



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021020127-4 A2

(22) Data do Depósito: 06/10/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
18/04/2023

(54) Título: FORMULAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE COMPOSTO HÍBRIDO DE FTALIMIDA COM BUDESONIDA E SEU USO COMO ANTI-INFLAMATÓRIO PARA TRATAMENTO DE INFLAMAÇÕES OCULARES

(51) Int. Cl.: A61K 31/4035; A61K 9/51; A61K 47/10; A61K 31/57; C07D 209/48; (...).

(52) CPC: A61K 31/4035; A61K 9/51; A61K 47/10; A61K 31/57; C07D 209/48; (...).

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP; UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO - UNESP; INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO - IPT.

(72) Inventor(es): MARIA CHRISTINA CAMASMIE PETERS; CHUNG MAN CHIN; ISABELA FERNANDES DE OLIVEIRA; JEAN LEANDRO DOS SANTOS; MARCELLA GABRIELLE MENDES MACHADO; MARIA HELENA AMBROSIO ZANIN; NADIA ARACI BOU CHACRA.

(57) Resumo: FORMULAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE COMPOSTO HÍBRIDO DE FTALIMIDA COM BUDESONIDA E SEU USO COMO ANTI-INFLAMATÓRIO PARA TRATAMENTO DE INFLAMAÇÕES OCULARES. A presente invenção descreve a obtenção de nanocristais de um composto híbrido derivado de ftalimida associada com budesonida utilizando a moagem via úmida em escala reduzida e planejamento de experimentos denominado projeto fatorial (DoE), visando promover sua solubilidade de saturação e velocidade de dissolução em água, assim como, reduzir o tamanho da partícula para escala nanométrica, promovendo sua adequada biodisponibilidade. Deste modo, primeiramente, a presente invenção propõe uma formulação otimizada para o desenvolvimento de nanocristais do candidato a fármaco, sendo 1,0% (m/m) do composto híbrido de ftalimida com budesonida e 0,092% (m/m) de cloreto de cetilpiridínio. O sucesso surpreendente dessa formulação foi confirmado pelas avaliações morfológicas e físico-químicas dos nanocristais do candidato à fármaco. Adicionalmente, a presente invenção também propõe o uso da referida formulação contendo os nanocristais que apresentam características únicas para o tratamento de doenças inflamatórias, na forma de preparações oftálmicas.



**FORMULAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE COMPOSTO HÍBRIDO DE FTALIMIDA
COM BUDESONIDA E SEU USO COMO ANTI-INFLAMATÓRIO PARA
TRATAMENTO DE INFLAMAÇÕES OCULARES**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo da química medicinal e, mais especificamente, no campo da nanobiotecnologia, uma vez que se refere à obtenção de nanocristais de um composto híbrido derivado de ftalimida associada com budesonida utilizando a moagem via úmida em escala reduzida e planejamento de experimentos denominado projeto fatorial (DoE). A aplicação da técnica neste composto permite o desenvolvimento de uma formulação contendo nanocristal anti-inflamatório eficaz no tratamento de inflamações oculares seguida ou não de infecções.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Geralmente, os glicocorticoides são utilizados como anti-inflamatórios, imunossupressores e antiangiogênicos no tratamento de doenças inflamatórias oculares. No entanto, essa terapia possui uso limitado devido a efeitos adversos locais, incluindo catarata e hipertensão. Esse último influenciando na incidência de glaucoma. Derivados de ftalimida foram relatados na literatura com significativa atividade anti-inflamatória e antiangiogênica. A ftalimida é o grupo farmacofórico da talidomida, desprovido de efeito teratogênico e atua como um inibidor do fator de necrose tumoral (TNF- α).

[003] Para obter melhor perfil terapêutico, com maior potência e menos efeitos adversos, Machado, Scarim, Andrade, Santos e Chin (2019) sintetizaram derivado esteroide anti-inflamatório. Esse candidato a fármaco

consiste em hibridação molecular da fitalimida associada à budesonida, conforme ilustra a Figura 1. Entretanto, o referido candidato a fármaco apresenta baixa solubilidade em água, inviabilizando seu uso terapêutico. Desta forma, a alternativa estratégica para a administração de fármacos de uso oftálmico refere-se ao uso de nanocristais desse composto, com potencial para melhorar a biodisponibilidade da preparação oftálmica (doses mais baixas e com menor frequência de administração), melhorando a adesão do paciente ao tratamento.

[004] Nanocristais são partículas de fármacos sem material matricial, como lipídios, estabilizados por tensoativos e/ou polímeros. Esses permitem a estabilização estérica ou elétrica impedindo a agregação das partículas (fenômeno Ostwald ripening), viabilizando, assim, a nanossuspensão (nanocristais em meio aquoso). A dispersão de nanocristais de fármaco em meios líquidos, normalmente água, é chamada de nanossuspensão. Os nanocristais melhoram efetivamente a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água, devido ao aumento da solubilidade da saturação e da velocidade de dissolução do fármaco, e mucoadesividade proporcionada pela redução do raio das partículas e consequente aumento da área superficial.

[005] Além disso, o emprego de estabilizantes catiônicos em formulações oftálmicas de uso tópico permite a interação entre cargas opostas desse e a mucina. A mucina é uma proteína fortemente glicosilada carregada negativamente devido à associação com resíduos de ácido siálico e sulfato. Essa proteína está presente no filme lacrimal, aumentando, desse modo, o tempo de retenção de

formulação catiônica no olho devido à interação eletrostática entre as cargas opostas (produto x mucina).

[006] No entanto, uma abordagem racional sistemática é necessária no desenvolvimento de nanocristais para selecionar os parâmetros adequados do processo e seus componentes (tensoativo) e sua concentração. A seleção de tensoativos, principalmente em aplicação oftálmica, é de fundamental importância em função de sua toxicidade. Poucos são aqueles aprovados para uso ocular local e ainda com reduzida concentração. Assim, essa tarefa é árdua e parte crítica do desenvolvimento da formulação com características adequadas para a utilização (estabilidade, qualidade etc.).

[007] Além disso, o conceito de espaço de design no desenvolvimento farmacêutico tem sido considerado etapa importante. A determinação desse espaço pode ser efetuada por meio de delineamento experimental. Essa abordagem oferece garantia de qualidade e entendimento do produto e do processo empregando combinação multivariada e interação de variáveis de entrada. Portanto, esse estudo está focado no desenvolvimento de nanocristal catiônico, inovador candidato a fármaco para administração oftálmica no tratamento de doenças inflamatórias, usando abordagem estatística, com potencial aplicação no uso da preparação oftálmica (Figura 2). Os nanocristais permitirão a administração de doses reduzidas e com maior intervalo entre as administrações, promovendo maior adesão do paciente ao tratamento.

ESTADO DA TÉCNICA

[008] No estado da técnica existem diversos trabalhos relacionados à obtenção de nanocristais de composto híbrido derivado anti-inflamatório (ftalimida

associado com budesonida) para tratamento de inflamações oculares a partir do processo moagem via úmida em escala reduzida, por exemplo:

[009] O documento científico intitulado "SUBCONJUNCTIVAL NANO- AND MICROPARTICLES SUSTAIN RETINAL DELIVERY OF BUDESONIDE, A CORTICOSTEROID CAPABLE OF INHIBITING VEGF EXPRESSION" e o pedido de patente US 2009/312724 intitulado "NASAL AND OPHTHALMIC DELIVERY OF AQUEOUS CORTICOSTEROID SOLUTIONS" referem-se aos tratamentos que fazem uso do fármaco budesonida, descrevendo-o como um corticosteroide. O artigo científico descreve os resultados de estudos que fazem a administração sustentada do referido fármaco através do uso da nanotecnologia, descrevendo, ainda, que este fármaco é um medicamento de escolha para o tratamento de doenças inflamatórias. O pedido de patente, por sua vez, refere-se aos tratamentos oftálmicos que podem utilizar corticosteroides como terapia direta ao tecido, adicionalmente, o referido documento cita budesonida como opção e, ainda, revela sobre a opção da forma de administração desta através do uso de nanocristais.

[010] É descrito no estado da técnica que a budesonida é um corticosteroide e que essa é a classe de medicamentos de escolha para o tratamento de doenças inflamatórias, incluindo um tratamento oftálmico. Entretanto, tal atividade terapêutica apenas direciona a presente invenção a desenvolver uma formulação única que permite maior eficácia e segurança no uso dessa classe de fármacos. Ainda, a presente invenção utiliza o candidato a fármaco que é um composto híbrido de budesonida com ftalimida, ou seja, não é o fármaco budesonida comercial isolado. Trata-se de um

composto sintetizado e nunca relatado. Ressalta-se que cada composto apresenta características únicas que irão exigir uma formulação adequada e específica de acordo com suas características físico-químicas. Até mesmo substituições simples de átomos (como por exemplo a substituição de um átomo de cloro por um de flúor) alteram substancialmente as características de um composto.

[011] Destaca-se que os métodos para o desenvolvimento da formulação, os parâmetros do processo e os componentes (tensoativos) selecionados determinam o sucesso da formulação inovadora. Nesse contexto, o processo utilizado na presente invenção é totalmente diferente daquele descrito nos documentos citados. A formulação desenvolvida pela presente invenção utiliza, surpreendentemente, o cloreto de cetilpiridínio, não aplicado nas formulações citadas nas anterioridades. Tal fato nunca foi relatado, seja para uso oftálmico, ou para qualquer outro produto. O cloreto de cetilpiridínio geralmente não é utilizado como tensoativo, apenas como conservante. Contudo, as características físico-químicas únicas do composto híbrido desenvolvido foram capazes de permitir o uso desse tensoativo, assim, essa combinação entre o composto e o cloreto de cetilpiridínio é única e surpreendente.

[012] O documento científico intitulado “NANOCRYSTALS: AN OVERVIEW OF FABRICATION, CHARACTERIZATION AND THERAPEUTIC APPLICATIONS IN DRUG DELIVERY” refere-se aos nanocristais e suas vantagens frente a baixa solubilidade de fármacos. Adicionalmente, o documento revela sobre a aplicabilidade e entrega oftálmica desta técnica, bem como

descreve sobre o processo de moagem de via úmida em conjunto com o fármaco budesonida e, ainda, é descrito o uso de cloreto de cetilpiridínio como agente estabilizador.

[013] As vantagens do emprego de nanocristais para melhorar a solubilidade de saturação de fármacos são bem consolidadas. Tal conhecimento descrito no estado da técnica foi o direcionamento para o desenvolvimento da formulação de nanocristal do candidato a fármaco conforme revelada na presente invenção. Porém, cada composto ativo é único e não existe fórmula "padrão" ou processo padrão. O desenvolvimento de uma fórmula, mesmo empregando métodos convencionais, requer um extenso período de dedicação e trabalho intelectual dos inventores.

[014] Assim, o processo e a formulação conforme revelados na presente invenção são únicos e particulares, diferenciando-se completamente do resultado apresentado na anterioridade citada. Ainda, ressalta-se que não é possível prever qual o tamanho médio de partícula que será obtido para o nanocristal, através da técnica de moagem via úmida, uma vez que essa característica é dependente de vários fatores. Tendo-se estabelecido esses fatores únicos, alcança-se uma nova formulação, também única. Adicionalmente, a presente invenção revela nanocristais de budesonida empregando como estabilizante da formulação o manitol ou o Pluronic F68. O nanocristal obtido, surpreendentemente, foi estável utilizando apenas o cloreto de cetilpiridínio como estabilizante. Do mesmo modo, a anterioridade citada utiliza o cloreto de cetilpiridínio, porém em conjunto com os fármacos dexametasona e polimixina B e não cita a concentração/proporção do tensoativo e dos fármacos na

formulação. Destaca-se que a simples mistura de fármacos e tensoativos, como na anterioridade, não é capaz de resultar em fórmulas de sucesso.

[015] O documento científico intitulado "SYNTHESIS AND ANTI-INFLAMMATORY INTESTINAL ACTIVITY OF NEW GLUCOCORTICOID DERIVATIVES" apesar de não ser direcionado a patologias oculares, refere-se à budesonida e à ftalimida como conhecidos agentes anti-inflamatórios e, adicionalmente, o documento revela a síntese de moléculas híbridas de ftalimida e budesonida que podem utilizadas como um potente tratamento anti-inflamatório.

[016] O referido artigo demonstra a síntese dos compostos derivados (budesonida e a ftalimida) e os ensaios em processo inflamatório intestinal. Sendo o estudo que selecionou o fármaco utilizado na presente invenção. A seleção foi fundamentada na limitação do uso terapêutico desse composto, ou seja, a baixa solubilidade em água. Ainda que fosse possível usar os compostos, as suas características físico-químicas (solubilidade) não permitiriam a aplicação ocular (gotas), em função do reduzido volume empregado. Dessa maneira, com volume reduzido, não é possível alcançar concentração terapêutica. Na anterioridade citada não foi desenvolvida qualquer formulação, apenas descrita a síntese de compostos. Adicionalmente, a anterioridade não sugere ensina ou revela a possibilidade de produzir nanocristais a partir deste fármaco. Assim, a presente invenção propõe o desenvolvimento de nanocristais e soluciona o problema de baixa solubilidade em água do referido fármaco híbrido. Sem essa solução não haveria produto e tampouco a possibilidade desse candidato a fármaco ser comercializado.

[017] O documento de patente intitulado "CETYLPYRIDINIUM CHLORIDE AS AN ANTIMICROBIAL AGENT IN OPHTHALMIC COMPOSITIONS" refere-se ao uso do tensoativo catiônico cloreto de cetilpiridínio como agente antimicrobiano em composições oftálmicas.

[018] A anterioridade apenas descreve o conhecimento básico do emprego de cloreto de cetilpiridínio em formulações oftálmicas devido a sua ação antimicrobiana. A presente invenção se baseia justamente na sua ação antimicrobiana já conhecida e, assim, propõe uma formulação que utiliza uma concentração menor que 0,1% m/m de cloreto de cetilpiridínio. A referida formulação apresentou estabilidade, ou seja, não houve aumento do tamanho médio de partícula, com apenas o uso desse tensoativo. A combinação entre o derivado híbrido de budesonida e ftalimida em conjunto com esse tensoativo faz com que a formulação seja única e surpreendente. Nessa formulação é a ação tensoativa do cloreto de cetilpiridínio que resulta na inovação, não a aplicação desse como agente antimicrobiano, como revelado na anterioridade citada.

[019] O documento científico intitulado "ADVANCES IN OPHTHALMIC PREPARATION: THE ROLE OF DRUG NANOCRYSTALS AND LIPID-BASED NANOSYSTEMS" refere-se à aplicação da nanotecnologia para produção de nanocristais que possuem o foco nos tratamentos de patologias oculares. Ainda, o referido documento cita o uso de corticoides em conjunto com o cloreto de cetilpiridínio, atuando como agente estabilizador produzidos através da técnica de moagem via úmida, para o tratamento da inflamação ocular.

[020] Os corticoides são amplamente difundidos como anti-inflamatórios utilizados em aplicações oftálmicas, o cloreto de cetilpiridínio também é um agente estabilizador de amplo conhecimento público e, ainda, uma das principais técnicas para desenvolvimento de nanocristais é a moagem via úmida. Todavia, o simples fato dessas informações serem reveladas, individualmente, não significa sucesso para o preparo de uma formulação contendo nanocristal. Conforme exposto anteriormente, cada fármaco “reage” de forma diferente aos componentes de uma formulação, esse conhecimento não pode ser totalmente previsto, ainda que as tecnologias auxiliem na seleção. O fato de as substâncias para uso farmacêutico serem classificadas, como por exemplo agente estabilizador, agente antimicrobiano e tensoativos, não significa que essas funcionarão em todas as formulações.

[021] Adicionalmente, o único exemplo de formulação descrita na anterioridade utiliza acetato de dexametasona e polimixina B para o desenvolvimento dos nanocristais. Na formulação conforme revelada na presente invenção, o candidato a fármaco (composto híbrido de budesonida com ftalimida) tem características próprias, tornando-o único. Assim, são indivíduos muito diferentes que reagem particularmente com cada tensoativo. Sendo assim, a formulação de nanocristal proposta é inédita, pois o composto híbrido utilizado no sistema apresenta característica farmacológica otimizada quando comparado aos corticoides disponíveis, ainda, o nanocristal, que é o eixo da tecnologia, visa solucionar um problema apresentado pelas características físico-química da nova molécula, e

possibilita a aplicação nos usos descritos por prover uma tecnologia que resolva um problema enfrentado atualmente.

[022] O documento científico intitulado "DEVELOPMENT OF CATIONIC NANOCRYSTALS FOR OCULAR DELIVERY" refere-se ao uso de nanocristais catiônicos, que são desenvolvidos com corticoides e cloreto de cetilpiridínio, que atua como conservante e estabilizante, para o tratamento oftálmico. Adicionalmente, o processo utilizado para preparar os referidos nanocristais ocorre através da técnica de moagem úmida.

[023] Contudo, de acordo com os conhecimentos revelados na presente invenção e, conforme discutido anteriormente, cada fármaco reage de forma diferente aos componentes de uma formulação e esse conhecimento não pode ser totalmente previsto, ainda que as tecnologias auxiliem na seleção. O candidato a fármaco (composto híbrido de budesonida com ftalimida) revelado na presente invenção possui características próprias, diferentes do acetato de dexametasona e polimixina B. Assim, são compostos muito diferentes que reagem particularmente a cada tensoativo, tornando o conhecimento da presente invenção inédito frente ao estado da técnica.

[024] Adicionalmente, a formulação proposta na presente invenção foi obtida com sucesso empregando apenas tensoativo catiônico, usualmente utilizado como antimicrobiano em preparações oftálmicas de múltipla dose. A faixa permitida para o uso desse antimicrobiano é de 0,05-0,1% (m/m). De forma inesperada, a concentração de 0,1% (m/m) foi capaz de estabilizar a formulação, sem empregar qualquer outro agente estabilizante.

[025] Assim, a presente invenção permite esclarecer a dupla função do tensoativo catiônico (antimicrobiano e estabilizante), um caso que não existia até então no mercado e nunca fora antes relatado na literatura. Isso se deve à interação única e exclusiva desses dois componentes (ativo e tensoativo).

[026] Além disso, é notório saber que a simples mistura de quaisquer componentes não constitui uma fórmula farmacêutica. Uma formulação farmacêutica de sucesso é constituída da mistura de componentes únicos com interações particulares. Dessa maneira, o desenvolvimento de produto farmacêutico requer muito estudo e, portanto, tempo. Além disso, destaca-se que a formulação desenvolvida apresentou tamanho médio de partícula de 165nm, sendo tamanho surpreendentemente pequeno em comparação com os nanocristais em desenvolvimento para uso oftálmico (tamanho mínimo próximo de 211 nm).

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[027] A presente invenção revela a obtenção de nanocristais de um composto híbrido derivado de ftalimida associada com budesonida utilizando a moagem via úmida em escala reduzida e planejamento de experimentos denominado projeto fatorial (DoE), visando promover sua solubilidade de saturação e velocidade de dissolução em água, assim como, reduzir o tamanho da partícula para escala nanométrica, para sua adequada biodisponibilidade.

[028] Deste modo, em uma primeira modalidade, a presente invenção propõe uma formulação otimizada para o desenvolvimento de nanocristais do candidato a fármaco, sendo 1,0% (m/m) do composto híbrido de ftalimida com

budesonida e 0,092% (m/m) de cloreto de cetilpiridínio. O sucesso surpreendente dessa formulação foi confirmado pelas avaliações morfológicas e físico-químicas dos nanocristais do candidato a fármaco.

[029] Em uma segunda modalidade, a presente invenção propõe o uso da referida formulação contendo os nanocristais que apresentam características únicas para o tratamento de doenças inflamatórias, na forma de preparações oftálmicas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[030] Para auxiliar na identificação das principais características da presente invenção, são apresentadas as figuras às quais se faz referências, conforme se segue:

[031] A figura 1 ilustra através de imagens em 2D e 3D a estrutura molecular do candidato a fármaco. A nomenclatura do composto híbrido é como segue: 2-(7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-10-propil - 2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a, 12b - dodecahidro-1H-naftol[2'1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil 4-(1-3-dioxo isoindolin-2-il)benzoato.

[032] A Figura 2 ilustra, esquematicamente, o processo de desenvolvimento da nanossuspensão do candidato a fármaco.

[033] A figura 3 ilustra, através do Gráfico de Pareto, a significância das variáveis no modelo; em que: DHM significa diâmetro hidrodinâmico médio e BAK significa cloreto de benzalcônio.

[034] A figura 4 ilustra, através do Gráfico de Resíduos, o modelo estatístico das formulações de

nanocristal do candidato a fármaco contendo cloreto de benzalcônio; em que: DHM significa diâmetro hidrodinâmico médio.

[035] A figura 5 ilustra, através do Gráfico de Contorno, a avaliação do DHM do nanocristal de candidato a fármaco, cujas variáveis são: concentração de poloxamer 407 (%m/m), concentração de cloreto de benzalcônio (% m/m) e velocidade de agitação (rpm). Em que: DHM significa diâmetro hidrodinâmico médio e BAK significa cloreto de benzalcônio.

[036] A figura 6 ilustra, através do Gráfico de Pareto, a significância das variáveis no modelo, em que DHM significa diâmetro hidrodinâmico médio e CPC significa cloreto de cetilpiridínio.

[037] A figura 7 ilustra, através do Gráfico de Resíduos, o modelo estatístico das formulações de nanocristal de candidato a fármaco.

[038] A figura 8 ilustra, através do Gráfico de Contorno, a avaliação do DHM do nanocristal de candidato a fármaco, cujas variáveis são: concentração de poloxamer 407 (%m/m), concentração de cloreto de cetilpiridínio (%m/m) e velocidade de agitação (rpm). Em que DHM significa diâmetro hidrodinâmico médio e CPC significa cloreto de cetilpiridínio.

[039] A figura 9 ilustra, através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), o composto híbrido.

[040] A figura 10 ilustra, através da MEV, os nanocristais do candidato a fármaco.

[041] A figura 11 ilustra a estrutura molecular do composto híbrido.

[042] A figura 12 ilustra, através do Espectro de Ressonância Magnética Nuclear, a formulação de nanocristal do candidato a fármaco (RMN- C^{13} , 75 MHz, DMSO d_6).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[043] A presente invenção refere-se à obtenção de nanocristais de um composto híbrido derivado de ftalimida associada com budesonida utilizando a moagem via úmida em escala reduzida e o planejamento de experimentos denominado projeto fatorial (DoE).

[044] Assim, em uma primeira modalidade, a presente invenção descreve uma formulação otimizada com os nanocristais do candidato a fármaco, sendo 1,0% (m/m) do composto híbrido de ftalimida com budesonida e 0,092% (m/m) de cloreto de cetilpiridínio. O sucesso surpreendente dessa formulação foi confirmado pelas avaliações morfológicas e físico-químicas dos nanocristais do candidato à fármaco.

[045] Essa formulação selecionada (preparação ampliada) alcançou o tamanho de partícula conforme proposto no modelo estatístico e não apresentou agregação na amostra, pelo menos quatro meses após sua preparação (DHM final: $163,5 \pm 4,6$ nm), quando armazenada a 4°C e sob abrigo da luz. O pH dessa formulação foi ajustado para 7,42 e a viscosidade possui a média de $1,39 \pm 0,02$ cP $23,27 \pm 0,31\%$.

[046] Na MEV observa-se que as partículas, quando submetidas ao processo de moagem possuem caráter amorfo (Figuras 9 e 10). Essa característica é particularmente interessante, já que partículas amorfas têm sua solubilidade aumentada entre 1,1 e 1000 vezes, quando comparada às partículas com estrutura cristalina. A média dos tamanhos das partículas do composto original e da formulação de

nanocristal foram de $1644,7 \pm 787,7$ e $177,3 \pm 50,8$ nm, respectivamente. Assim, é possível inferir que o processo de moagem promoveu a redução de 89,22% do tamanho de partícula. A análise de variância (ANOVA) corroborou com esse resultado, mostrando que a alteração foi significativa ($\alpha < 0,05$).

[047] A avaliação da presença do composto híbrido na formulação e subsequentemente da ocorrência de reação de hidrólise no carbono estérico 1' do composto, Figura 11, foi realizada por meio de RMN- C^{13} . Referente ao carbono estérico $C1'$, o pico obtido foi em 170,020 ppm, enquanto no espectro de referência, o pico está contido em 170,24 ppm. Essa proximidade de valores representa forte indício de que a ligação se manteve intacta durante o processo (Figura 12). Pode-se concluir que as similaridades observadas nos espectros de RMN- C^{13} obtidos na presente invenção e Machado, Scarim, Andrade, Santos e Chin (2019) sugerem não somente a presença do composto híbrido na preparação de nanocristais, como também, que o candidato a fármaco não sofre reação de hidrólise na carbonila contida no carbono 1'. Assim, pode-se inferir que o processo de moagem em escala reduzida não promoveu a quebra do composto.

[048] Os tensoativos utilizados nas preparações foram eficientes em promover estabilidades estérica (poloxamer 407) e eletrostática devido à repulsão de cargas positivas dos tensoativos catiônicos (cloreto de cetilpiridínio e cloreto de benzalcônio), permitindo a redução do tamanho da partícula do candidato a fármaco.

[049] A fórmula abaixo representa a composição final da formulação desenvolvida na presente invenção:

Ingrediente	Quant. (g)
Composto híbrido de ftalimida com budesonida	0,01
Cloreto de cetilpiridínio	0,00092
Água ultrapura (q.s.p)	1,0

Parâmetros do processo: 0,200 g de esferas de zircônio e duas barras magnéticas cilíndricas (3,0 x 5,0 mm). O sistema foi submetido a agitação em 800rpm durante 96 horas.

[050] Em uma segunda modalidade, a presente invenção propõe o uso da referida formulação contendo os nanocristais que apresentam características únicas para o tratamento de doenças inflamatórias oculares (segmento anterior ou posterior do olho), na forma de preparações oftálmicas preferencialmente de uso tópico (colírio).

Testes Comprobatórios de Eficácia

[051] Para demonstrar o potencial da formulação obtida e comprovar sua eficácia, a presente invenção será mais detalhadamente descrita sob aspecto de testes realizados assim como dos seus respectivos resultados obtidos. Assim, foram realizados os seguintes testes após o processo de preparo dos nanocristais do composto híbrido (candidato a fármaco) empregando moagem via úmida em escala reduzida:

1. Testes exploratórios para seleção de variáveis estatísticas;
2. Teste exploratório para avaliar o desempenho de reduzida concentração de tensoativos catiônicos na formulação;
3. Planejamento de experimento empregando método de superfície de resposta para otimização da

- formulação de nanocristal de candidato a fármaco;
- 4. Verificação do modelo matemático para otimização da
formulação de nanocristal do candidato a fármaco;
- 5. Obtenção das preparações em quantidade 10 g;
- 6. Liofilização;
- 7. Caracterização morfológica e físico-química
 - 7.1. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) da
partícula e índice de polidispersão (IP);
 - 7.2. Microscopia Eletrônica de Varredura;
 - 7.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN-¹³C);
- 8. Ajuste de parâmetros oftálmicos
 - 8.1. pH;
 - 8.2. Viscosidade aparente.

[052] Os exemplos a seguir têm o intuito apenas de ilustrar, sem limitar o escopo da presente invenção. Quaisquer variações passíveis de serem realizadas por um técnico no assunto devem ser consideradas como dentro do escopo da presente invenção.

Testes exploratórios para seleção de variáveis estatísticas

[053] Para o primeiro ensaio exploratório, as formulações do candidato a fármaco foram desenvolvidas aplicando moagem via úmida em escala reduzida (laboratorial), adaptada de ROMERO; KECK; Müller (2016). A câmara de moagem consistia em um frasco de vidro âmbar de 2,0 mL. O sistema foi composto por 2 barras de agitação magnéticas cilíndricas (3,0 x 5,0 mm), 0,200 g de esferas de óxido de zircônio estabilizadas com ítria e as suspensões de 3% de composto híbrido e 3% de tensoativo (todos m/m). Diferentes tensoativos foram testados, sendo não iônicos: poloxamer 407

(copolímero de bloco sintético de óxido de etileno e óxido de propileno) (F1), poloxamer 188 ($C_3H_6O.C_2H_4O$)_x (F2), polissorbatato 80 (monoleato de sorbitan etoxilado) (F3) e tocoferol polietileno glicol succinato (TPGS) (F4) e catiônicos: cloreto de cetilpiridínio (F5) e cloreto de benzalcônio (F6), conforme descrito na Tabela I. O volume final foi ajustado com água purificada para 1,0 g. Os frascos foram agitados aplicando 2 barras de agitação cilíndricas (3,0 x 5,0 mm) em uma placa de agitação magnética RCT básica a 800 rpm por 96 horas.

[054] Posteriormente, um segundo ensaio exploratório foi desenvolvido com concentração de composto a 1,0% (m/m) e tensoativo a 1,0% (m/m), alterando a quantidade de esferas de óxido de zircônio estabilizadas com ítria no sistema, o tensoativo empregado e a velocidade do processo, conforme descrito na Tabela I. Todas as formulações tiveram a medição do diâmetro hidrodinâmico médio (z-ave) e do potencial zeta (ZP) realizado no final do processo de moagem e durante o armazenamento a 4°C.

Tabela I: Tensoativos e parâmetros de processo utilizados nos estudos exploratórios para preparação de nanocristais de candidato a fármaco.

Nanossuspensão	candidato	Tensoativo	Esferas de	Velocidade
	a fármaco		zircônio	de
	(m/m%)		(g)	agitação
				(rpm)
Primeiro ensaio exploratório				
F1	3,0	poloxamer 407	0,200	800
		(3,0 wt%)		

F2	3,0	poloxamer 188 (3,0 wt%)	0,200	800
F3	3,0	polissorbato 80 (3,0 wt%)	0,200	800
F4	3,0	TPGS (3,0 wt%)	0,200	800
F5	3,0	CPC (3,0 wt%)	0,200	800
F6	3,0	BAK (3,0 wt%)	0,200	800
Segundo ensaio exploratório				
F7	1,0	poloxamer 407 (1,0 wt%)	0,200	800
F8	1,0	CPC (1,0 wt%)	0,200	800
F9	1,0	BAK (1,0 wt%)	0,200	800
F10	1,0	poloxamer 407 (1,0 wt%)	0,300	1200
F11	1,0	CPC (1,0 wt%)	0,300	1200
F12	1,0	BAK (1,0 wt%)	0,300	1200
Ensaio exploratório com mínima concentração do tensoativo catiônico				
F13	1,0	CPC (0,05 wt%)	0,200	800
F14	1,0	CPC (0,10 wt%)	0,200	800
F15	1,0	BAK (0,05 wt%)	0,200	800
F16	1,0	BAK (0,10 wt%)	0,200	800

TPGS: tocopherol polyethylene glycol succinate; CPC: cloreto de cetilpiridínio; BAK: cloreto de benzalcônio

[055] O diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) para as formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 está indicado Tabela II. Destacamos as formulações com poloxamer 407, cloreto de cetilpiridínio e cloreto de benzalcônio, que apresentaram valores de $237,5 \pm 20,8$ a $227,8 \pm 1,4$ nm; $237,8 \pm 2,9$ nm a $200,0 \pm 2,9$ nm e $150,0 \pm 2,2$ nm a $139,9 \pm 2,0$ nm, respectivamente, nos 30 dias monitorados.

[056] A formulação de polissorbato 80 apresentou aumento de tamanho de $239,2 \pm 16,6\text{nm}$ para $545,6 \pm 86,8\text{nm}$ e IP de $0,428 \pm 0,290$ no 30° dia. A formulação com poloxamer 188 apresentou tamanho superior a 500 nm. Portanto, não apresentaram a redução esperada. Os valores do potencial zeta estão apresentados na Tabela III. As formulações empregando tensoativos catiônicos CPC e BAK apresentaram valores entre $+48,3 \pm 1,9$ a $+62,3 \pm 7,1$ mV e $+43,3 \pm 0,9$ a $+45,3 \pm 1,8$ mV, respectivamente.

[057] Os resultados do segundo ensaio exploratório para as medidas de tamanho (DHM), PDI e potencial zeta estão apresentados nas tabelas IV e V, respectivamente.

Tabela II: DHM e IP das nanossuspensões 3,0% (m/m) do candidato a fármaco variando os tensoativos utilizados na proporção 1:1.

Formulação	T ₀		3 dias		7 dias		21 dias		30 dias	
	DHM (nm)	IP	DHM (nm)	IP	DHM (nm)	IP	DHM (nm)	IP	DHM (nm)	IP
F1	237,5±20,8	0,202±0,008	196,7±4,7	0,507±0,100	134,1±2,8	0,527±0,017	257,7±3,9	0,142±0,061	227,8±1,4	0,149±0,046
F2	937,6±249,8	0,251±0,238	553,0±111,9	0,379±0,183	629,0±23,8	0,333±0,073	-	-	-	-
F3	239,2±16,6	0,183±0,180	274,8±24,2	0,203±0,112	264,7±24,7	0,179±0,121	341,3±7,9	0,136±0,046	545,6±86,8	0,428±0,290
F4	348,9±25,3	0,148±0,135	301,9±5,1	0,142±0,015	314,6±5,0	0,170±0,049	207,8±2,6	0,190±0,017	335,0±2,9	0,207±0,006
F5	237,8±2,9	0,293±0,107	242,0±3,2	0,245±0,100	261,7±2,1	0,163±0,013	197,4±1,7	0,170±0,026	200,0±2,9	0,177±0,031
F6	150,0±2,2	0,203±0,0	145,8±1,9	0,189±0,013	141,8±0,8	0,196±0,007	136,3±1,9	0,197±0,011	139,9±2,0	0,203±0,002

Parâmetros do processo: 0,200 mg esferas de zircônia e velocidade agitação de 800 rpm. F1: poloxamer 407, F2: poloxamer 188, F3: polissorbato 80, F4: TPGS, F5: cloreto de cetilpiridínio, F6: cloreto de benzalcônio (-): não monitorado devido agregação. T0: medida realizada no momento de término do processo de moagem.

Tabela III: Potencial zeta (mV) das formulações com 3% (m/m) de candidato a fármaco, variando os tensoativos utilizados (1:1).

Formulação	T ₀	Monitoramento após término do processo			
		(dias)			
		3	7	21	30
F1	-7,0±0,5	-7,6±0,3	-9,1±0,2	-13,8±0,1	-10,2±0,3
F2	-6,2±1,6	-7,8±0,4	-10,4±0,2	-	-
F3	-20,6±0,5	-18,6±0,4	-16,4±0,5	-22,4±0,5	-17,4±0,4
F4	-8,9±0,5	-9,4±0,1	-9,9±0,3	-5,0±0,4	-6,4±0
F5	+62,3±7,1	+62,1±0,3	+58,5±0,6	+48,3±1,9	+56,0±1,9
F6	+45,3±1,8	+43,9±0,6	+43,3±0,9	+44,3±0,7	+45,1±1,1

Parâmetros do processo: 0,200 mg esferas de zircônia e velocidade agitação de 800 rpm. F1: poloxamer 407, F2: poloxamer 188, F3: polissorbato 80, F4: TPGS, F5: cloreto de cetilpiridínio, F6: cloreto de benzalcônio (-): não monitorado devido agregação. T0: medida realizada no momento de término do processo de moagem.

Tabela IV: DHM e IP para as nanossuspensões com 1% (m/m) de candidato a fármaco variando os tensoativos (1:1) e os parâmetros de processo utilizados.

Formula	T ₀		3 dias		7 dias		21 dias		30 dias	
ção	DHM (nm)	IP	DHM (nm)	IP	DHM (nm)	IP	DHM (nm)	IP	DHM (nm)	IP
F7^α	244,9±2,3	0,235±0,089	247,4±2,3	0,172±0,030	219,5±4,6	0,189±0,007	175,6±1,0	0,132±0,012	233,4±1,5	0,249±0,018
F8^α	99,1±2,0	0,218±0,007	94,7±0,9	0,222±0,002	87,4±1,2	0,183±0,009	96,3±1,9	0,184±0,012	103,2±0,6	0,249±0,009
F9^α	107,8±2,3	0,248±0,006	103,0±1,4	0,237±0,006	100,7±1,6	0,225±0,009	93,4±0,5	0,194±0,016	95,2±0,9	0,203±0,005
F10^β	201,0±2,9	0,209±0,034	193,8±3,2	0,208±0,012	183,9±1,0	0,184±0,010	162,4±0,4	0,144±0,017	156,6±1,3	0,124±0,022
F11^β	185,0±0,8	0,203±0,014	214,4±0,7	0,181±0,018	233,7±2,8	0,234±0,012	247,0±3,8	0,253±0,013	250,7±2,7	0,237±0,016
F12^β	250,3±11,1	0,598±0,096	229,5±8,2	0,611±0,102	171,1±6,0	0,479±0,018	92,5±0,2	0,367±0,004	123,2±3,0	0,549±0,067

T₀: medida realizada no momento de término do processo de moagem;

Parâmetros do processo: α: velocidade de agitação 800 rpm e 0,200mg de esferas de zircônio; β: velocidade de agitação 1200 rpm e 0,300mg de esferas de zircônio; F7 e F10: poloxamer 407; F8 e F11: cloreto de cetilpiridínio; F9 e F12: cloreto de benzalcônio

Tabela V: Potencial zeta (mV) para as nanossuspensões com 1% (m/m) do candidato a fármaco variando os tensoativos (1:1) e os parâmetros de processo.

Formulação	T ₀	3	7	21	30
F7 ^α	-8,9±0,6	-12,4±0,2	-8,7±0,2	-6,2±0,3	-11,3±0,6
F8 ^α	+44,6±1,3	+43,4±1,0	+43,1±1,5	+45,4±1,7	+45,2±1,2
F9 ^α	+52,3±1,8	+51,8±1,0	+53,2±0,2	53,5±0,7	55,8±0,6
F10 ^β	-10,0±0,6	-11,7±0,5	-9,6±0,2	-9,4±0,5	-12,5±0,3
F11 ^β	+42,4±0,2	+40,1±0,7	+40,5±0,6	+42,8±0,7	+42,9±0,8
F12 ^β	+58,3±0,2	+57,2±2,0	+54,6±0,6	+55,5±1,0	+56,6±1,4

T₀: medida realizada no momento de término do processo de moagem. Parâmetros do processo: α: velocidade de agitação 800 rpm e 0,200mg de esferas de zircônio; e β: velocidade de agitação 1200 rpm e 0,300mg de esferas de zircônio. F7 e F10: poloxamer 407; F8 e F11: cloreto de cetilpiridínio; F9 e F12: cloreto de benzalcônio.

Teste exploratório para avaliar o desempenho de reduzida concentração de tensoativos catiônicos na formulação

[058] Seis formulações foram preparadas com 0,200 mg de esferas de óxido de zircônio estabilizadas com ítria, composto híbrido a 1,0% e concentração variável de cloreto de cetilpiridínio (CPC) 0,05% (m/m) (F13), 0,1% (m/m) (F14), concentração de cloreto de benzalcônio (BAK) 0,05% (m/m) (F15), 0,1% (m/m) (F16) e concentração de cloreto de cetalcônio 0,05% (m/m) (F17), 0,1% (m/m) (F18), conforme tabela I. O volume final foi ajustado com água ultrapura para 1,0 g. Os frascos foram agitados numa placa de agitação magnética RCT básica a 800 rpm durante 96 horas. Todas as

formulações tiveram a medida do diâmetro hidrodinâmico médio (z-ave) e do potencial zeta (ZP) realizado no final do processo de moagem e durante o armazenamento a 4°C.

[059] Os valores de tamanho e IP para as formulações com cloreto de cetilpiridínio, cloreto de benzalcônio e cloreto de cetalcônio estão indicados na Tabela VI. O potencial zeta das seis formulações consta na Tabela VII.

Tabela VI: DHM e IP para nanossuspensões 1% (m/m) do candidato a fármaco, variando os tensoativos catiônicos utilizados e sua concentração.

Formulação	Término do processo		2 dias		7 dias		60 dias	
	DHM (nm)	IP	DHM (nm)	IP	DHM (nm)	IP	DHM (nm)	IP
F13	291,5±1,9	0,169±0,031	300,1±3,0	0,119±0,019	272,6±7,3	0,148±0,035	358,6±22,7	0,310±0,071
F14	116,5±0,9	0,216±0,006	117,6±1,0	0,199±0,009	110,3±0,4	0,167±0,024	127,0±2,1	0,229±0,015
F15	144,4±1,4	0,170±0,008	144,3±1,4	0,139±0,017	142,4±0,7	0,152±0,019	163,5±6,6	0,231±0,040
F16	137,8±1,8	0,160±0,008	139,6±1,8	0,140±0,032	136,8±2,5	0,153±0,028	149,3±3,5	0,242±0,014
F17	1995,0±455,4	1,000±0,000	785,6±286,9	0,685±0,346	6781±5478	0,909±0,158	3196±1257	0,181±0,077
F18	132,9±1,5	0,243±0,010	138,2±0,4	0,254±0,027	134,2±0,5	0,232±, .001	127,5±3,2	0,390±0,008

F13: 0.05% cloreto de cetilpiridínio; F14: 0.1% cloreto de cetilpiridínio; F15: 0.05% cloreto de benzalcônio; F16: 0.1% cloreto de benzalcônio; F17: 0.05% cloreto de cetalcônio; F18: 0.1% cloreto de cetalcônio.

Tabela VII: Potencial zeta (mV) das nanossuspensões 1% (m/m) do candidato a fármaco variando o tipo de tensoativo catiônico e sua concentração.

Formulação	T ₀	2	7	60
F13	+24,3±0,8	+24,0±0,8	+25,5±0,8	+26,9±0,8
F14	+48,2±1,0	+46,9±0,8	+47,4±0,4	+50,1±1,4
F15	+29,9±0,3	+30,8±0,1	+30,4±0,6	+30,0±1,1
F16	+33,0±0,6	+34,3±0,3	+34,5±0,2	+35,6±0,5
F17	+15,3±0,3	+20,0±3,3	+15,1±9,3	+34,4±0,3
F18	+45,5±0,4	+44,6±1,0	+45,8±1,1	+44,7±0,5

T₀: medição realizada no término do processo de moagem;
 F13: 0,05% cloreto de cetilpiridínio; F14: 0,1% cloreto de cetilpiridínio; F15: 0,05% cloreto de benzalcônio; F16: 0,1% cloreto de benzalcônio; F17: 0,05% cloreto de cetalcônio; F18: 0,1% cloreto de cetalcônio.

Planejamento de experimento empregando método de superfície de resposta para otimização da formulação de nanocristal de candidato a fármaco

[060] A otimização das formulações foi realizada empregando planejamento de experimento pelo método de superfície de resposta. Foram utilizadas três variáveis: a concentração do tensoativo poloxamer 407 (%m/m), a concentração do tensoativo catiônico, cloreto de cetilpiridínio ou cloreto de benzalcônio (%m/m), e a velocidade de agitação do sistema (rpm), conforme descrito na Tabela VIII. O software de análise estatística, preferencialmente o software Minitab®18, foi utilizado para gerar a matriz do ensaio e para análise dos resultados. Para o preparo das formulações, foram mantidas constantes a

concentração do candidato a fármaco (1,0% m/m). Para o processo foi utilizado 0,200g de esferas de zircônio, duas barras magnéticas e placa de agitação. O sistema foi submetido a agitação por 96 horas, sendo que a medida do tamanho foi realizada no término desse período.

Tabela VIII: Variáveis selecionadas no planejamento de experimento para otimização da formulação de nanocristal de candidato a fármaco.

	Tensoativo catiônico (%m/m)	Poloxamer 407 (%m/m)	Velocidade de agitação (rpm)
Mínimo (-1)	0,050	0,0	800
Ponto central (0)	0,075	0,500	1000
Máximo (+1)	0,100	1,000	1200

Planejamento de experimentos empregando cloreto de benzalcônio.

[061] O planejamento estatístico aplicando o tensoativo cloreto de benzalcônio e seus valores experimentais de DHM estão exibidos na Tabela IX.

Tabela IX: DHM obtidos para as preparações de nanocristal de candidato a fármaco da matriz de planejamento de experimentos por superfície de resposta.

Formulação	ordem	ponto	BAK	poloxamer	velocidade	DHM (nm)
		Central	(%)	407	(rpm)	
				(%)		
F1b	3	1	0,050	1,0	800	303,4±1,2
F2b	16	0	0,075	0,5	1000	248,5±5,6
F3b	13	-1	0,075	0,5	800	244,4±2,3
F4b	14	-1	0,075	0,5	1200	220,6±3,2
F5b	10	-1	0,100	0,5	1000	191,1±0,7
F6b	18	0	0,075	0,5	1000	248,5±5,6
F7b	5	1	0,050	0,0	1200	2261±158,5
F8b	9	-1	0,050	0,5	1000	403,8±9,6
F9b	20	0	0,075	0,5	1000	248,5±5,6
F10b	6	1	0,100	0,0	1200	169,8±5,0
F11b	19	0	0,075	0,5	1000	248,5±5,6
F12b	4	1	0,100	1,0	800	339,2±15,8
F13b	2	1	0,100	0,0	800	137,8±1,8
F14b	11	-1	0,075	0,0	1000	993,3±105,7
F15b	7	1	0,050	1,0	1200	343,0±15,7
F16b	17	0	0,075	0,5	1000	248,5±5,6
F17b	12	-1	0,075	1,0	1000	282,5±2,3
F18b	1	1	0,050	0,0	800	144,4±1,4
F19b	15	0	0,075	0,5	1000	248,5±5,6
F20b	8	1	0,100	1,0	1200	397,0±22,7

[062] A tabela X apresenta a análise de variância da matriz de planejamento de experimento para variável dependente (resposta) DHM. A Tabela XI apresenta o coeficiente de determinação (R^2), o coeficiente de

determinação ajustado (R^2 (aj)) e o coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado (R^2 (prev)).

Tabela X: Análise de variância para testar a significância dos termos obtidos para a variação de DHM de partícula das preparações de nanocristal de candidato a fármaco. As variáveis são: concentração de cloreto de benzalcônio (m/m), concentração de poloxamer 407 (%m/m) e velocidade (rpm).

FONTE	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor P
MODELO	6	75665,5	12610,9	119,09	0,000
Linear	3	73178,6	24392,9	230,35	0,000
BAK	1	2350,9	2350,9	22,20	0,001
Poloxamer 407	1	27903,2	27903,2	263,50	0,000
Velocidade	1	30439,4	30439,4	287,45	0,000
Quadrado	3	7176,9	2392,3	22,59	0,000
BAK*BAK	1	791,9	791,9	7,48	0,019
Poloxamer 407*Poloxamer 407	1	2744,0	2744,0	25,91	0,000
Velocidade*Velocidade	1	5347,6	5347,6	50,50	0,000
ERRO	11	1164,8	105,9		
Falta de ajuste	6	763,9	127,3	1,59	0,314
Erro puro	5	401,0	80,2	*	*
TOTAL	17	76830,3			

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 de análise estatística; BAK: Cloreto de benzalcônio.

Tabela XI: Significância dos coeficientes de regressão codificados e índice de ajuste do modelo selecionado na avaliação DHM nanocristais do candidato a fármaco.

TERMO	Coef	EP de Coef	Valor T	Valor P	VIF
Constante	258,06	3,69	69,94	0,000	
BAK	-16,67	3,54	-4,71	0,001	1,06
Poloxamer 407	64,27	3,96	16,23	0,000	1,15
Velocidade	59,98	3,54	16,95	0,000	1,06
BAK*BAK	18,42	6,74	2,73	0,019	1,93
Poloxamer 407*Poloxamer 407	-40,27	7,91	-5,09	0,000	2,63
Velocidade*Velocidade	47,87	6,74	7,11	0,000	1,93
SD:10,3% R ² : 98,48% R ² (Aj.):97,66% R ² (prev):95,28%					

Coef: coeficiente; Coef-DP: coeficiente de desvio padrão; Valor-p: nível de significância dos termos; BAK: cloreto de benzalcônio; DP: desvio padrão; R²: coeficiente de determinação; R² (Aj.): coeficiente de determinação ajustado; R²(prev): coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado.

[063] O modelo matemático foi gerado, conforme descrito na Equação 1.

$$DHM = 1266 - 5088BAK + 289,6Poloxamer - 2,094Velocidade + 29477BAK \times BAK - 161,1Poloxamer \times Poloxamer + 0,001197Velocidade \times Velocidade$$

(Eq.1)

[064] Em que, DHM corresponde ao diâmetro hidrodinâmico médio, BAK à concentração de cloreto de benzalcônio e Poloxamer à concentração de poloxamer 407.

Planejamento de experimento empregando cloreto de cetilpiridínio.

[065] O planejamento estatístico utilizando nas preparações tensoativo cloreto de cetilpiridínio e seus valores experimentais de DHM estão apresentados na Tabela XII.

Tabela XII: DHM obtidos para as preparações de nanocristal do candidato a fármaco da matriz de planejamento de experimentos por superfície de resposta.

Formulação	Ordem	Ponto central	CPC (%)	poloxamer 407 (%)	velocidade (rpm)	DHM (nm)
F1c	12	-1	0,075	1,0	1000	268,20 ±2,5
F2c	4	1	0,100	1,0	800	265,40 ±1,2
F3c	11	-1	0,075	0,0	1000	164,90 ±1,6
F4c	20	0	0,075	0,5	1000	246,50 ±1,7
F5c	6	1	0,100	0,0	1200	192,54 ±0,2
F6c	13	-1	0,075	0,5	800	252,50 ±2,4
F7c	2	1	0,100	0,0	800	137,02 ±0,9
F8c	8	1	0,100	1,0	1200	267,40 ±1,7
F9c	9	-1	0.050	0,5	1000	266,10 ±6,4
F10c	17	0	0,075	0,5	1000	274,80 ±1,4
F11c	10	-1	0,100	0,5	1000	227,00 ±4,4
F12c	3	1	0,050	1,0	800	231,30 ±4,2
F13c	15	0	0,075	0,5	1000	266,20 ±3,4
F14c	18	0	0,075	0,5	1000	256,00 ±3,4

F15c	5	1	0,050	0,0	1200	164,82 ±3,2
F16c	1	1	0,050	0,0	800	251,88 ±1,9
F17c	19	0	0,075	0,5	1000	269,70 ±3,4
F18c	16	0	0,075	0,5	1000	270,65 ±3,4
F19c	14	-1	0,075	0,5	1200	241,10 ±3,2
F20c	7	1	0,050	1,0	1200	233,70 ±6,3

DHM: diâmetro hidrodinâmico médio

[066] A Tabela XIII mostra a análise de variância para a resposta (variável dependente) DHM. O coeficiente de determinação (R^2), e o coeficiente de determinação ajustado (R^2 (Aj)) e o coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado (R^2 (prev)) estão descritos na Tabela XIV.

Tabela XIII: Análise de variância para testar a significância dos termos obtidos para a variação de DHM de partícula das preparações de nanocristal do candidato a fármaco. As variáveis são: concentração de cloreto de cetilpiridínio (%m/m), concentração de poloxamer 407 (%m/m) e velocidade (rpm).

FONTE	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor P
MODELO	6	47723,5	7953,9	46,35	0,000
Linear	3	25117,6	8372,5	48,79	0,000
CPC	1	2510,3	2510,3	14,63	0,002
Poloxamer 407	1	20687,9	20687,9	120,56	0,000
Velocidade	1	1919,3	1919,3	11,18	0,005
Quadrado	1	12171,7	12171,7	70,93	0,000
Poloxamer 407*Poloxamer 407	1	12171,7	12171,7	70,93	0,000
Interação com 2 Fatores	2	10434,3	5217,1	30,40	0,000
CPC*Poloxamer 407	1	8124,3	8124,3	47,34	0,000
Poloxamer 407*Velocidade	1	2310,0	2310,0	13,46	0,003
ERRO	13	2230,8	171,6		
Falta de ajuste	8	1662,4	207,8	1,83	0,262
Erro puro	5	568,4	113,7	*	*
TOTAL	19	49954,3			

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 de análise estatística; CPC: Cloreto de cetilpiridínio.

Tabela XIV: Significância dos coeficientes de regressão codificados e índice de ajuste do modelo selecionado na avaliação DHM nanocristais candidato a fármaco.

Termo	Coef	Coef	Valor	Valor	VIF
		DP	T	P	
Constante	257,06	4,14	62,05	0,001	
CPC	-15,84	4,14	-3,82	0,002	1,00
Poloxamer 407	45,48	4,14	10,98	0,001	1,00
Velocidade	-13,85	4,14	-3,34	0,005	1,00
Poloxamer 407*Poloxamer 407	-49,34	5,86	-8,42	0,001	1,00
CPC*Poloxamer 407	31,87	4,63	6,88	0,001	1,00
Poloxamer 407*Velocidade	16,99	4,63	3,67	0,003	1,00
DP: 13,09% R ² : 95,53% R ² (Aj.): 93,47% R ² (prev.): 86,30%					

Coef: coeficiente; Coef-DP: coeficiente de desvio padrão; Valor-p: nível de significância dos termos; CPC: cloreto de cetilpiridínio; DP: desvio padrão; R²: coeficiente de determinação; R² (Aj.): coeficiente de determinação ajustado; R² (prev.): coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado.

[067] O modelo matemático foi gerado, conforme descrito na Equação 2.

$$\begin{aligned}
 DHM = & 459,6 - 1908 \text{ CPC} - 72,8 \text{ Poloxamer} - 0,1542 \text{ Velocidade} \\
 & - 197,4 \text{ Poloxamer} \times \text{Poloxamer} + 2549 \text{ CPC} \times \text{Poloxamer} \\
 & + 0,1699 \text{ Poloxamer} \times \text{Velocidade}
 \end{aligned}$$

Eq. (2)

[068] Onde DHM corresponde ao diâmetro hidrodinâmico médio, CPC à concentração de cloreto de

cetilpiridínio e Poloxamer à concentração de poloxamer 407.

Verificação do modelo matemático para otimização da formulação de nanocristal do candidato a fármaco

[069] A verificação da validade do modelo estatístico, foi realizada estabelecendo os tamanhos de partícula alvo. A composição das preparações do nanocristal foi determinada pelo método de superfície de resposta, empregando o software de análise estatística e estão descritas na Tabela XV. Para todas as preparações, o volume final foi ajustado com água ultrapura para 1,0 g, a concentração do candidato a fármaco foi de 1% (m/m) e os parâmetros definidos para o processo foram: 0,200 g de esferas de zircônio e duas barras magnéticas cilíndricas (3,0 x 5,0 mm). O sistema foi submetido à agitação em placa de agitação durante 96 horas. A medida do DHM foi realizada apenas ao final deste período.

Tabela XV: Verificação do modelo proposto, considerando as variáveis: concentração do tensoativo catiônico (cloreto de benzalcônio e cloreto de cetilpiridínio) (%m/m), concentração de poloxamer 407 (%m/m) e velocidade de agitação (rpm).

Formulação	Tensoativo catiônico (%m/m)	Poloxamer 407 (%m/m)	Velocidade de agitação (rpm)
cloreto de cetilpiridínio			
Fa	0,092	0	800
Fb	0,078	0	800
Fc	0,080	0,299	800
Fd	0,081	0,446	800
cloreto de benzalcônio			

Fe	0,085	0,417	800
Ff	0,070	0,660	1200

[070] A comparação do DHM teórico com as formulações experimentais empregando os tensoativos cloreto de cetilpiridínio (Fa a Fd) e cloreto de benzalcônio (Fe e Ff) estão apresentadas nas Tabelas XVI e XVII, respectivamente.

Tabela XVI: Variáveis para as formulações desenvolvidas para a verificação do modelo com o tensoativo cloreto de cetilpiridínio, bem como o valor de DHM teórico e experimental.

Fórmula	CPC (% m/m)	Poloxamer	Velocidade (rpm)	DHM	DHM
		407		teórico	Experimental
		(%m/m)		(nm)	(nm)
Fa	0,0922	0	800	160,3	167,1±2,0
Fb	0,0784	0	800	186,7	173,7±1,5
Fc	0,080	0,299	800	245,8	210,6±1,6
Fd	0,081	0,446	800	262,6	292,5±9,0

DHM: diâmetro hidrodinâmico médio.

Tabela XVII: Variáveis para as formulações desenvolvidas para a verificação do modelo com o tensoativo cloreto de benzalcônio, bem como o valor de DHM teórico e experimental.

Fórmula	BAK (% m/m)	Poloxamer	Velocidade (rpm)	DHM	DHM
		407		teórico	Experimental
		(%m/m)		(nm)	(nm)
Fe	0,085	0,417	800	230,1	251,5±4,4
Ff	0,070	0,660	1200	386,1	448,2±21,9

DHM: Diâmetro hidrodinâmico médio

[071] A preparação com maior volume (frasco de 10 g) empregando tensoativo cloreto de cetilpiridínio obteve o

tamanho de partícula de $164,5 \pm 3,9$ nm, com DHM de $163,5 \pm 4,6$ nm após quatro meses de armazenamento a 4 °C.

Obtenção das preparações em quantidade 10 g

[072] O processo de moagem via úmida em escala reduzida foi escalonado para a obtenção de preparações com maior volume. As formulações foram produzidas com 1% (m/m) do composto híbrido e 0,092% (m/m) de cloreto de cetilpiridínio, a massa final foi ajustada com água ultrapura para 10,0g.

[073] O recipiente de moagem consistia em frasco de vidro de 10,0 mL, com 2,000g de esferas de zircônio e 3 barras magnéticas em formato de cruz. Os frascos foram agitados numa placa de agitação magnética RCT básica a 800 rpm durante 96 horas. O diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) foi medido ao final do processo de agitação.

Liofilização

[074] Alíquotas de 1,5 mL da nanossuspensão foram liofilizadas em 0,12 0mbar a -45°C por 48 horas usando Christ Alpha 2-4 LSC e armazenadas a 25°C até o uso para caracterizações do nanocristal. As amostras foram liofilizadas para testes de caracterização que exigem a secagem do material.

Caracterização morfológica e físico-química

Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) da partícula e índice de polidispersão (IP)

[075] O Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) da partícula e o índice de polidispersão (IP) dos nanocristais foram determinados por espalhamento de luz dinâmica, diluindo-se as amostras das suspensões, na razão de 1:24, em solução saturada filtrada do fármaco, recém-preparadas, e

observando-se, à luz espalhada, em ângulo de 90°. O DHM e o IP foram determinados empregando-se equipamento analisador de tamanho de partícula e potencial zeta.

Microscopia Eletrônica de Varredura

[076] O procedimento de microscopia eletrônica de varredura (MEV), exigiu a secagem de amostra de 0,05 mL da nanossuspensão em dessecador por 24 horas, em uma lamínula. Ao final do processo, o sólido foi transferido para suportes metálicos (stubs) com a ajuda de uma fita de carbono dupla face. O composto (candidato a fármaco) foi colocado no stubs diretamente com auxílio de fita de cobre dupla face. As amostras foram cobertas com ouro de paládio (Au-Pd) por meio de processo de pulverização. A MEV foi feita com o microscópio eletrônico de varredura, com geração de elétrons por filamento de tungstênio, câmara de alto vácuo, modo secundário de detecção de elétrons e tensão de aceleração de elétron de 20 kV.

[077] A avaliação morfológica foi realizada utilizando o programa ImageJ®. Foram feitas dez medidas do tamanho (considerou-se a menor extensão da partícula) do composto antes da redução e da formulação de nanocristal do candidato a fármaco. A análise de variância (ANOVA) foi realizada por meio do software de análise estatística.

[078] As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do composto híbrido e dos nanocristais estão exibidas nas figuras 8 e 9, respectivamente. As medidas de tamanho de partícula (ANOVA) estão demonstradas na tabela XVIII.

Tabela XVIII: Valores de tamanho (nm) das partículas do candidato a fármaco (composto híbrido) e dos nanocristais.

	Composto híbrido (nm)	Nanocristal (nm)
T1	2949	183,0
T2	1297	149,0
T3	2136	118,0
T4	1191	232,0
T5	2843	213,0
T6	1690	154,0
T7	1241	174,0
T8	644	100,0
T9	801	183,0
T10	1655	267,0
Média e DP:	1644,7±787,7	177,3±50,8

DP: Desvio padrão.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN-C13)

[079] A caracterização química da formulação do candidato a fármaco foi realizada por ressonância magnética nuclear (RMN) de C13, a fim de observar a presença dos principais grupos funcionais e a integridade da partícula do candidato a fármaco após o processo de moagem. Deste modo, foram obtidos os espectros de RMN-C13 da nanossuspensão liofilizada do candidato a fármaco, em DMSO de (1,5g de nanocristal para 1g mL de DMSO).

[080] Observou-se, nos espectros de RMN-C13, que os picos obtidos nas regiões foram: 203.107 (C20), 185.035 (C3), 170.020 (C1'), 166.494 (C1''), 164.536 (C5), 156.388 (C2), 136.515 (C2'), 134.831 (C3''), 131.405 (C2''), 129.882 (C3'), 128.018 (C5'), 127.961 (C4'), 127.063 (C1), 123.520 (C4''), 121.651 (C21), 98.023 (C17), 97.304 (C22), 55.043 (C9), 46.907 (C13), 45.740 (C14), 43.627 (C12), 34.474 (C8), 31.216 (C6), 30.652 (C15), 29.894 (C7), 20.754

(C19), 16.938 (C18), 13.854 (C25) e 13.815 (C24) ppm (Figuras 10 e 11), se mostraram fortemente similares quanto a localização (ppm), aos obtidos por Machado, Scarim, Andrade, Santos e Chin (2019).

Ajuste de parâmetros oftálmicos

pH

[081] O pH das preparações foi medido utilizando pHmetro, após a calibração do equipamento com soluções tampão pH 7,0 e 4,0. O ajuste do pH para o uso oftálmico (7,4) foi realizado com tampão PBS 7,4.

Viscosidade aparente

[082] A viscosidade foi medida a 25°C utilizando viscosímetro. O Spin utilizado para o experimento foi do tipo 00 e a velocidade foi de 100 rpm.

[083] O pH da formulação selecionada foi de 4,22 e foi subsequentemente ajustado para 7,42. A viscosidade medida está na tabela XIX.

Tabela XIX: Medida da viscosidade da formulação de nanocristal do candidato a fármaco contendo cloreto de cetilpiridínio.

Medida	Viscosidade (cP)	%
V1	1,42	23,7
V2	1,37	23,0
V3	1,38	23,1
Média ± DP	1,39± 0,02	23,27±0,31

DP: Desvio padrão.

Análise dos dados

[084] A abordagem no desenvolvimento de preparações farmacêuticas deve incluir ferramentas de qualidade e estatística que permitam o entendimento dos

parâmetros críticos do processo e dos atributos críticos de qualidade.

[085] Nesse contexto, foram empregados tensoativos não-iônicos e catiônicos, aprovados para uso oftalmológico tendo em vista estabilizar a nanossuspensão do candidato a fármaco. A primeira etapa foi selecionar o tensoativo apropriado para o desenvolvimento dos nanocristais e que mantivesse sua estabilidade, sem agregação. O poloxamer 407 (F1) permitiu a estabilidade do sistema, enquanto os tensoativos polissorbato 80 (F3) e poloxamer 188 (F2) apresentaram agregação das partículas. Esses resultados indicaram que a barreira promovida por esses tensoativos não foi suficiente para impedir a ação de forças hidrofóbicas entre as partículas.

[086] O melhor desempenho do poloxamer 407, comparado ao poloxamer 188, pode ser explicado pela diferença no peso molecular. A menor massa molecular do poloxamer 188 (7680-9510 g/mol) forma fina barreira estérica entre as partículas, não sendo capaz de superar as forças de atração de van der Waals. O mesmo pode ser observado ao comparar o poloxamer 407 com o polissorbato 80. A menor massa molecular do polissorbato 80 (604,8 g/mol) em comparação ao poloxamer 407 (10000-14600 g/mol) forma barreira insuficiente, impedindo a redução do tamanho das partículas. Por não fornecer os resultados desejados, o F2 (poloxamer 188) foi monitorado apenas nos cinco dias iniciais.

[087] A formulação contendo TPGS (F4) apresentou menor redução no tamanho das partículas quando comparada à preparação F1, provavelmente devido à lipofilicidade do composto híbrido (candidato a fármaco) (log teórico P: 6,07

$\pm 1,03$ calculado pelo programa ACD/Labs Release: 12.00), de modo que a quantidade de TPGS adicionada não foi suficiente para superar as interações hidrofóbicas tão adequadamente quanto às observadas para o poloxamer 407. Do mesmo modo, quando o cloreto de cetalcônio foi empregado como tensoativo, provavelmente não reduziu o tamanho das partículas devido à sua alta hidrofobicidade ($\log P$: 4,67), não permitindo a quebra da tensão superficial do sistema (composto x água). Em contrapartida, o cloreto de cetilpiridínio e o cloreto de benzalcônio foram, surpreendentemente, bem-sucedidos promovendo estabilização eletrostática. A característica adequada de redução do tamanho de partícula utilizando o cloreto de cetilpiridínio se deve provavelmente à lipofilicidade do tensoativo ($\log P$ 3,47). Essa característica permitiu adsorção adequada à superfície da partícula de nanocristal do candidato a fármaco que possui características únicas.

[088] Com base nos resultados apresentados, os tensoativos poloxamer 407, cloreto de cetilpiridínio e cloreto de benzalcônio foram selecionados para os estágios subsequentes de otimização das formulações de nanocristais do candidato a fármaco.

[089] A segunda etapa do estudo exploratório teve como objetivo analisar a influência dos parâmetros do processo na redução de tamanho do candidato a fármaco. A redução na quantidade de tensoativo (de 3% para 1% m/m), mantendo a proporção de 1:1 (candidato a fármaco: tensoativo), ainda é suficiente para revestir as partículas e promover impedimento eletrostática ou estérica. Quando a quantidade de tensoativos não é suficiente para formar essa barreira,

as partículas formam agregados e a nucleação é acelerada. Além disso, esses ensaios exploratórios mostraram que a formulação de poloxamer 407 (F10) apresentou maior redução de tamanho quando a velocidade de agitação foi de 1200 rpm e a quantidade de 0,300 mg de esferas de zircônio foi empregada. Entretanto, a agitação de 800 rpm e 0,200 mg de esferas de zircônio promoveu adsorção mais significativa da porção hidrofóbica do cloreto de cetilpiridínio e cloreto de benzalcônio ao composto, permitindo a formação da barreira eletrostática.

[090] O uso de cloreto de cetilpiridínio e cloreto de benzalcônio é especialmente vantajoso porque, além de proporcionar estabilidade devido à repulsão eletrostática, eles também exercem ação antimicrobiana, essencial para colírios de doses múltiplas. Vantagem adicional refere-se à característica elétrica das partículas. Ao fornecer carga positiva aos nanocristais, a mucoadesividade tende a aumentar devido à interação eletrostática entre a carga positiva do nanocristais e os resíduos de ácido siálico com carga negativa que compõem a mucina (uma proteína altamente glicosilada, presente no filme lacrimal). Assim, o sistema tem o potencial de prolongar o tempo de residência do composto no olho, possivelmente aumentando a biodisponibilidade quando aplicado topicamente. No entanto, a concentração máxima autorizada para uso em produtos oftálmicos de cloreto de cetilpiridínio e de cloreto de benzalcônio é de 0,1% (m/m).

[091] Assim, a etapa subsequente foi efetuada visando testar essa concentração. As formulações preparadas com 0,1% desses tensoativo catiônicos (cloreto de

cetilpiridínio e cloreto de benzalcônio) surpreendentemente atingiram a escala nanométrica e não apresentaram agregação no período monitorado (30 dias).

[092] O potencial zeta indica a extensão das interações eletrostáticas, resultando em conhecimento a respeito da estabilidade do sistema. As formulações cujo valor de potencial zeta segue a razão $|\zeta| > 30 \text{ mV}$ são consideradas estáveis. Assim, o uso de tensoativos catiônicos promove a estabilização do sistema nanoestruturado devido à força eletrostática repulsiva entre os nanocristais. Preparações contendo tensoativos não iônicos não atingiram valores próximos de zeta potenciais $|\zeta| > 30 \text{ mV}$. Esses tensoativos não promovem estabilidade eletrostática, e sim, estérica das preparações.

[093] Além disso, valores de IP próximos de zero mostram que o sistema é homogêneo, enquanto valores próximos de 1 indicam que as partículas na formulação têm tamanhos variados. Para nanossuspensões, valores $< 0,3$ indicam grau aceitável de homogeneidade.

[094] O planejamento de experimento foi desenvolvido para otimizar a preparação dos nanocristais. A concentração de poloxamer 407 de 1,0% (m/m), empregada durante os ensaios exploratórios, foi utilizada como concentração máxima. A concentração mínima foi estabelecida como a ausência do tensoativo. Considerando que a formulação contendo apenas o tensoativo cloreto de cetilpiridínio apresentou redução do DHM, o uso do tensoativo não-iônico teve como objetivo promover ação sinérgica na manutenção da estabilidade da preparação. A concentração de cloreto de cetilpiridínio e cloreto de benzalcônio foi selecionada a

partir do mínimo necessário para realizar a redução desejada (0,05% m/m) e o máximo permitido pela regulamentação para uso oftálmico (0,10% m/m). O intervalo de velocidade de agitação foi determinado a partir do perfil de resposta para cada tensoativo. Nos ensaios exploratórios as formulações empregando os tensoativos cloreto de benzalcônio e cloreto de cetilpiridínio obtiveram melhor redução do tamanho empregando velocidade de agitação de 800 rpm. No caso do tensoativo poloxamer 407, esse apresentou maior redução de tamanho quando aplicada a velocidade de 1200 rpm. Assim, essas duas velocidades foram selecionadas, com o objetivo de obter resposta satisfatória para ambos os tensoativos.

[095] Dois modelos estatísticos foram delineados, um aplicando cloreto de benzalcônio e outro com cloreto de cetilpiridínio.

[096] O modelo empregando cloreto de benzalcônio apresentou o menor e o maior valor de DHM, respectivamente, de $137,8 \pm 1,8\text{nm}$ e $2261 \pm 158\text{nm}$. O experimento revelou que a maior concentração de tensoativo catiônico, cloreto de benzalcônio, e a menor de poloxamer 407 (F13b: DHM= $137,8 \pm 1,8\text{nm}$) influenciaram significativamente na redução do tamanho da partícula. Observando os resultados obtidos, pode-se inferir que baixas concentrações de cloreto de benzalcônio e alta velocidade resultaram em partículas com maior DHM (F7b: DHM= $2261 \pm 158\text{nm}$ e F14b: DHM= $993,3 \pm 105,7\text{nm}$). Esse cenário ocorre possivelmente em função da cadeia lipofílica do cloreto de benzalcônio (logP: 1,692), que em baixa concentração não é suficiente para conferir a lipofilicidade necessária para que ocorra a adsorção do tensoativo nas partículas do composto híbrido (log P teórico

6,07 $\pm$ 1,03). Assim, não é possível reduzir a tensão superficial do sistema, promovendo a formação de partículas maiores (termodinamicamente mais estáveis), diferente do desejado.

[097] Além disso, para o modelo estatístico de cloreto de benzalcônio, os termos considerados significativos foram no modelo linear, concentração de cloreto de benzalcônio, concentração de poloxamer 407 e velocidade, enquanto no modelo quadrático foram significativos os fatores de concentração de BAK, concentração de poloxamer 407 e velocidade de agitação. Na interação com dois fatores, nenhum dos fatores foi significativo (valores-p > 0,05). A adequação desse modelo pode ser confirmada pelo valor não significativo para a falta de ajuste (valor-p = 0,314). Entretanto, a confiabilidade do modelo deve ser confirmada pela análise de medidas de desempenho, como o coeficiente de determinação (R²) e o coeficiente de determinação ajustado para os graus de liberdade associados (R²Aj). Quando os valores do R² e o R²Aj estão próximos, é possível confirmar que fatores não significativos não foram adicionados ao modelo. A Tabela XII mostra que, para o modelo proposto, esses valores são 98,48% e 97,66%, respectivamente. Por fim, o coeficiente de previsão do modelo ajustado (R²prev.=95,28%), está acima de 80%, indicando que os valores teóricos e experimentais estão próximos.

[098] Além disso, a Equação 1 mostra que a concentração de cloreto de benzalcônio (coeficiente= -5088) exerce maior influência na redução do DHM quando comparado com a concentração de poloxamer 407 e a velocidade de

agitação (coeficientes +289,6 e -2,094, respectivamente). Por outro lado, o termo quadrático BAK*BAK (coeficiente= 29477) impacta negativamente na redução do DHM, bem como o termo velocidade*velocidade (coeficiente= 0,001197), já o termo poloxamer 407*poloxamer 407 ocasiona redução do DHM (coeficiente= -161,1). O impacto dos parâmetros descritos na Equação 1 são confirmados pelos gráficos de contorno (Figura 5) e pelo gráfico de Pareto (Figura 3).

[099] No gráfico de probabilidade normal a distribuição dos resíduos, próximos a linha central, indicam que há a possibilidade de os resíduos estarem distribuídos normalmente. Os gráficos de observações individuais (Gráfico Versus ajustados e Gráfico Versus ordem) mostram que os resíduos não estão correlacionados, indicando, portanto, que os erros possivelmente são aleatórios (Figura 4).

[100] Pode-se inferir que para esse modelo, a formulação ótima contém concentração intermediária de cloreto de benzalcônio (0,075% m/m), mínimo de poloxamer 407 (0,5% m/m) e velocidade de agitação intermediária (1000 rpm).

[101] O desenho de experimento com o cloreto de cetilpiridínio revelou que a concentração de cetilpiridínio foi a variável que influenciou significativamente o DHM, permitindo os menores valores, assim como, a menor concentração de poloxamer 407 (F7c: DHM=137,02±0,9nm). O menor e o maior valor de DHM foram, respectivamente, de 137,02 ±0,9 e 270,65±3,4nm. Esses valores estão dentro da faixa esperada para nanocristais (até 500 nm) e a distribuição do tamanho das partículas apresentou perfil monomodal, com exceção das formulações F2c e F9c.

[102] As variáveis independentes, assim como, suas interações são consideradas estatisticamente significativas quando os valores-p forem inferiores a 0,05 ($\alpha=0,05$). Assim, os termos considerados significativos foram: no modelo linear, a concentração de poloxamer 407 e a velocidade de agitação, enquanto no modelo quadrático, apenas a concentração de poloxamer 407. Na interação com dois fatores, a concentração de cloreto de cetilpiridínio com a concentração de poloxamer 407 e a concentração de poloxamer 407 com a velocidade de agitação foram os fatores significativos. A significância dessas variáveis é confirmada pelo gráfico de Pareto, apresentado na Figura 6 e pelos gráficos de contorno (Figura 8). A adequação desse modelo pode ser confirmada pelo valor não significativo para a falta de ajuste (valor-p=0,262), como apresentado na Tabela XIII.

[103] No gráfico de probabilidade normal, os pontos estão próximos da linha central, indicando que possivelmente os resíduos estão distribuídos normalmente. Considerando o histograma, que apresenta as características dos resíduos, a predição de normalidade fica prejudicada pelo deslocamento dos resíduos. Os gráficos de observações individuais (Gráfico Versus ajustados e Gráfico Versus ordem) indicam que não há correlação entre os resíduos, e, portanto, os erros são aleatórios (Figura 7).

[104] A ausência da falta de ajuste e os termos relevantes indicam boa confiabilidade na adequação do modelo, entretanto, outros fatores externos, não controláveis e não explicados pelo modelo proposto devem ser considerados. Assim, para verificar a confiabilidade do modelo, analisam-

se medidas de desempenho, como o coeficiente de determinação (R^2), e o coeficiente de determinação ajustado para os graus de liberdade associados (R^2_{Aj}), indicados na Tabela XIV. Esta mostra que os resultados de coeficiente de determinação e o coeficiente de determinação ajustado, respectivamente 95,53% e 93,47%, estão próximos suficientes para inferir que valores não significativos não foram incluídos no modelo. Valores de R^2 (prev.) acima de 80% indicam grande probabilidade dos valores teóricos e dos valores práticos estarem muito próximos. Para o modelo obtido nesse experimento, o valor de R^2 (prev.) foi de 86,30%.

[105] Além disso, na Equação 2 destaca-se que o coeficiente para a concentração de cloreto de cetilpiridínio (coeficiente= -1908) tem maior influência na redução do DHM quando comparado à concentração de poloxamer 407 e à velocidade de agitação, coeficiente igual a - 0,1542 e coeficiente igual a - 72,8, respectivamente. A partir do coeficiente do poloxamer 407 é possível inferir, também, que seu uso resulta em aumento do DHM da partícula. Observou-se que o termo quadrático Poloxamer 407*Poloxamer 407 (coeficiente= -197,4) influenciou positivamente na redução do DHM, enquanto as interações CPC*Poloxamer 407 (coeficiente= + 2549) e Poloxamer 407*Velocidade (coeficiente= + 0,1699) resultaram em aumento do DHM.

[106] Embora a associação de poloxamer 407 e cloreto de cetilpiridínio tenha impacto não desejado na redução do DHM das partículas, seu uso associado não pode ser descartado, uma vez que ambos atuam de forma complementar, promovendo estabilização estérica e eletrostática,

respectivamente, possivelmente mantendo a estabilidade da formulação por mais tempo.

[107] As seis formulações (Fa, Fb, Fc, Fd, Fe e Ff) preparadas para verificar os modelos matemáticos apresentaram valores de tamanho próximos aos teóricos, máximo 7% de diferença entre o valor teórico e experimental para o modelo empregando cloreto de cetilpiridínio, e 9% e 16% m/m, respectivamente, para as formulações empregando cloreto de benzalcônio. Mostrando, portanto, que os modelos são suficientemente preditivos para serem usados no processo de otimização das formulações de nanocristal do candidato a fármaco. As preparações Fa, Fb, e Fc apresentaram perfil de distribuição de DHM monomodal. A formulação Fd não apresentou perfil adequado de distribuição de partícula, provavelmente devido à falta de uniformidade no processo de moagem.

[108] Considerando os dois modelos estatísticos que empregam CPC ou BAK e a faixa de tamanho obtida, a formulação selecionada para as caracterizações físico-químicas foi: 1% (m/m) do candidato a fármaco e 0,092% (m/m) de cloreto de cetilpiridínio, empregando no processo de moagem via úmida, velocidade de agitação de 800 rpm.

[109] Essa formulação selecionada (preparação ampliada) alcançou o tamanho de partícula conforme proposto no modelo estatístico e não apresentou agregação na amostra pelo menos quatro meses após sua preparação (DHM final: $163,5 \pm 4,6$ nm), armazenada a 4°C e sob abrigo da luz.

[110] O pH dessa formulação é de 4,22 e foi posteriormente ajustado para 7,42. A viscosidade desta preparação foi medida em triplicata, os valores se encontram na Tabela XIX.

[111] Na MEV observa-se que as partículas, quando submetidas ao processo de moagem possuem caráter amorfo. Essa característica é particularmente interessante, já que partículas amorfas têm sua solubilidade aumentada entre 1,1 e 1000 vezes, quando comparada às partículas com estrutura cristalina. Além disso, foram selecionadas dez partículas para realizar a medição da largura, com a intenção de obter tamanhos representativos em relação à amostra. A média dos tamanhos das partículas do composto original e da formulação de nanocristal foram de $1644,7 \pm 787,7$ e $177,3 \pm 50,8$ nm, respectivamente. Assim, é possível inferir que o processo de moagem promoveu a redução de 89,22% do tamanho de partícula. A análise de variância (ANOVA) corroborou com esse resultado, mostrando que a alteração foi significativa ($\alpha < 0,05$).

[112] A avaliação da presença do composto híbrido na formulação e subsequentemente da ocorrência de reação de hidrólise no carbono estérico 1' do composto, Figura 10, foi realizada por meio de RMN- C^{13} .

[113] Referente ao carbono estérico $C1'$, o pico obtido foi em 170,020 ppm, enquanto no espectro de referência, o pico está contido em 170,24 ppm. Essa proximidade de valores representa forte indício de que a ligação se manteve intacta durante o processo. Pode-se concluir que as similaridades observadas nos espectros de RMN- C^{13} obtidos por nós e Machado, Scarim, Andrade, Santos e Chin (2019) sugerem não somente a presença do composto híbrido na preparação de nanocristais, como também, que o candidato a fármaco não sofre reação de hidrólise na carbonila contida no carbono 1'. Assim, pode-se inferir que o processo de moagem em escala reduzida não promoveu a quebra do composto.

[114] Os tensoativos utilizados nas preparações foram eficientes em promover estabilidades estérica (poloxamer 407) e eletrostática devido à repulsão de cargas positivas dos tensoativos catiônicos (cloreto de cetilpiridínio e cloreto de benzalcônio), permitindo a redução do tamanho da partícula do candidato à fármaco.

[115] O delineamento estatístico empregando método de superfície de resposta permitiu avaliar os parâmetros que influenciam a redução do DHM das partículas do candidato a fármaco, assim como, a concentração dos tensoativos catiônicos (cloreto de cetilpiridínio e cloreto de benzalcônio) e a interação entre eles, a concentração de poloxamer 407 e a velocidade de agitação empregada no processo. Esse modelo matemático permitiu a previsão de tamanho de acordo com a formulação proposta e a otimização da preparação dos nanocristais do candidato a fármaco com cloreto de cetilpiridínio e cloreto de benzalcônio.

[116] Surpreendentemente, as concentrações dos tensoativos catiônicos adequadas para a estabilização das preparações foram aquelas aprovadas para uso oftálmico (0,05% a 0,1% m/m). Assim, de maneira inesperada, os tensoativos catiônicos permitiram a redução e a estabilização das formulações de nanocristais do candidato a fármaco, sem a utilização do tensoativo polaxamer 407.

[117] Considerando os dois modelos estatísticos (CPC ou BAK) e a faixa de tamanho obtida, propõe-se que a formulação otimizada para o desenvolvimento de nanocristais do candidato a fármaco, seja de 1% (m/m) do composto híbrido e 0,092% (m/m) de cloreto de cetilpiridínio, comprovado pelas avaliações morfológica e físico-química dos nanocristais do

candidato a fármaco. Esses resultados promissores indicam que os nanocristais, obtidos do candidato a fármaco, podem ser utilizados para uso oftálmico tópico no tratamento de doenças inflamatórias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[118] BHAT, Parvaiz Ahmad; DAR, Aijaz Ahmad; RATHER, Ghulam Mohammad. Solubilization Capabilities of Some Cationic, Anionic, and Nonionic Surfactants toward the Poorly Water-Soluble Antibiotic Drug Erythromycin. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 53, n. 6, p.1271-1277, jun. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jc700659g>

[119] CALLEGARI-JACQUES, Sidia M.. Bioestatística: Princípios e aplicações. São Paulo: Artmed, 2007. 251 p.

[120] COSTA, Patrícia Marçal da et al. Improvement of in vivo anticancer and antiangiogenic potential of thalidomide derivatives. *Chemico-biological Interactions*, v. 239, p.174-183, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.06.037>.

[121] COUTINHO, Agnes E.; CHAPMAN, Karen E.. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular And Cellular Endocrinology*, v. 335, n. 1, p.2-13, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.005>.

[122] GIGLIOBIANCO, Maria et al. Nanocrystals of Poorly Soluble Drugs: Drug Bioavailability and Physicochemical Stability. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 3, p.134-163, 21 ago. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics10030134>.

[123] KECK, C. M; MÜLLER, RH. Drug nanocrystal of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenization. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. v. 62, n. 1, p.3-16, jan. 2006.

[124] MACHADO, Marcella Gabrielle Mendes; SCARIM, Cauê Benito; ANDRADE, Cleverton Roberto de; SANTOS, Jean Leandro dos; CHIN, Chung Man. Synthesis and anti-inflammatory intestinal activity of new glucocorticoid derivatives. Medicinal Chemistry Research, v. 29, n. 2, p. 206-216, 22 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-019-02474-7>.

[125] PALLANT, J. (2011). SPSS: Survival manual(4^aed.). Crows Nest: Allen & Unwin.

[126] PETERS, Maria Christina Camasmie et al. Advances in ophthalmic preparation: the role of drug nanocrystals and lipid-based nanosystems. Journal Of Drug Targeting, p.1-12, 12 set. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/1061186x.2019.1663858>.

[127] RAMS-BARON, Marzena et al. Amorphous Drug Solubility and Absorption Enhancement. Amorphous Drugs, p.41-68, 2018. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-72002-9_3.

[128] SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. et al. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye - Part I - Barriers and determining factors in ocular delivery. European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics, v. 110, p.70-75, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.10.009>.

[129] SHEPPARD, John D.; COMSTOCK, Timothy L.; CAVET, Megan E.. Impact of the Topical Ophthalmic Corticosteroid Loteprednol Etabonate on Intraocular Pressure. *Advances In Therapy*, v. 33, n. 4, p.532-552, 17 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12325-016-0315-8>.

[130] TUOMELA, Annika; HIRVONEN, Jouni; PELTONEN, Leena. Stabilizing Agents for Drug Nanocrystals: Effect on Bioavailability. *Pharmaceutics*, v. 8, n. 2, p.16-34, 20 maio 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics8020016>.

[131] YANG, Hyerim et al. Pharmaceutical Strategies for Stabilizing Drug Nanocrystals. *Current Pharmaceutical Design*, v. 24, n. 21, p.2362-2374, 15 out. 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612824666180515125247>.

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação, **caracterizada** pelo fato de que compreende:

- 1,0% (m/m) de nanocristais de composto híbrido de ftalimida com budesonida;

- 0,050 a 0,100% (m/m) de cloreto de cetilpiridínio, preferencialmente 0,092% (m/m); e

- água ultrapura q.s.p.

2. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que compreende ainda, opcionalmente, poloxamer 407 (copolímero de bloco sintético de óxido de etileno e óxido de propileno) na concentração de até 1,0% (m/m).

3. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o diâmetro hidrodinâmico médio é 100 a 300 nm.

4. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo que de que apresenta um pH ajustado em 7,42 e uma média de viscosidade de $1,39 \pm 0,02$ cP $23,27 \pm 0,31$ %.

5. Uso da formulação, conforme definida nas reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de ser para o preparo de um medicamento para tratar doenças inflamatórias oculares, principalmente segmento anterior ou posterior do olho.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que a formulação é na forma de preparações oftálmicas, preferencialmente de uso tópico.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que a formulação é na forma de colírio.

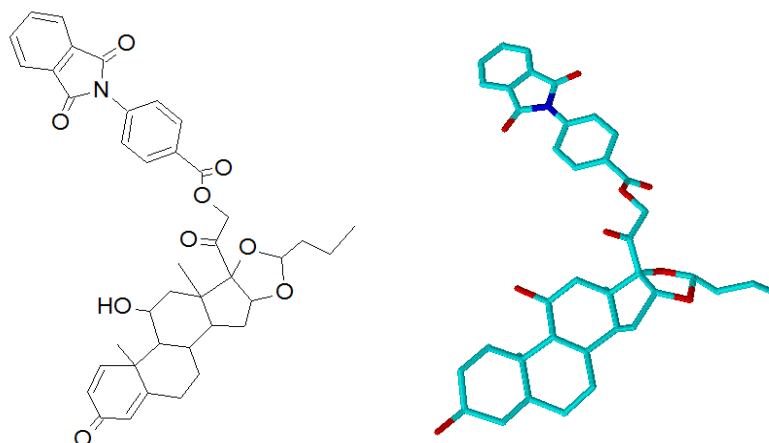


FIGURA 1

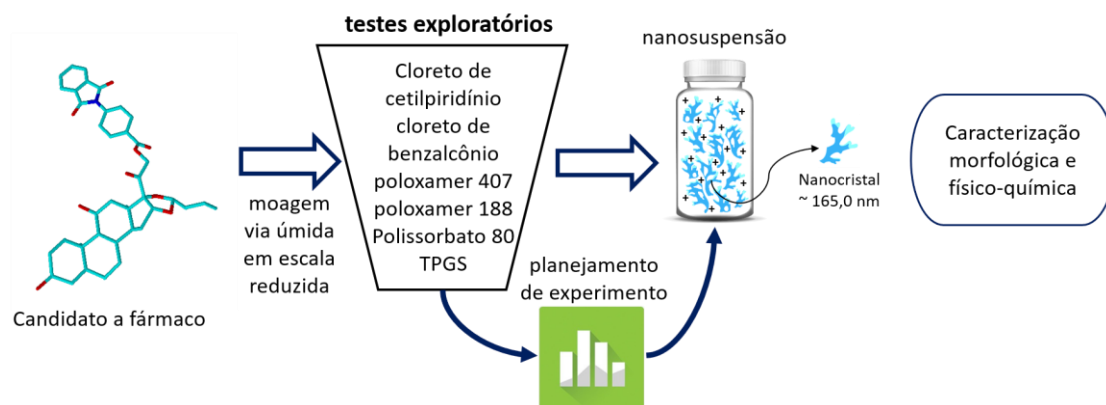


FIGURA 2

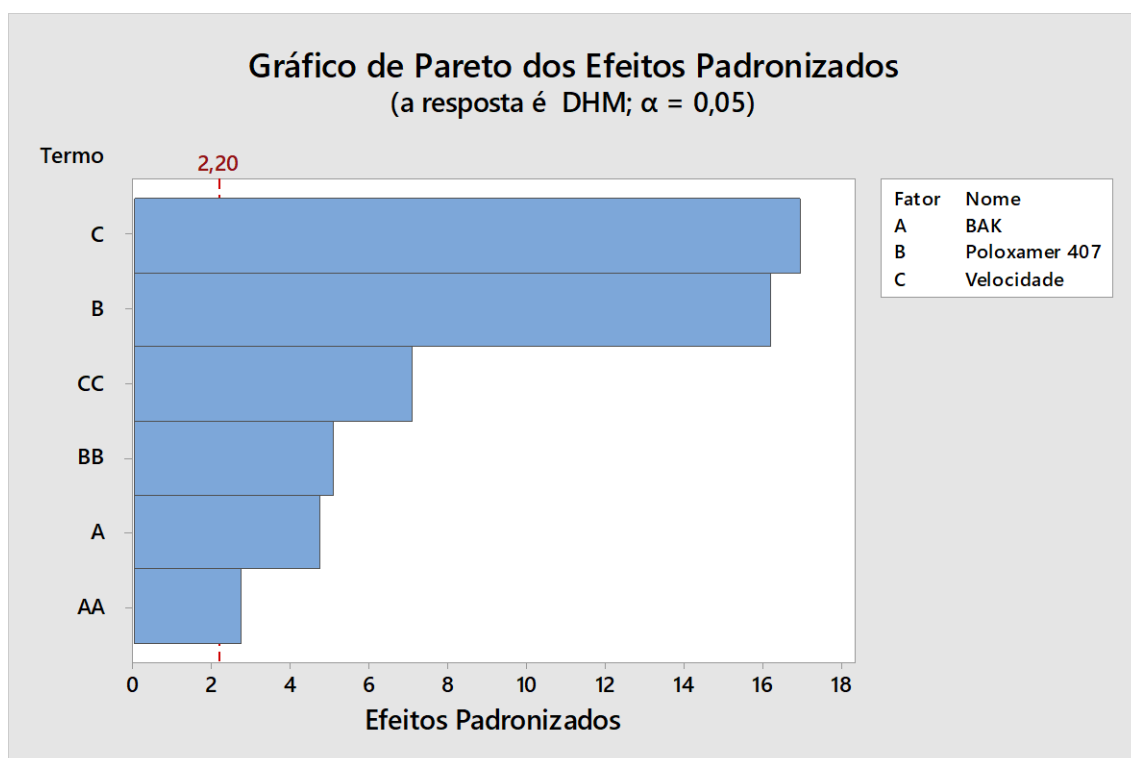


FIGURA 3

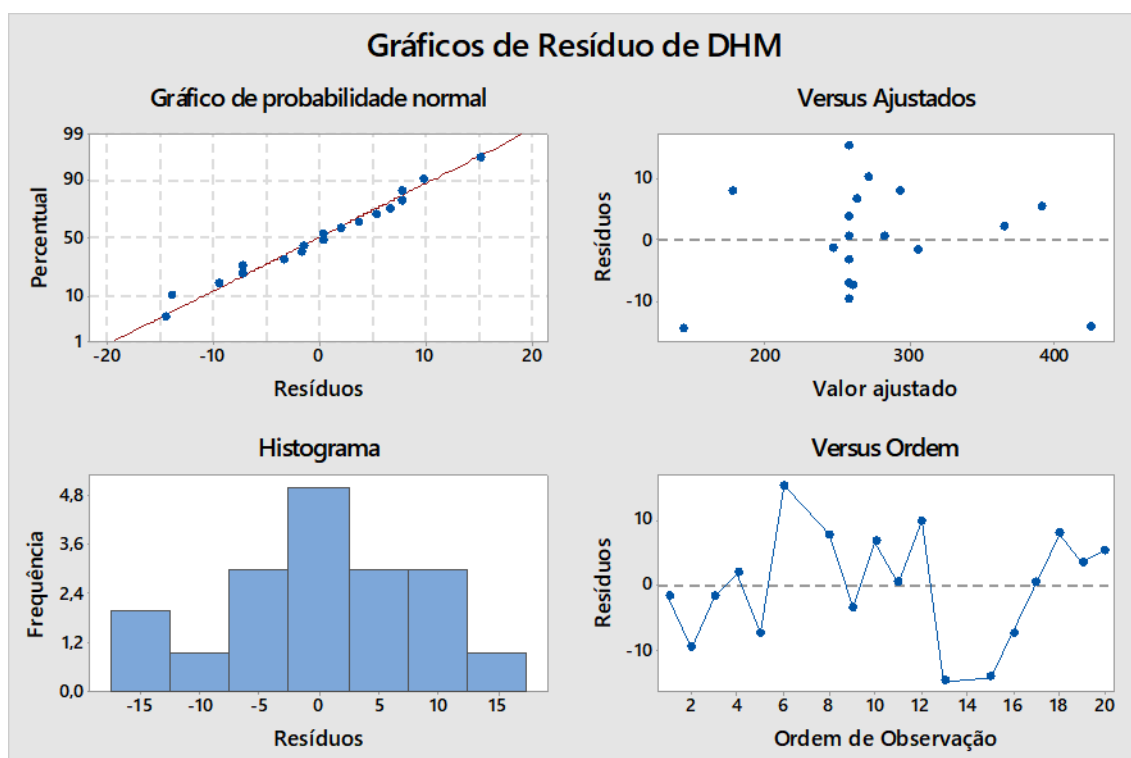


FIGURA 4

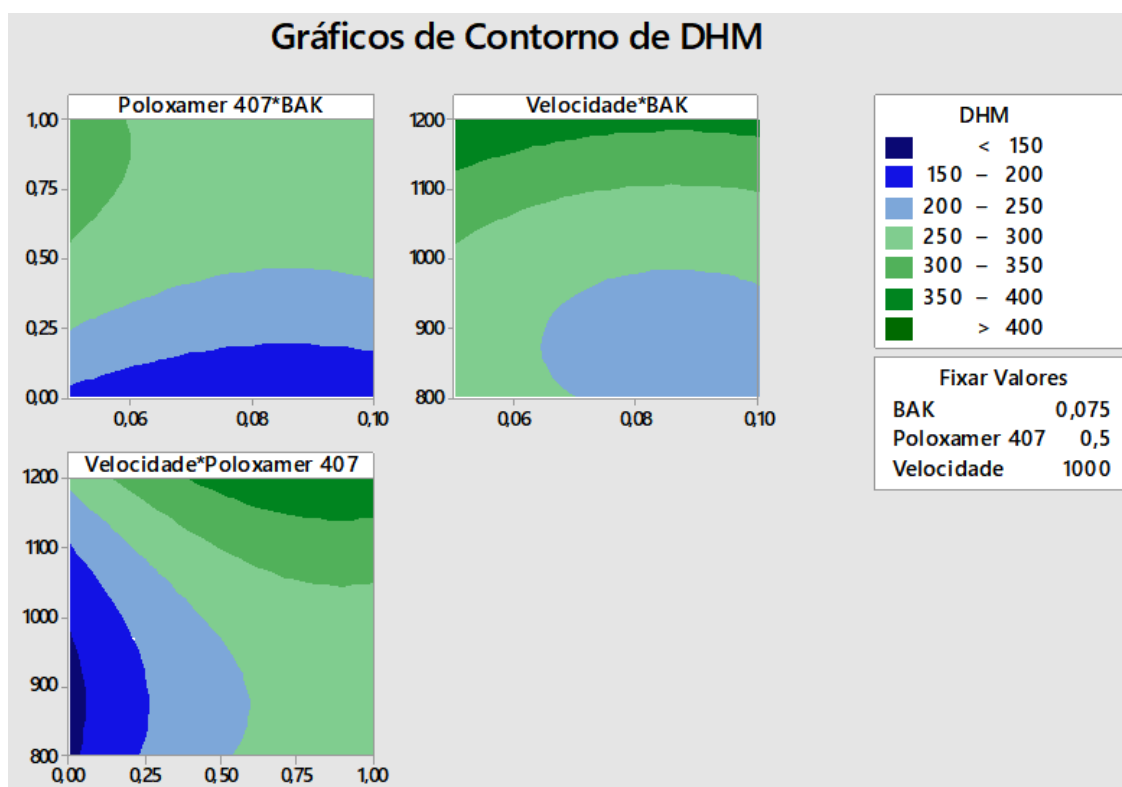


FIGURA 5

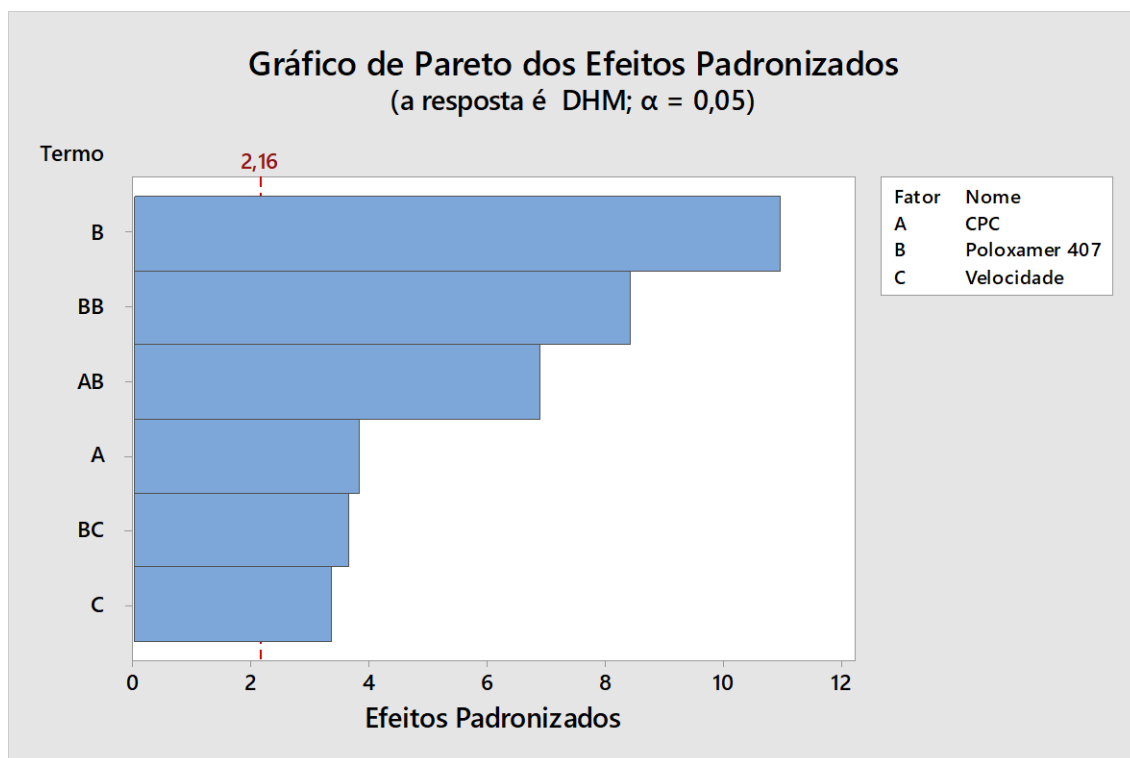


FIGURA 6

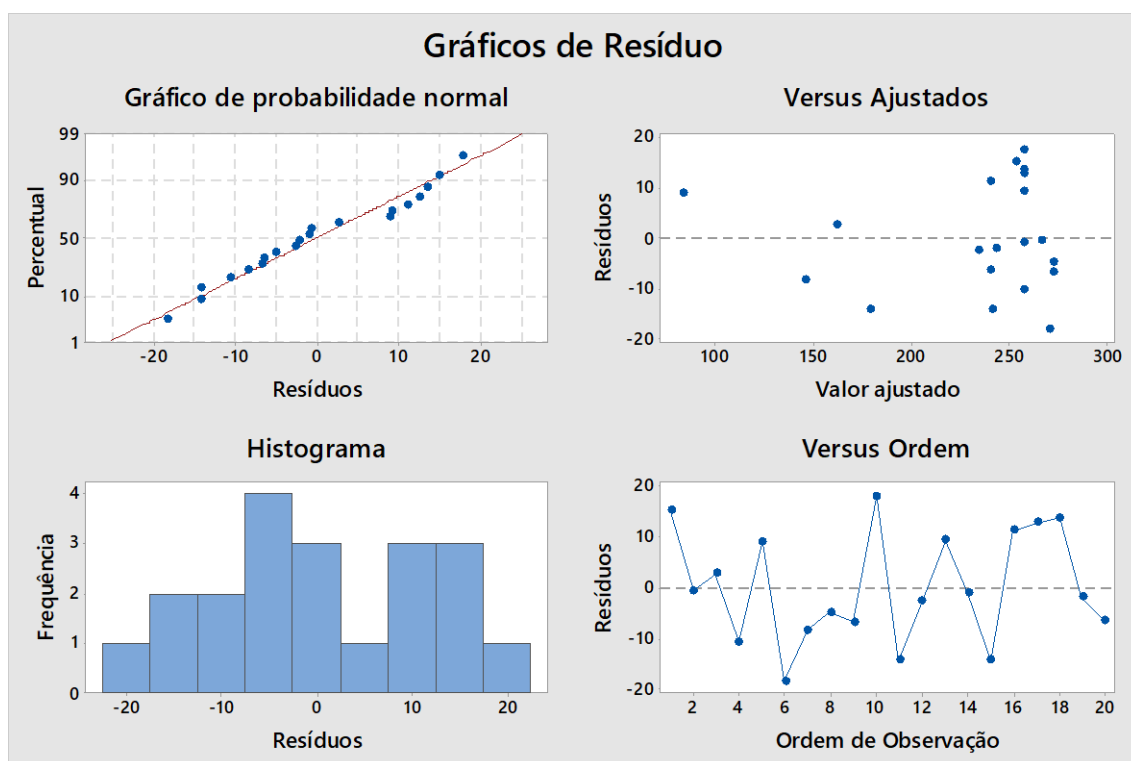


FIGURA 7

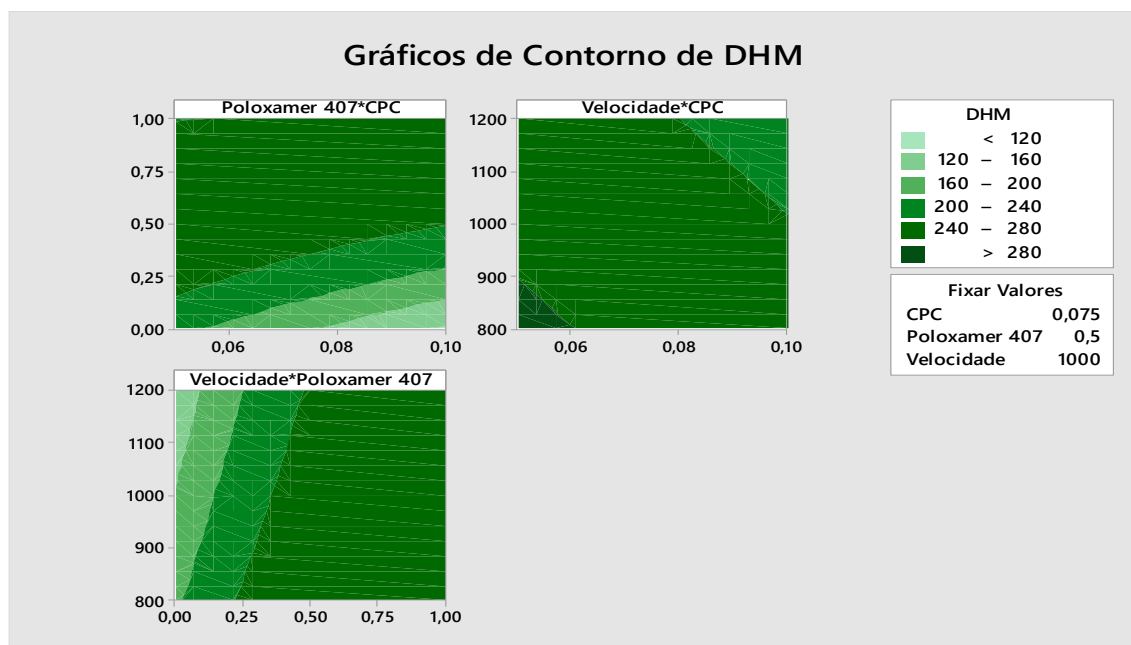
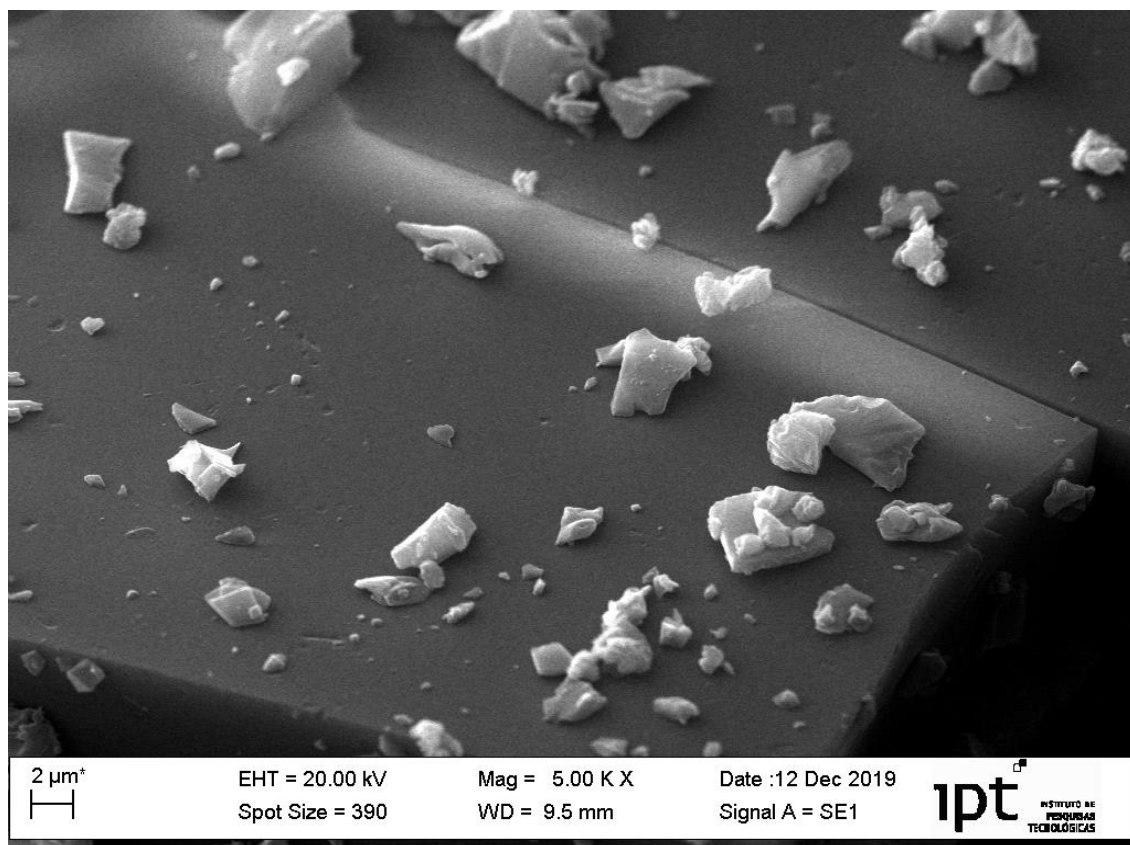


FIGURA 8

**FIGURA 9**

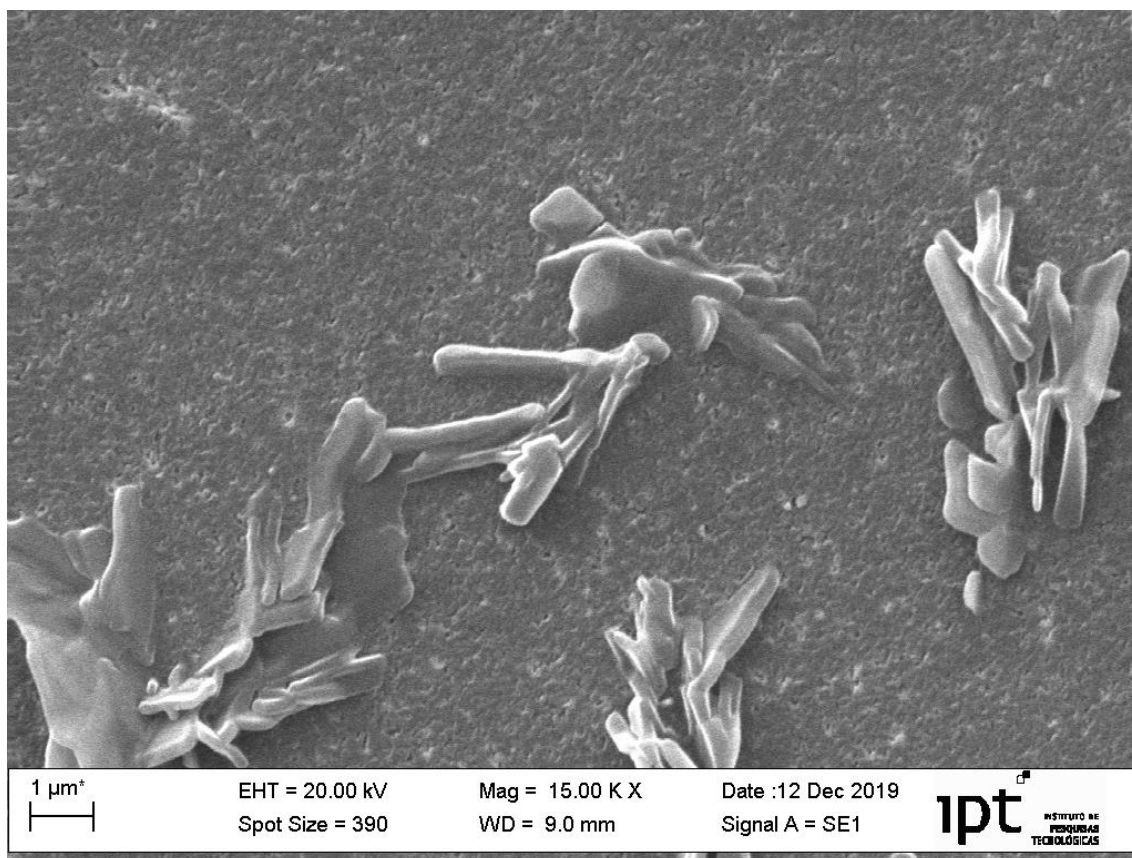


FIGURA 10

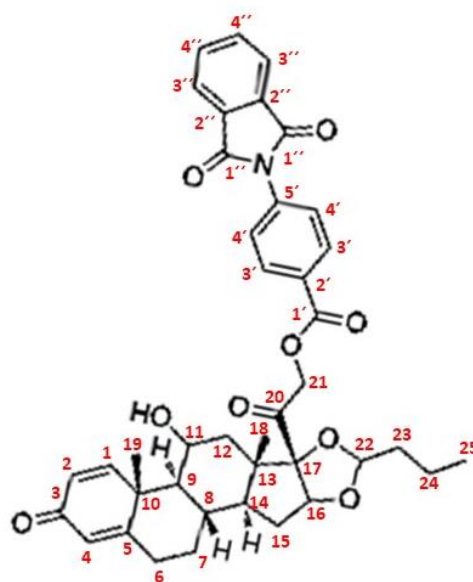


FIGURA 11

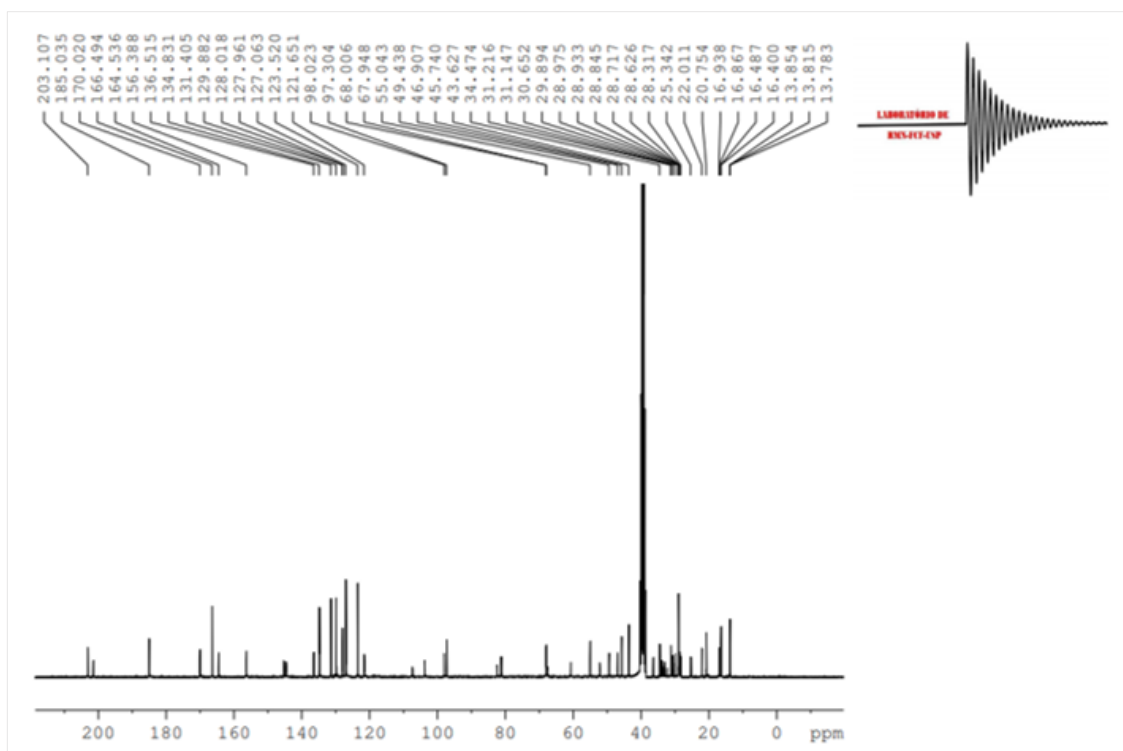


FIGURA 12

RESUMO**FORMULAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE COMPOSTO HÍBRIDO DE FTALIMIDA
COM BUDESONIDA E SEU USO COMO ANTI-INFLAMATÓRIO PARA
TRATAMENTO DE INFLAMAÇÕES OCULARES**

A presente invenção descreve a obtenção de nanocristais de um composto híbrido derivado de ftalimida associada com budesonida utilizando a moagem via úmida em escala reduzida e planejamento de experimentos denominado projeto fatorial (DoE), visando promover sua solubilidade de saturação e velocidade de dissolução em água, assim como, reduzir o tamanho da partícula para escala nanométrica, promovendo sua adequada biodisponibilidade. Deste modo, primeiramente, a presente invenção propõe uma formulação otimizada para o desenvolvimento de nanocristais do candidato a fármaco, sendo 1,0% (m/m) do composto híbrido de ftalimida com budesonida e 0,092% (m/m) de cloreto de cetilpiridínio. O sucesso surpreendente dessa formulação foi confirmado pelas avaliações morfológicas e físico-químicas dos nanocristais do candidato à fármaco. Adicionalmente, a presente invenção também propõe o uso da referida formulação contendo os nanocristais que apresentam características únicas para o tratamento de doenças inflamatórias, na forma de preparações oftálmicas.