo P450 não está envolvido no metabolismo da droga. MFLX sofre biotransformação de fase II (conjugação), sendo excretado por via renal, biliar/fecal na forma de fármaco inalterado ou na forma de composto conjugado ao ácido glicurônico (M1) ou ao sulfato (M2). M1 e M2 são os únicos metabólitos relevantes na espécie humana, e ambos são microbiologicamente inativos (VIGAMOX, 2004).



**Figura 1.** Estrutura molecular do moxifloxacino

MFLX possui amplo espectro antimicrobiano, sendo ativo contra a maioria dos microrganismos gram-positivos e gram-negativos, além de micro-organismos atípicos e anaeróbios.<sup>72,80</sup> A concentração inibitória mínima (MIC<sub>90</sub>) do MFLX no HA contra patógenos oculares frequentemente implicados na endoftalmite pós-operatória foi determinada em 0.5 µg/ml para *Staphylococcus aureus* suscetível a fluoroquinolonas, 0.125 µg/ml para *Staphylococcus epidermidis*, 0,125 µg/ml para *Streptococcus pneumoniae*, 0,125 µg/ml para *Streptococcus viridans* e 0,064 para *Staphylococcus coagulase-negativo* suscetível a fluoroquinolonas (ALLEN; DESHPANDE, 2010; KOWALSKI et al., 2005; METZLER ET al., 2004).

O mecanismo de ação deste antibiótico resulta da inibição das enzimas topoisomerase II (DNA girase) e topoisomerase IV. A topoisomerase II é uma enzima essencial envolvida na replicação, na transcrição e no reparo do DNA bacteriano; a topoisomerase IV, por sua vez, é uma enzima conhecida por desempenhar um papel chave na divisão do DNA cromossômico durante a divisão celular das bactérias. Em altas concentrações, também inibe a síntese de RNA. A atividade bactericida é dose dependente até que a concentração bactericida ótima seja atingida; acima deste valor, qualquer acréscimo na concentração da droga pode acarretar um decréscimo paradoxal em sua atividade (VIGAMOX, 2004).

Mecanismos de resistência às fluoroquinolonas incluem subpopulações (mutantes) com:

- 1) Mutações nos genes da DNA girase e/ou da topoisomerase que alteram ou reduzem a afinidade da ligação da droga com essas enzimas;
- 2) Mutações nos genes que bloqueiam a entrada da droga;
- 3) Presença de uma bomba de efluxo que reduz as concentrações da droga;
- 4) Genes únicos que conferem resistência específica contra a droga.

Mecanismos de resistência raros incluem:

- 1) Presença de plasmídeos que protegem as células dos efeitos letais das fluoroquinolonas;
- 2) Aquisição de uma enzima modificadora de fluoroquinolona.

Os mecanismos de resistência que inativam as penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, macrolídeos e tetraciclinas não interferem na atividade antibacteriana do MFLX. Outros mecanismos de resistência como barreiras à permeabilidade (comuns na *Pseudomonas aeruginosa*) e mecanismos de efluxo podem afetar a susceptibilidade ao MFLX (VIGAMOX, 2004).

Regimes terapêuticos usuais de MFLX como uma gota administrada quatro vezes ao dia, mesmo com uma dose adicional, produz níveis terapêuticos da droga de até 1.9 µg/ml no HA (ARBISSER, 2008; KIM et al., 2005; O'BRIEN; ARSHINOFF; MAH, 2007), valor superior ao MIC<sub>90</sub> contra a maioria dos patógenos oculares, como observado anteriormente.

Uma única dose de MFLX a 0,5% quando injetada diretamente na câmara anterior excede em aproximadamente 100-500 vezes a concentração obtida com o tratamento tópico. Altos níveis da droga, além de aumentarem seu efeito bactericida, inibem o desenvolvimento de resistência bacteriana, o que tem tornado a injeção intracameral uma via de administração de drogas bastante promissora na oftalmologia (ARBISSER, 2008; KIM et al., 2005; O'BRIEN; ARSHINOFF; MAH, 2007).

No entanto, a injeção intracameral de MFLX apresenta, ainda, algumas limitações, como o tempo de meia-vida da droga na câmara anterior devido ao turnover do HA. Dessa sorte, a limitada penetração quando da administração tópica da droga e sua reduzida meia-vida intracameral suscitaram a necessidade de desenvolver um método de administração mais

eficaz. Com essa finalidade, estudamos a formulação de um sistema de liberação sustentada de MFLX baseado em lipossomas.

### 2.3 LIPOSSOMAS

Lipossomas podem ser definidos como estruturas que são compostas por uma ou mais camadas concêntricas ou bicamadas lipídicas separadas por água e contendo um compartimento aquoso central (DALE; MICHAEL, 1995; LASIC; PAPAHAADJOPOULOS, 1998; CHANG; YEH, 2012). Os fosfolipídios, em associação ao colesterol, são os componentes mais comumente usados na formulação de lipossomas, uma vez que constituem o principal componente estrutural das membranas biológicas. O colesterol é usualmente incluído na fórmula para estabilizar a membrana lipossomal e minimizar o vazamento de drogas hidrofílicas encapsuladas (TALSMA; CROMMELIN, 1992; CHANG; YEH, 2012).

Os fosfolipídeos mais utilizados na construção de modelos de membranas são as moléculas de fosfatidilcolina, provavelmente em razão de sua carga neutra, inércia química e similaridade com as membranas biológicas. A fosfatidilcolina, conhecida também como lecitina, pode ser derivada de fontes naturais e sintéticas, podendo ser obtida a partir da gema dos ovos e dos grãos de soja (CHANG; YEH, 2012; DEL AMO, 2008; EBRAHIM; PEYMAN; LEE, 2005; NEW, 1990).

Devido à natureza dos componentes utilizados em sua preparação, os lipossomas são considerados vesículas biocompatíveis. De acordo com suas dimensões, os lipossomas são classificados como vesículas unilamelares pequenas ou vesículas unilamelares grandes se apenas uma bicamada estiver presente. Se mais de uma bicamada estiver presente eles são denominados como vesículas multilamelares. (CHANG; YEH, 2012; DEL AMO, 2008).

O modo de preparo dos lipossomas varia de acordo com o tipo de estrutura que se deseja obter. Vesículas multilamelares são sintetizadas pelo método de hidratação lipídica, enquanto que vesículas unilamelares grandes são geralmente obtidas por meio de evaporação em fase reversa. Finalmente, vesículas unilamelares pequenas podem ser preparadas por submissão de suspensões de vesículas multilamelares ou de vesículas unilamelares grandes à sonicação ou à extrusão através de policarbonato. Em geral, todos os métodos de preparação envolvem três ou quatro estágios básicos: solubilização dos lipídios em solvente orgânico, remoção do solvente orgânico da solução de lipídios, dispersão dos lipídios em meio aquoso e purificação dos lipossomas. (NEW, 1990; BOCHOT; FATTAL, 2012)

Em razão de sua estrutura versátil em termos de tamanho, composição, carga superficial e fluidez da bicamada, os lipossomas podem encapsular compostos polares e apolares. Substâncias hidrofílicas podem ser encapsuladas no compartimento aquoso, enquanto que substâncias lipofílicas podem ser incorporadas na bicamada lipídica, sendo que estas últimas são encapsuladas com maior eficiência (LOPES; OLIVEIRA, 2000 BOCHOT; FATTAL, 2012)

A caracterização detalhada da estrutura dos lipossomas, incluindo distribuição de tamanho, número de bicamadas e volume de encapsulação é importante, uma vez que ela fornece informações importantes sobre diferenças na estrutura causadas por mudanças no método de preparação e na composição lipídica. Estas diferenças na estrutura afetam o comportamento das vesículas *in vitro*, assim como *in vivo* (CHANG; YEH, 2012; MEISNER; MEZEI, 1995). Assim, uma definição apropriada da estrutura é essencial para obtenção de resultados reprodutíveis, um pré-requisito fundamental para o emprego satisfatório dos lipossomas na terapêutica

Dentre as características que mais refletem as variações entre os distintos tipos de lipossomas estão àquelas relacionadas a encapsulação de fármacos pelas vesículas (CHANG; YEH, 2012).

Terapeuticamente, lipossomas apresentam uma ampla variedade de aplicações, incluindo o transporte de enzimas, antibióticos, antivirais, quimioterápicos, vacinas e na terapia gênica (EBRAHIM; PEYMAN; LEE, 2005; GREGORIADIS; FLORENCE, 1993; NIESMAN, 1992; SCHAEFFER; KROHN, 1982).

As vantagens da liberação de fármacos a partir de lipossomas incluem diminuição do pico de concentração resultando em toxicidade diminuída, direcionamento para o tecido alvo aumentando-se a disponibilidade do fármaco no sítio de ação e diminuindo-se a toxicidade nos tecidos sadios, menor frequência de aplicação. (CHANG; YEH, 2012; MEZEI; MEISNER, 1992; MISHRA et al., 2011).

Várias drogas (ciclosporina, gentamicina, ganciclovir) já tiveram seus níveis intravítreos avaliados após o encapsulamento em lipossomas e todos os estudos demonstraram um prolongamento dos tempos de meia-vida (ALGHADYAN et al., 1988; FISHMAN; PEYMAN; LESAR, 1986; PEYMAN et al., 1987).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver lipossomas contendo MFLX como um sistema de liberação prolongada para aplicação intracameral.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter lipossomas contendo MFLX a partir de fosfatidilcolina de soja (PC), colesterol (CH) e estearilamina (SA);
2. Caracterizar físico-quimicamente o sistema obtido;
3. Avaliar *in vivo* o perfil de liberação do MFLX na preparação lipossomal.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Substâncias, reagentes, matérias-primas e solventes

- Acetonitrila (Bayer®, Alemanha);
- Ácido trifluoroacético (Sigma, USA);
- Água deionizada Milli Q;
- Álcool etílico absoluto p.a. (Synth®, Brasil);
- Álcool metílico absoluto p.a. (Synth®, Brasil);
- Cloridrato de cetamina solução injetável (Cristália®, Brasil);
- Cloridrato de moxifloxacino (Sigma Aldrich LTDA, Brasil);
- Cloridrato de xilazina solução injetável (Cristália®, Brasil);
- Clorofórmio p.a (Synth®, Brasil);
- Fosfatidilcolina de soja hidrogenada, Epikuron 200 SH® (Lucas Meyer, Alemanha); e
- Soro fisiológico estéril (Equiplex®, Brasil).

#### 4.1.2 Equipamentos e acessórios

- Analisador de partículas a laser DelsaTMNano-S (Beckman Coulter, Califórnia, USA);
- Aparelho para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Aliance 2695, Waters, EUA);
- Centrífuga Ultracentrifuge KT-20000 (Kubota, Japão);
- Coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (250 mm × 4,6 mm, 5 mm, XBridge™ Waters, EUA);
- Aparelho para espalhamento dinâmico de luz (ZetasizerNano-ZS9, Malvern, Worcestershire, UK);
- Seringa de 0,3mL com agulha de 30Gauge;
- Sonda de ultrassom (Vibra Cell, BRANSON, USA); e
- Vidrarias de uso em laboratório (béquer, pipetas graduada e volumétrica, proveta, kitasato, balão volumétrico, erlenmeyer).

#### 4.1.3 Animais de laboratório

Quinze coelhos fêmeas da raça Nova Zelândia

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Local do estudo

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) e Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco

#### 4.2.2 Tipo de estudo

Estudo experimental com animais

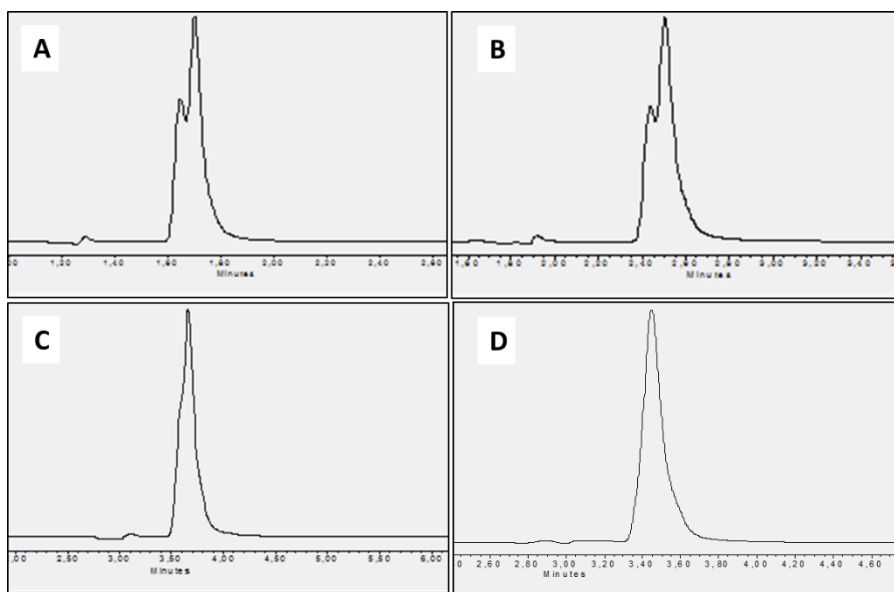
#### 4.2.3 Procedimentos técnicos e analíticos

##### *4.2.3.1 Metodologia analítica para quantificação do moxifloxacino por HPLC*

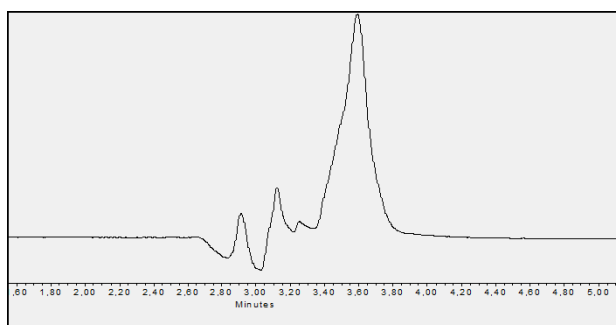
A quantificação do MFLX foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utilizando inicialmente o método isocrático proposto por Davis et al. (2010) com modificações. As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento Alliance 2695 (Waters, EUA) acoplado a um detector de arranjos de diodos 2998 (Waters, EUA), operado a 296nm. Uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (250 mm × 4,6 mm, 5 mm, XBridge™ Waters) protegida por uma pré-coluna da mesma composição (20 mm × 4,6mm) foi utilizada. A fase móvel foi composta por água acidificada 0,1% (acidificada com TFA pH 3,0):acetonitrila[(70:30) (v/v)]. O fluxo utilizado foi de 0,6mL/min a 50°C e um volume de injeção de 20μL.

A concentração teste do MFLX(10 μg/mL) foi preparada a partir de diluições de uma solução estoque (1 mg/mL), em água acidificada. O cromatograma apresentou-se assimétrico com

presença de dois picos de absorção (Figura 2A) havendo necessidade de ajustes no método. As proporções dos solventes foram modificadas até que o cromatograma se apresentasse simétrico (Figura 2D). Essa proporção foi de 65:45 (água acidificada:acetonitrila). Contudo, em concentrações menores ( $0,5 \mu\text{g/mL}$ ) houve uma interferência na linha de base do cromatograma (Figura 3).

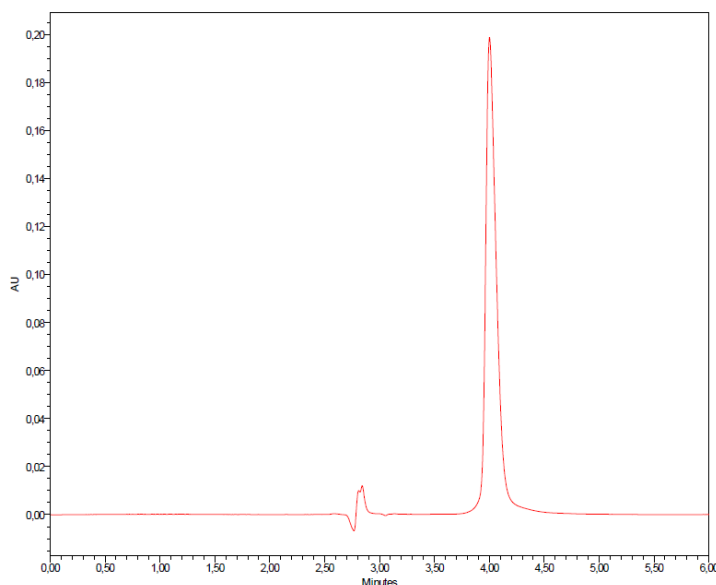


**Figura 2.** Cromatograma do moxifloxacino em diferentes proporções de fase móvel ácido trifluoroacético 0,1%: acetonitrila : (A) 70:30; (B) 65:45; (C) 60:40; (D) 55:45, na concentração de  $10 \mu\text{g/mL}$ .



**Figura 3.** Cromatograma do moxifloxacino em fase móvel ácido trifluoroacético 0,1%: acetonitrila 55:45, na concentração de  $0,5 \mu\text{g/mL}$

Um novo ajuste foi realizado no método: o metanol foi adicionado à fase móvel em diferentes proporções para afastar o cromatograma do sinal de interferência. A proporção final da fase móvel foi de 55:30:15 (TFA 0,1%: Acetonitrila:Metanol) com um fluxo de  $1\text{mL/min}$ , o qual apresentou um cromatograma simétrico com tempo de retenção de 4,1 min (Figura 4).



**Figura 4.** Cromatograma do moxifloxacino em fase móvel ácido trifluoroacético 0,1%: acetonitrila: metanol (55:30:15), na concentração de 10 µg/mL

O desempenho do sistema cromatográfico foi avaliado a partir dos seguintes parâmetros: número de pratos teóricos (N), fator de cauda (T) e altura equivalente do prato teórico (HEPT) (Tabela1). O método proposto atendeu aos requisitos dentro dos limites aceitáveis conforme dados apresentados na Tabela 3. A eficiência da coluna aumenta com o número dos pratos teóricos, que devem ser acima de 2000 para apresentar eficiência adequada, o que foi verificado também pela diminuição da altura dos pratos teóricos. Os valores de fator de cauda, próximos de um, são ideais, pois indicam a simetria do pico.

**Tabela 1.** Parâmetros dos cromatogramas de MFLX obtidos por HPLC

| Parâmetros | Limites recomendados | Parâmetros calculados |
|------------|----------------------|-----------------------|
| N          | N > 2000             | 7598                  |
| T          | T < 2                | 1,17                  |
| HETP       | HEPT < 0,15          | 0,03                  |

**MFLX:**moxifloxacino; **HPLC:** cromatografia líquida de alta eficiência

**N:** número de pratos teóricos; **T:** fator de cauda do pico; **HETP:**altura equivalente do prato teórico

#### 4.2.3.2 Desenvolvimento da curva analítica do MFLX por HPLC

A curva analítica do MFLX foi preparada a partir de diluições de uma solução estoque (1 mg/mL), variando as concentrações de 0,5 a 20 µg/mL. Posteriormente, estabeleceu-se correlação linear entre concentração, considerada variável independente (x), e relação entre as áreas dos picos cromatográficos do fármaco e do padrão interno, considerada variável dependente (y). A linearidade foi avaliada através de análise de regressão linear, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados.

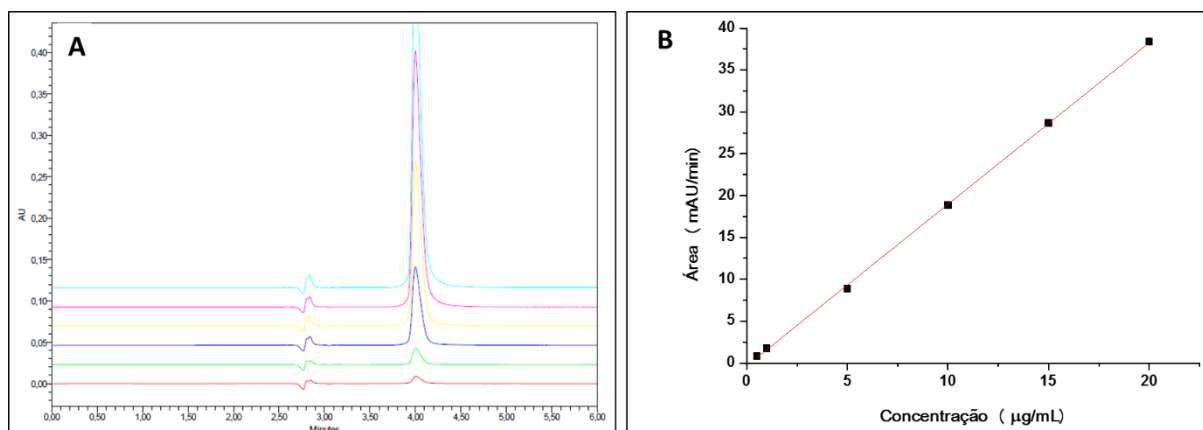
Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados de acordo com as diretrizes do ICH. O limite de detecção foi calculado através da fórmula:  $LD = 3,3 (\sigma / I)$ , e o limite de quantificação foi calculado através da fórmula:  $LQ = 10 (\sigma / I)$ , onde  $\sigma$  é o desvio padrão do intercepto com relação ao eixo dos Y e  $I$  é o valor da inclinação da curva analítica.

Os dados da curva analítica do MFLX ajustados por análise de regressão linear estão apresentados na Tabela 2. O método mostrou-se linear para ambos MFLX entre as concentrações de 0,5 a 20 µg.mL<sup>-1</sup> (Figura 5).

**Tabela 2.** Curva analítica do MFLX a 296 nm

| Concentração teórica de MFLX<br>(µg.mL <sup>-1</sup> ) | Valor da Área MFLX<br>(mAU/min) |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 0,5                                                    | 0,86                            |
| 1                                                      | 1,77                            |
| 5                                                      | 8,88                            |
| 10                                                     | 18,84                           |
| 15                                                     | 28,69                           |
| 20                                                     | 38,39                           |

**MFLX:** moxifloxacino



**Figura 5.** Curva analítica do moxifloxacino: (A) Cromatogramas; (B) Gráfico da análise de regressão linear

A equação da regressão linear obtida foi  $y = -0,33 + 1,93 x$ , em que  $y$  é a área (mAU/min) e  $x$  a concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) em equivalentes de MFLX, respectivamente. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9996, significando que 99,96% da variação total em torno da média é explicada pela regressão linear, comprovando a adequação do método ao intervalo avaliado. Os dados da análise de regressão são resumidos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Parâmetros do método HPLC para a quantificação do MFLX

| Parâmetros                                        | Valores              |
|---------------------------------------------------|----------------------|
| Comprimento de onda de medição (nm)               | 296                  |
| Faixa linear ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )            | 0,5-20               |
| Intercepto $\pm$ (desvio padrão)                  | -0,33 ( $\pm 0,17$ ) |
| Inclinação $\pm$ (desvio padrão)                  | 1,93 ( $\pm 0,02$ )  |
| Coeficiente de correlação ( $r^2$ )               | 0,9996               |
| Limite de detecção, LD, ( $\mu\text{g/mL}$ )      | 0,29                 |
| Limite de quantificação, LQ, ( $\mu\text{g/mL}$ ) | 0,88                 |

**HPLC:** cromatografia líquida de alta eficiência; **MFLX:** moxifloxacino

#### 4.2.3.3 Preparação dos lipossomas contendo MFLX

Os lipossomas convencionais contendo MFLX (MFLX-Lipo) foram obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico proposto por Lira et al. (2009) com pequenas modificações. Inicialmente, MFLX (5 mg) foi solubilizado em 2 mL de metanol. Posteriormente, os lipídios (60 mM) fosfatidilcolina de soja (PC), colesterol (CH) e estearilamina (SA) (70: 20: 10) foram solubilizados separadamente em uma solução de clorofórmio: metanol (3:1). Todos os componentes foram misturados e a solução resultante foi submetida à rotaevaporação sob pressão reduzida até a formação de um filme uniforme. O filme lipídico foi hidratado utilizando 5 mL de tampão PBS pH 7,4 obtendo uma formulação com concentração de 1 mg/mL. Para obtenção de lipossomas unilamelares pequenos a solução foi submetida a sonda de ultrassom (Vibra Cell, BRANSON, USA) a 200 W e 40 Hz por 300 segundos.

#### 4.2.3.4 Ensaio de exatidão para a recuperação de MFLX nos lipossomas

A fim de realizar o ensaio de exatidão da extração do fármaco presente nos lipossomas, foram preparados lipossomas brancos utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente, porém sem a presença do moxifloxacino.

A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação do fármaco, no qual 50 µL da solução padrão de 1 mg.mL<sup>-1</sup> de MFLX foi adicionado a 50 µL da formulação lipossomal placebo (branco) obtendo uma concentração teórica de 10 µg.mL<sup>-1</sup>. As amostras foram preparadas em triplicata. O coeficiente de variação e a porcentagem de recuperação foram utilizados para avaliar a exatidão definida como:

$$Exatidão = \left( \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração teórica}} \right) \times 100$$

A exatidão foi verificada no nível de concentração de 10 µg/mL, onde o desvio padrão relativo foi de cerca de 2,67% (Tabela 4). O ICH (2013) regulamenta que os resultados da exatidão não devem ser inferiores a 95% e que o desvio padrão relativo não deve ultrapassar 5%, portanto, os resultados deste estudo demonstram que a recuperação de MFLX a partir dos lipossomas foi exata.

**Tabela 4.** Resultados da exatidão da recuperação do MFLX a partir dos lipossomas

| Concentração de MFLX         |              |        |        | Dados estatísticos |      |         |
|------------------------------|--------------|--------|--------|--------------------|------|---------|
| Teórica                      | Experimental |        |        | Média              | DP   | DPR (%) |
| 10 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | 9,94         | 10,48  | 10,29  | 10,24              | 0,27 | 2,67    |
| 100 (%)                      | 99,43        | 104,83 | 102,90 | 102,39             | 2,74 | 2,67    |

**MFLX:**moxifloxacino;**DP** = desvio padrão; **DPR** = desvio padrão relativo

#### 4.2.3.5 Aplicação do Método de HPLC: Doseamento do moxifloxacinonos lipossomas e determinação da eficiência de encapsulação

Para determinação do MFLX transferiu-se uma alíquota da forma lipossomal equivalente a 50 $\mu\text{g}$  do fármaco (50  $\mu\text{L}$ ) para balão volumétrico de 5mL. Em seguida, adicionou-se à amostra 1mL de metanol. A solução foi submetida à sonicação (procedimento que utiliza a energia de ondas sonoras a fim de promover a agitação das partículas contidas em um recipiente) por 5 minutos para romper a estrutura lamelar dos lipossomas e liberar o conteúdo de MFLX encapsulado. Posteriormente, foram adicionados 4 mL de água acidificada para a solubilização do fármaco. A solução foi filtrada (Filtros Milex<sup>®</sup> 0,22 mm, Millipore, EUA) e a concentração de MFLX foi determinada: a concentração teórica de MFLX, na amostra, foi de 10 $\mu\text{g/mL}$ . Os ensaios de doseamento foram realizados em triplicata.

A eficiência de encapsulação foi determinada pela técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação utilizando unidades filtrantes Microcon<sup>®</sup> (Millipore, EUA), na qual as amostras de lipossomas (500  $\mu\text{L}$ ) foram centrifugadas (Ultracentrifuge KT-20000, Kubota, Japão) a 14.000 rpm por 30 min a 4°C. A concentração de MFLX no ultrafiltrado (fármaco livre) foi determinada. Por fim, a eficiência de encapsulação (%) foi calculada pela diferença entre as concentrações do fármaco total na suspensão e não encapsulada (livre).

#### *4.2.3.6 Determinação do diâmetro médio dos lipossomas*

Os lipossomas foram caracterizados através da determinação do tamanho médio e do índice de polidispersão por espectroscopia de autocorrelação de fótons (PCS), utilizando analisador de partículas a laser DelsaTMNano-S (Beckman Coulter, Califórnia, USA).

#### *4.2.3.7 Perfil de liberação in vivo de MFLX em preparações lipossomais*

Foram utilizados quinze coelhos fêmeas da raça Nova Zelândia, pesando entre 2,5 e 4,8 kg.

Foi injetado 0,05 ml de lipossomas contendo MFLX (1mg/ml) na câmara anterior do olho direito de cada animal.

Os coelhos foram divididos em 5 grupos compostos por 3 coelhos cada. Uma amostra de HA (0,1ml) foi coletada utilizando-se uma agulha de 30 G após 2 horas (grupo 1), 4 (grupo 2), 8 (grupo 3), 24 (grupo 4) e 48 horas (grupo 5). As amostras de HA foram congeladas em nitrogênio líquido para posterior análise por HPLC.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Anexo B) da UFPE (processo nº 23076.011824/2015-11, ofício nº 78/15). Os animais foram utilizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal elaborados pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (2013) e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (2008).

O procedimento cirúrgico foi realizado em condições estéreis e os coelhos foram anestesiados utilizando-se injeção intramuscular contendo cloridrato de ketamina e cloridrato de xilasina durante todos os procedimentos. Um minuto antes do procedimento cirúrgico foi realizada anestesia tópica com colírio anestésico contendo tetracaína.



**Figura 6.** Fotografia dos materiais utilizados no procedimento cirúrgico



**Figura 7.** Fotografia do procedimento cirúrgico

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONTENDO MFLX

A formulação lipossomal apresentou-se estável, sem presença de precipitados e homogênea (Figura 8). Os lipossomas exibiram um tamanho médio de  $60,5 \pm 0,72$  nm com uma distribuição de tamanho estreita e monodispersa ( $PDI = 0,307$ ).



**Figura 8.** Formulação de lipossomas contendo moxifloxacino com concentração de 1mg/mL

Após o desenvolvimento da metodologia analítica, o MFLX presente nas formulações lipossomais foi quantificado, onde se obteve um teor de 99,6%, indicando a eficácia do método desenvolvido (tabela 5). Com relação à eficiência de encapsulação, valores elevados, acima de 90% ( $92,24 \pm 0,24$  %), foram obtidos.

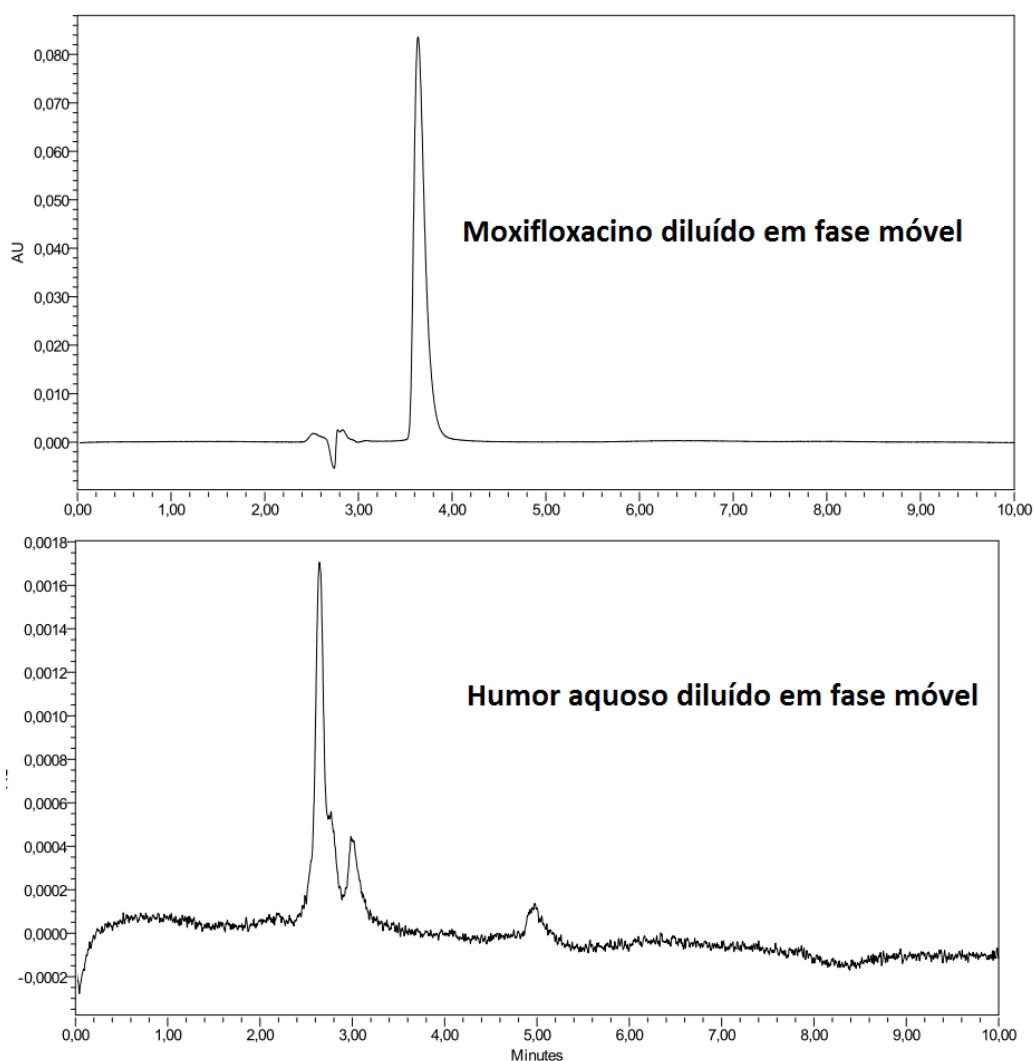
**Tabela 5.** Resultados do doseamento e eficiência de encapsulação do MFLX a partir dos lipossomas

| Parâmetros                     | Dados Experimentais |        |       | Dados estatísticos |      |
|--------------------------------|---------------------|--------|-------|--------------------|------|
|                                |                     |        |       | Média              | DP   |
| Doseamento (teor) (%)          | 96,83               | 102,13 | 99,87 | 99,61              | 2,66 |
| Eficiência de encapsulação (%) | 92,02               | 92,49  | 92,22 | 92,24              | 0,24 |

**MFLX:** moxifloxacino; **DP:** desvio padrão

## 5.2 PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VIVO* DOS LIPOSSOMAS CONTENDO MFLX

A avaliação dos cromatogramas de MFLX na concentração de 10 µg/mL e de HA branco evidenciou que, nestas condições, não houveram interferentes oriundos dos constituintes de HA no tempo de retenção do MFLX. Demonstrando assim, que o método foi seletivo para MFLX na concentração de 10 µg/mL em amostras contendo HA. A figura 9 apresenta os cromatogramas de MFLX na concentração de 10 µg/mL e de HA branco (diluído 20 vezes), ambos diluídos em fase móvel.



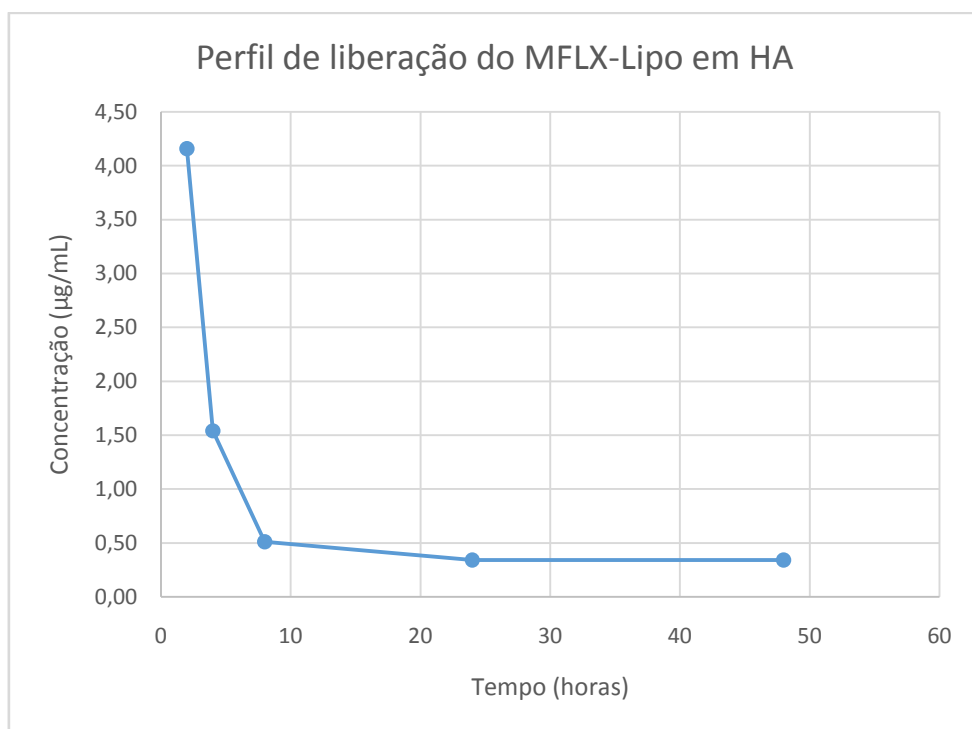
**Figura 9.** Cromatogramas de moxifloxacino (10 µg/mL) e de humor aquoso.

As concentrações em µg/mL obtidas a partir das áreas dos picos dos cromatogramas das amostras de HA contendo MFLX-Lipo estão apresentadas na tabela 6 e figura 10 abaixo.

**Tabela 6.** Concentração por hora de MFLX-Lipo

| Tempo (horas) | Concentração( $\mu\text{g/mL}$ ) | Desvio padrão |
|---------------|----------------------------------|---------------|
| 2             | 4,16                             | 2,07          |
| 4             | 1,54                             | 0,57          |
| 8             | 0,51                             | 0,36          |
| 24            | 0,34                             | 0,06          |
| 48            | 0,34                             | 0,05          |

**MFLX-Lipo:** lipossomas contendo moxifloxacino



**Figura 10.** Gráfico representando a concentração de moxifloxacino na apresentação lipossomalem  $\mu\text{g/mL}$  encontrada nas amostras de humor aquoso.

## 6 DISCUSSÃO

A distribuição de tamanho e o índice de polidispersão das vesículas lipossomais são importantes parâmetros porque indicam a uniformidade e homogeneidade da formulação. Ademais, eles podem influenciar na encapsulação da droga e na sua distribuição e liberação in vivo. Quanto maior a curvatura da bicamada lipídica (quanto menor for a vesícula lipossomal), mais instável será a vesícula lipossomal e, teoricamente, menor será a sua eficiência de encapsulação (BOCHOT; FATTAL, 2012; KASZÁS et al., 2008; HENRIKSEN et al., 1995). Na literatura, as formulações de lipossomas utilizadas para administração intraocular apresentaram diâmetro médio variando de 100 a 400 nm (DEL AMO, 2008). Neste estudo, os lipossomas apresentaram um tamanho de partícula muito pequeno ( $60,5 \pm 0,72$  nm), sugerindo, em estudos futuros, uma diminuição no tempo de sonicação a fim de obter partículas com diâmetro médio superior a 100 nm.

O desafio ao desenvolver lipossomas como sistemas de liberação de drogas oculares é fornecer um sistema com duração de atividade da droga e biodisponibilidade aumentadas, mas com um risco mínimo de complicações oculares. A eficiência de encapsulação lipossomal é um dos principais fatores que influenciam no efeito terapêutico das drogas contidas em lipossomas (BOCHOT; FATTAL, 2012; KASZÁS et al., 2008; HENRIKSEN et al., 1995). Neste estudo, MFLX-Lipo exibiu alta eficiência de encapsulação.

A literatura relata que o perfil de liberação de fármacos encapsulados em lipossomas tende a mostrar uma liberação inicial rápida do fármaco seguida por taxas mais lentas de liberação. A taxa de liberação inicial é comumente atribuída ao desprendimento da droga a partir da superfície lipossomal, enquanto que a taxa de liberação subsequente se deve ao desprendimento prolongado da droga a partir das lamelas internas (BOCHOT; FATTAL, 2012; KASZÁS et al., 2008; HENRIKSEN et al., 1995). No estudo de liberação in vivo do MFLX-Lipo, a concentração máxima de MFLX foi alcançada nas primeiras 2 horas após administração ( $4.16 \pm 2.07 \mu\text{g/mL}$ ) e foi seguida por um decréscimo na concentração intracameral ( $0.34 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ ) até o ponto de 48 horas. Houve rápida liberação nas primeiras 4 horas. Nas 44 horas seguintes, mostrou um perfil de liberação mais lento. Embora o perfil de liberação in vivo apresentado pelo MFLX-Lipo seja compatível com os dados da literatura, era esperada uma taxa de liberação mais lenta da droga. Nesse sentido,

em estudos futuros, sugere-se uma modificação na proporção de colesterol da formulação, a fim de alterar a fluidez e rigidez da membrana, o que possivelmente diminuirá a velocidade de liberação do fármaco e aumentará sua biodisponibilidade ocular.

Para atingir uma profilaxia bem sucedida, a concentração de um antibiótico na câmara anterior após injeção intracameral deve exceder os valores de MIC<sub>90</sub> determinados para patógenos frequentemente relacionados à endoftalmite (KIM et al., 2005; BARRY, CORDOVÉS, GARDNER, 2013; ALLEN; DESHPANDE, 2010). Em um estudo recente realizado para investigar a segurança, a eficácia e a farmacocinética oculares de MFLX em um modelo de coelho, 0,1 mL de MFLX a 0,5% (500 µg) foi injetado no olho direito de coelhos Nova Zelândia. Em seguida, as amostras de HA foram coletadas 30 minutos e 1, 3, 6, 12, e 24 horas após a injeção inicial. A concentração de MFLX nas amostras de HA foi superior ao MIC<sub>90</sub> até 6 horas no caso do *S. aureus*, até 12 horas nos casos do *S. pneumoniae* e *S. viridans*, e até 24 horas no caso do *Staphylococcus coagulase-negativo* suscetível a fluoroquinolonas (ASENA et al., 2013). Em nosso estudo, 0,05 mL de lipossomas carregados com MFLX 0,1% (50 µg) foi injetado no olho direito de 15 coelhos Nova Zelândia. Mesmo em uma concentração 10 vezes menor do que a do estudo anterior, a concentração de MFLX nas amostras de HA foi superior aos valores de MIC<sub>90</sub> para *S. aureus* até 8 horas após a administração e até 48 horas após a administração no caso de *S. pneumoniae*, *S. viridans*, e *Staphylococcus coagulase-negativo* suscetível a fluoroquinolonas (ALLEN; DESHPANDE, 2010; KOWALSKI et al., 2005; METZLER ET al., 2004).

A segurança de MFLX intracameral foi previamente investigada em outros estudos experimentais. Em um estudo sobre a segurança in vitro de MFLX intracameral, culturas de células endoteliais corneanas, de células da rede trabecular e de células do epitélio pigmentar da retina foram tratadas com diferentes doses de MFLX (10-750 µg/mL) durante 24 horas, e também sob o efeito de mediadores inflamatórios na cultura. MFLX não mostrou toxicidade significativa para nenhum dos tipos celulares em concentrações de até 150 µg/mL (KERNT et al., 2009). A maior concentração de MFLX determinada nas amostras de HA em nosso estudo foi muito abaixo do nível de toxicidade determinado no estudo anterior.

Em outro estudo sobre a segurança e eficácia de MFLX intracameral em humanos, MFLX foi diluído para uma concentração de 0,1% e injetado no final de cirurgias de catarata de rotina. A alteração na espessura macular central foi avaliada em 31 olhos, antes e após a cirurgia da catarata com injeção de MFLX intracameral no peroperatório, e estudos de tomografia de

coerência óptica apresentaram um aumento médio de menos de 3% na espessura macular central em todas as secções (ARBISSER, 2008).

Com a finalidade de avaliar a segurança em longo-prazo do MFLX intracameral em humanos, 150µg/0.03 mL de MFLX foi injetado na câmara anterior de 150 pacientes submetidos à cirurgia de catarata. Estes pacientes foram avaliados durante 2 anos com relação a mudanças na densidade média de células endoteliais corneanas, na paquimetria, na acuidade visual corrigida e na pressão intraocular e comparados ao grupo controle (150 pacientes submetidos a cirurgia de catarata no mesmo período, sem injeção intracameral de MFLX). Não houve diferenças significantes entre os grupos (LIRA, 2016, In Press). Estes dados sugerem que MFLX é uma opção segura para a administração intracameral.

Em contrapartida, apesar de os lipossomas serem considerados vesículas biocompatíveis devido à natureza de seus componentes, não há estudos dedicados à avaliação da sua potencial toxicidade ocular após injeção intracameral.

Os resultados deste estudo experimental são promissores, mas são preliminares e têm muitas limitações. O estudo precisa ser replicado a fim de determinar mais detalhes sobre a farmacocinética e farmacodinâmica do MFLX-Lipo. Além disso, novas formulações precisam ser desenvolvidas para garantir uma meia-vida mais prolongada e uma liberação intracameral da droga mais constante.

## 7 CONCLUSÃO

As experiências realizadas neste estudo resultaram em lipossomas carregados com MFLX (MFLX-Lipo) a partir de fosfatidilcolina de soja, colesterol e estearilamina (70: 20: 10).

A formulação obtida mostrou homogeneidade em tamanho e exibiu elevada eficiência de encapsulação da droga.

Os resultados do experimento in vivo indicam que MFLX-Lipo oferece um perfil de liberação da droga satisfatório no humor aquoso sugerindo, portanto, que esta formulação pode ser uma opção na profilaxia de patógenos frequentemente relacionados à endoftalmite.

## REFERÊNCIAS

- Alghadyan AA, Peyman GA, Khoobehi B, et al. Liposome-bound cyclosporine: Retinal toxicity after intravitreal injection. *International Ophthalmology*. 1988; 12(2): 105-107.
- Allen GP, Deshpande LM. Determination of the mutant selection window for clindamycin, doxycycline, linezolid, moxifloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Antimicrobial Agents*. 2010;35(1):45–49.
- Anand AR. Spectrum of aetiological agents of postoperative endophthalmitis and antibiotic susceptibility of bacterial isolates. *Indian J Ophthalmol*. 2000;48:123-128.
- Arbissier LB. Safety of intracameral moxifloxacin for prophylaxis of endophthalmitis after cataract surgery. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2008;34(7):1114–1120.
- Asena L, Akova YA, Goktas MT, et al. Ocular pharmacokinetics, safety and efficacy of intracameral moxifloxacin 0,5% solution in a rabbit model. *Current Eye Research*. 2013; 38(4): 472-479.
- Bakker-Woudenberg AJM, Looker AF, Roerdink F, Regts D, Michel MF. Free versus liposome-entrapped ampicillin in treatment of infection due to *Listeria monocytogenes* in normal and athymic nude mice. *J Infect Dis*. 1985;151: 917-924
- Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *J Mol Biol*. 1965;13:138.
- Barry P, Cordovés L, Gardner S. ESCRS Guidelines on prevention and treatment of endophthalmitis following cataract surgery: data, dilemmas and conclusions. *European Society of Cataract and Refractive Surgeons*. 2013;1–16.
- Benbouzid F, Kodjikian L, Hartmann D, Renaud F, Baillif S. Moxifloxacin superior to cefuroxime in reducing bacterial adhesion of *Staphylococcus epidermidis* on hydrophobic intraocular lenses. *Acta ophthalmologica* [Internet]. 2015 [citado 1º de junho de 2016]; Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aos.12827/full>
- Blondeau JM. A review of the comparative in-vitro activities of 12 antimicrobial agents, with a focus on five new respiratory quinolones. *J Antimicrob Chemother*. 1999;43(Suppl B):1–11.

Bochot A, Fattal E. Liposomes for intravitreal drug delivery: A state of the art. *Journal of Controlled Release*. 2012;161(2):628–634.

Bourges J-L, Bloquel C, Thomas A, Froussart F, Bochot A, Azan F, et al. Intraocular implants for extended drug delivery: therapeutic applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2006;58(11):1182–1202.

Bourne R, Stevens GA, White RA, et al. Causes of vision loss worldwide, 1990–2010: a systematic analysis. *Lancet Global Health*. 2013; 1: e339–e349

Braga-Mele R, Chang D, Henderson B, Mamalis N, Talley-Rostov A, Vasavada A, et al. Intracameral antibiotics: safety, efficacy, and preparation. *J Cataract Refract Surg*. 2014;40(12):2134–2142.

Chang H-I, Yeh M-K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2012 [citado 3 de outubro de 2016];7(4).

Chylack LT, Leske MC, McCarthy D, Khu P, Kashiwagi T, Sperduto R. Lens opacities classification system II (LOCS II). *Archives of Ophthalmology*. 1989;107(7):991–997.

Chylack LT, Wolfe JK, Singer DM, Leske MC, Bullimore MA, Bailey IL, et al. The lens opacities classification system III. *Archives of ophthalmology*. 1993;111(6):831–836.

Daien V, Papinaud L, Gillies MC, Domerg C, Nagot N, Lacombe S, et al. Effectiveness and Safety of an Intracameral Injection of Cefuroxime for the Prevention of Endophthalmitis After Cataract Surgery With or Without Perioperative Capsular Rupture. *JAMA ophthalmology* [Internet]. 2016 [citado 1º de junho de 2016]; Disponível em: <http://archophth.jamanetwork.com/article.aspx?articleID=2517365>

Dale M, Michael M. Liposome ocular delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*. 1995;1(16):75-93.

Davis, LT; Kumar, N; Nijm, LM. et al. An adaptable hplc method for the analysis of frequently used antibiotics in ocular samples. *Journal of Chromatography B*, 878, 2421–2426, 2010.

Del Amo EM, Urtti A. Current and future ophthalmic drug delivery systems: a shift to the posterior segment. *Drug discovery today*. 2008;13(3):135–143.

Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - dbca [Internet]. 2013. Disponível em: [http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID\\_CONTEUDO=65](http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65)

Djurdjevic P, Ciric A, Djurdjevic A, Stankov MJ. Optimization of separation and determination of moxifloxacin and its related substances by RP-HPLC. *J Pharm Biomed Anal*. 2009;50:117-126,

Ebrahim S, Peyman GA, Lee PJ. Applications of liposomes in ophthalmology. *Survey of ophthalmology*. 2005;50(2):167–182.

Farmacopéia Brasileira. 4ª ed. São Paulo:Editora Atheneu; 1988.

Espiritu CRG, Caparas VL, Bolinao JG. Safety of prophylactic intracameral moxifloxacin 0.5% ophthalmic solution in cataract surgery patients. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2007;33(1):63–68.

Farooq Q. Comparison of anti-inflammatory activity of ofloxacin plus dexamethasone eye drops and flurbiprofen eye drops in postoperative cases. *Pak J Ophthalmol*. 2003;19:122-129.

Filip M, Dragne C, Filip A, Magureanu M, Zemba M, Asandi R. Toxic anterior segment syndrome. *Oftalmologia*. 2006;50(4):27–29.

Fishman PH, Peyman GA, Lesar T. Intravitreal liposome-encapsulated gentamicina in a rabbit model. Prolonged therapeutic levels. *IOVS*. 1986; 27: 1103-1106.

Friling E, Lundström M, Stenevi U, Montan P. Six-year incidence of endophthalmitis after cataract surgery: Swedish national study. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2013;39(1):15–21.

Gonnering R. The pH tolerance of rabbit and human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1979;18:373–390.

Gregoriadis G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine. *N Engl J Med*. 1976; 295:704-706.

Gregoriadis G, Florence AT. Liposomes in drug delivery. *Drugs*.1993;45:15-28.

Gregoriadis G. Special liposome issue. *Int J Pharm* .1998; 162:1-3.

Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth edition. Committee for the update of the guide for the care and use of laboratory animals. Institute for laboratory animal research. National Academy of Sciences. 2011.

Guidelines to promote the wellbeing of animals used for scientific purposes. The assessment and alleviation of pain and distress in research animals. National Health and Medical Research Council. Australian government, 2008.

Gulsen D, Li C-C, Chauhan A. Dispersion of DMPC liposomes in contact lenses for ophthalmic drug delivery. *Current eye research*. 2005;30(12):1071–1080.

Haruki T, Miyazaki D, Matsuura K, Terasaka Y, Noguchi Y, Inoue Y, et al. Comparison of toxicities of moxifloxacin, cefuroxime, and levofloxacin to corneal endothelial cells in vitro. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2014;40(11):1872–1878.

Henriksen I, Sande SA, Smistad G, et al. In vitro evaluation of drug release kinetics from liposomes by fractional dialysis. *Int J Pharm*. 1995; 119:231-238.

ICH Q2(R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em: Agosto. 2013.

Jousma H, Talsma H, Spies F, Joosten JGH, Junginger HE, Crommelin DJA. Characterization of liposomes. The influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle sizing, particle size distribution and number of bilayers. *Int J Pharm*.1987;35:263-274.

Katzung BG. *Farmacologia Básica & Clínica*. 6ª ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan;1995.

Kaszás N, Budai M, et al. Methods to increase the encapsulation efficiency for liposomal drugs. *Acta Pharm Hung*. 2008;78(2):69-74

Keating GM. Intracameral Cefuroxime. *Drugs*. 22 de janeiro de 2013;73(2):179–86.

- Kernt M, Neubauer AS, Liegl RG, Lackerbauer CA, Eibl KH, Alge CS, et al. Intracameral moxifloxacin: in vitro safety of human ocular cells. *Cornea*. 2009;28:553-561.
- Kessel L, Flesner P, Andresen J, Erngaard D, Tendal B, Hjortdal J. Antibiotic prevention of postcataract endophthalmitis: a systematic review and meta-analysis. *Acta Ophthalmol*. junho de 2015;93(4):303–317.
- Khanna R, Pujari S, Sangwan V. Cataract surgery in developing countries. *Curr Opin Ophthalmol*. 2011; 22: 10–14.
- Kim DH, Stark WJ, O'Brien TP, Dick JD. Aqueous penetration and biological activity of moxifloxacin 0,5% ophthalmic solution and gatifloxacin 0,3% solution in cataract surgery patients. *Ophthalmology*. 2005;112:1992-1996.
- Koktekir BE, Aslan BS. Safety of prophylactic intracameral moxifloxacin use in cataract surgery. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2012;28(3):278–282.
- Kowalski RP, Romanowski EG, Mah FS, Yates KA, Gordon YJ. Intracameral Vigamox®(moxifloxacin 0.5%) is non-toxic and effective in preventing endophthalmitis in a rabbit model. *American journal of ophthalmology*. 2005;140(3):497–e1.
- Kowalski RP, Yates KA, et al. An ophthalmologist's guide to understanding antibiotic susceptibility and minimum inhibitory concentration data. *Ophthalmology*. 2005;112:1987.
- Lane SS, Osher RH, Masket S, Belani S. Evaluation of the safety of prophylactic intracameral moxifloxacin in cataract surgery. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2008;34(9):1451–1459.
- Lasic DD, Papahadjopoulos D. Medical applications of liposomes. Amsterdam:Elsevier; 1998.
- Le Boultais C, Acar L, Zia H, Sado PA, Needham T, Leverge R. Ophthalmic drug delivery systems—recent advances. *Progress in retinal and eye research*. 1998;17(1):33–58.
- Lesieur S, Gabrielle-Medelmont C, Paternostre MT, Ollivon M. Size analysis and stability study of lipid vesicles by high performance gel exclusion chromatography, turbidity and dynamic light scattering. *Anal Biochem*. 1991;192:334-43.

Lira, MCB.; Ferraz, MS; Da Silva, DGVC; Cortes, ME. et al. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2009;64:215-224.

Lira R, Lucena N, Ferreira K, dos Santos B. Long-term safety of intracameral moxifloxacin after cataract surgery. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. In press

Linertová R, Abreu-González R, García-Pérez L, Alonso-Plasencia M, Cordovés-Dorta LM, Abreu-Reyes JA, et al. Intracameral cefuroxime and moxifloxacin used as endophthalmitis prophylaxis after cataract surgery: systematic review of effectiveness and cost-effectiveness. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)*. 2014;8:1515.

Lopes LB, Oliveira AG. Lipossomas de longa circulação: estrutura e aplicações. *Infarma*. 2000;12:66-70.

Mainardes RM, Urban MC, Cinto PO, Khalil NM, Chaud MV, Evangelista RC, et al. Colloidal carriers for ophthalmic drug delivery. *Current Drug Targets*. 2005;6(3):363–371.

Matsuura K. Long-term effects of intracameral moxifloxacin. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2015;253(12):2335–2336.

Matsuura K, Miyoshi T, Suto C, Akura J, Inoue Y. Efficacy and safety of prophylactic intracameral moxifloxacin injection in Japan. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2013;39(11):1702–1706.

Meisner D, Pringle J, Mezei M. Liposomal ophthalmic drug delivery. III. Pharmacodynamic and biodisposition studies of atropine. *Int J Pharm*. 1989; 55: 105-113.

Meisner D, Mezei M. Liposome ocular delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*. 1995;16(1):75–93.

Metzler K, Hansen G, Hedlin P, Harding E, Drlica K, Blondeau J. Comparison of minimal inhibitory and mutant prevention drug concentrations of 4 fluoroquinolones against clinical isolates of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2004;24(2):161–167.

Mezei M, Meisner D. Liposomes and nanoparticles as ocular drug delivery systems. *Biopharm Ocular Drug Delivery*. Boca Raton: CRC Press; 1992.

Mishra GP, Bagui M, Tamboli V, Mitra AK. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *Journal of drug delivery* [Internet]. 2011 [citado 3 de outubro de 2016];2011. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/jdd/2011/863734/abs/>

Moisseiev E, Levinger E. Anaphylactic reaction following intracameral cefuroxime injection during cataract surgery. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2013;39(9):1432–1434.

New RRC. *Liposomes: A practical approach*. Oxford:University Press; 1990.

Niesman MR. The use of liposomes as drug carriers in ophthalmology. *Crit Rev Drug Carriers Syst*.1992;9:1-38.

O'Brien TP; Arshinoff SA; Mah FS. Perspectives on antibiotics for postoperative endophthalmitis prophylaxis: Potential role of moxifloxacin. *J Cataract Refract Surg*, 2007; 33:1790–1800.

Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol*. 2012; 96: 614–618.

Peyman GA, Khoobehi B, Tawakol M, et al. Intravitreal injection of liposome-encapsulated ganciclovir in a rabbit model. *Retina*. 1987; 7: 227-229

Sasaki S. Japanese Survey of Prophylactic Intracameral Moxifloxacin Injection. In: *The Annual ASCRS and ASOA Symposium and Congress* [Internet]. Ascrs; 2014 [citado 8 de junho de 2016]. Disponível em:<https://ascrs.confex.com/ascrs/14am/webprogram/Paper1805.html>

Schaeffer HE, Krohn DL. Liposomes in topical drug delivery. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1982;22(2):220–227.

Schlech BA, Alfonso E. Overview of the Potency of Moxifloxacin Ophthalmic Solution 0.5% (VIGAMOX®). *Survey of Ophthalmology*. 2005;50(6):7–15.

Singh K, Mezei M. Liposomal ophthalmic drug delivery system. I. Triamcinolone acetonide. *Int J Pharm*. 1983; 16: 339-344.

Stark WJ, S. A. Changing trends in intraocular lens implantation. *Arch Ophthalmol*. 1989;107:1441.

Steinert R. Cataract Surgery. 3<sup>a</sup> ed. California:Elsevier; 2010.

Taban M, Behrens A, Newcomb R, Nobe M, Saedi G, Sweet P, et al. Acute endophthalmitis following cataract surgery; a systematic review of the literature. Arch Ophthalmol. 2005;123(5):613–620.

Talsma H, Crommelin DJA. Liposomes as drug delivery systems, part. I: Preparation. Pharm Technol. 1992;16:96-106.

Thylefors B. Global data on blindness. Bulletin of the World Health Organization. 1995;73(1):115-121.

United Nations, Department of Economic. World population prospects: the 2012 revision. Sex and age distribution of the world population. New York:United Nations Publications; 2013.

Vigamox [package insert]. Fort Worth: Alcon Laboratories; 2004.

Yanoff M, Duker JS. Oftalmologia. 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.

## APÊNDICE

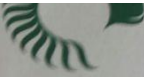
### Apêndice A - Concentração de moxifloxacino nas amostras de humor aquoso

| Coluna1 | Amostra | Area       | [] conc | [] conc / 3 (20uL) | [] conc real |
|---------|---------|------------|---------|--------------------|--------------|
|         | C2A2h   | 172755     | 1,457   | 0,486              | 1,94         |
| 2       | C1A2h   | 554694,667 | 4,535   | 1,512              | 6,05         |
|         | C3A2h   | 410847     | 3,376   | 1,125              | 4,50         |
|         |         |            |         | Média              | 4,16         |
|         |         |            |         | DP                 | 2,07         |
|         | C4A4h   | 184450,333 | 1,551   | 0,517              | 2,07         |
| 4       | C1A4h   | 78346,75   | 0,697   | 0,232              | 0,93         |
|         | C5A4h   | 143000,667 | 1,217   | 0,406              | 1,62         |
|         |         |            |         | Média              | 1,54         |
|         |         |            |         | DP                 | 0,57         |
|         | C7A8h   | 74244,6667 | 0,663   | 0,221              | 0,88         |
| 8       | C2A8h   | 22854,5    | 0,249   | 0,083              | 0,33         |
|         | C6A8h   | 20175,3333 | 0,228   | 0,076              | 0,30         |
|         |         |            |         | Média              | 0,51         |
|         |         |            |         | DP                 | 0,33         |
| 24      | C9A24h  | 21810,5    | 0,207   | 0,069              | 0,28         |
|         | C3A24h  | 17590,6667 | 0,283   | 0,094              | 0,38         |
|         | C8A24h  | 27059,3333 | 0,283   | 0,094              | 0,38         |

|    |                              |            |       |       |      |
|----|------------------------------|------------|-------|-------|------|
|    |                              |            |       | Média | 0,34 |
|    |                              |            |       | DP    | 0,06 |
| 48 | C7(b)_48h                    | 26180,6    | 0,276 | 0,092 | 0,37 |
|    | C7(b)_48h                    | 18988,3333 | 0,218 | 0,073 | 0,29 |
|    | C7(b)_48h                    | 26374      | 0,278 | 0,093 | 0,37 |
|    |                              |            |       | Média | 0,34 |
|    |                              |            |       | DP    | 0,05 |
|    | Metodologia:                 |            |       |       |      |
|    | 50 uL de H.A + 150 uL de ACN |            |       |       |      |
|    | Diluição 4x                  |            |       |       |      |
|    | Vol. de injeção 60 uL        |            |       |       |      |

## ANEXOS

### Anexo A - Parecer do comitê de ética animal

 Av. FEE, Nelson Chaves, s/n.  
50670-620 / Recife - PE - Brasil  
Fones: (55 81) 2126 8849 / 2126 8351  
Fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br

Recife, 19 de agosto de 2015

Ofício nº 78/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: Prof.ª Kaline Sandrelli Alves Ferreira  
Departamento Oftalmologia HC, CCS  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076.011824/2015-11

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado "**Desenvolvimento e Caracterização de Lipossomas contendo cloridrato de moxifloxacino**".

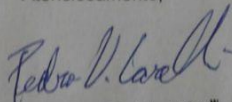
Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Fazenda: Sítio Cabanha Coelho, 225-Zona Rural, Lagoa DE Itaenga-Pe; Animal; Coelhos; Idade; 18 a 20 semanas; Peso; 1.500 a 2.000g; Sexo; fêmea; Nº total de animais; 24

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. Pedro V. Carelli  
CCB, CCS, UFPE