



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Luis Felipe Costa Silva

Desenvolvimento de hidrogéis termosensíveis de xiloglucana, contendo nanoemulsão, para a liberação ocular de triancinolona acetonida, visando o tratamento da uveíte.

FLORIANÓPOLIS

2019

Luis Felipe Costa Silva

Desenvolvimento de hidrogéis termosensíveis de xiloglucana, contendo nanoemulsão, para a liberação ocular de triancinolona acetonida, visando o tratamento da uveíte

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elenara Lemos-Senna

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Luis Felipe Costa

Desenvolvimento de hidrogéis termosensíveis de xiloglucana, contendo nanoemulsão, para a liberação ocular de triancinolona acetônida, visando o tratamento da uveíte / Luis Felipe Costa Silva ; orientadora, Elenara Lemos Senna, 2016.

204 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2016.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Nanoemulsões. 3. Hidrogéis termosensíveis de xiloglucana. 4. Triancinolona acetônida. 5. Liberação ocular de fármacos. I. Lemos-Senna, Elenara. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.

Luis Felipe Costa Silva

Desenvolvimento de hidrogéis termosensíveis de xiloglucana, contendo nanoemulsão, para a liberação ocular de triancinolona acetona, visando o tratamento da uveíte.

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Marli Miriam de Souza Lima, Dr(a).
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Luis Alberto Kanis, Dr.
Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL

Prof. Alexandre Luiz Parize, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Pedro Luiz Manique Barreto, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Angela Machado de Campos, Dr(a).
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Prof. Dr.(a) Elenara Lemos-Senna
Coordenadora do Programa

Prof. Dr.(a) Elenara Lemos-Senna
Orientadora

Florianópolis, 18 de novembro de 2016.

Dedicado à minha família: Ana Paula, Isabel, Abreu e Irma, por todo o carinho, compreensão e suporte.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Elenara Lemos-Senna, pela oportunidade, incentivo, atenção, orientação, paciência e confiança no desenvolvimento desta tese.

Ao Redouane Borsali pela orientação, incentivo e oportunidade no desenvolvimento de parte deste trabalho. Ao Sami Halila pela confiança, pelas cobranças, disponibilidade e longas discussões sobre o trabalho, sempre “pleine des nouvelles”.

Aos professores Pedro Barreto, Josiel Domingos, Angela Machado de Campos, Flavio H. Reginatto, Simone Cardoso, Marcos Segatto Silva, e Thiago Caon pela disponibilidade, atenção e pelas discussões.

Aos pesquisadores e técnicos do CERMAV, Jean-Luc Putaux, Rachel Auzely, Eric Bayma, Christophe Travelet, Issei Otsuka, Claire Boisset, e Laurine Buon pelo auxílio na realização dos diferentes experimentos, ensinamentos e discussões.

À CAPES, ao CNPq, ao Institut Carnot Polynat e ao Centre National de la Recherche Scientifique pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho. E ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, pela bolsa PDSE- CAPES e pelo custeio de participação em congresso internacional.

Aos amigos e colegas do CERMAV, Djamila Ouhab, Anna Wolnik, Yoko Otsuka, Issei Otsuka, Jing Chen, Armelle Rocin, Laurent Goujon, Tatiane Popiolski, João, Éder Siqueira, Soraia Zaioncz, Talitha Stefanello, Carolina Noronha, Nívia Marques, Karine Zepon, Marcos Mariano, Tales Paiva e Joseane Vale, pela amizade e por tornar os momentos ainda mais especiais.

Aos amigos e colegas Gecioni Loch-Neckel, Simone Quintana, Mariana Dalagnol, Marina Batisti, Talitha Caldas, Marta Viera, Janaína Fröhlich, Aline Fonseca, Thiago Caon, Nilson Amaro, Sandra Scheffer, Letícia Mazzarino, Georgia Kasten, dentre tantos outros que passaram ao longo destes anos. Muito obrigado pela contribuição de vocês, pelo aprendizado, pelo café, e conversas descontraídas.

Agradeço imensamente à minha família; minha mãe, Isabel, ao Abreu, minha avó, Irma, pelo incentivo, ensinamentos, carinho, e por serem exemplos de respeito, honestidade, caráter, e estarem sempre ao meu lado, me apoiando.

À Tânia, Henrique, Luciane e Marcelo, pela amizade, companheirismo e carinho.

E agradeço especialmente à Ana Paula, minha noiva, pela compreensão, incentivo, conselhos, por estar sempre me amparando, dando forças para prosseguir, e pela cumplicidade.

RESUMO

Este trabalho visa desenvolver hidrogéis termosensíveis de xiloglucana, que apresentem propriedades mucoadesivas, e que contenham nanoemulsões para a liberação oftálmica de triancinolona acetona através da via tópica ocular. Para tanto, nanoemulsões foram desenvolvidas pela técnica de emulsificação espontânea, e diferentes parâmetros de formulação foram variados, visando a otimização do preparo do sistema coloidal. Devido à baixa viscosidade das NEs, promotores de viscosidade foram empregados para aumentar o tempo de residência da forma farmacêutica na superfície ocular, elevando a biodisponibilidade do fármaco. A xiloglucana é um polissacarídeo que apresenta propriedade termosensível após remoção parcial dos resíduos de galactose. Neste trabalho, foi estabelecida a cinética de degalactosilação da xiloglucana, e avaliado o impacto da enzima β -galactosidase sobre os diferentes oligossacarídeos que compõem a xiloglucana. Hidrogéis preparados com xiloglucana de diferentes graus de degalactosilação (GRR) foram avaliados, verificando que a temperatura de transição é inversamente proporcional ao GRR, e um polímero com GRR de 50 % (Deg⁵⁰-XG) foi selecionado devido menor temperatura de transição solução-gel. Hidrogéis foram preparados com diferentes concentrações de Deg⁵⁰-XG, e verificou-se que com o aumento de sua concentração ocorre uma redução da temperatura de gelificação e do tempo necessário para gelificação à 35 °C. Posteriormente, diferentes volumes de NEs foram adicionadas a uma solução de 3,0% (m/V) de Deg⁵⁰-XG em água, e observou-se que em uma proporção de 1:1 (v/v) o hidrogel conserva suas propriedades termosensíveis, apresentando gelificação à 35 °C em tempo hábil, mantendo o comportamento mucoadesivo da forma farmacêutica. Quando avaliada a permeação transcorneal da TA, observou-se que a presença de Deg⁵⁰-XG foi capaz de elevar o fluxo do fármaco através da córnea, e que os hidrogéis termosensíveis contendo NEs apresentaram maior k_p , TL e retenção no interior da córnea, indicando que o sistema possui potencial para o tratamento tanto de uveíte anterior quanto de uveíte posterior.

Palavras-chave: Nanoemulsões. Hidrogéis termosensíveis de xiloglucana. Triancinolona acetona.

ABSTRACT

This study aims to develop thermosensitive xyloglucan hydrogels, with mucoadhesive properties, loading nanoemulsions to triamcinolone acetonide ophthalmic delivery through topical pathway. Therefore, nanoemulsions were developed by spontaneous emulsification method, and different formulation parameters were evaluated to optimize the colloidal system development. As NEs are low-density system, employing viscosity enhancers must be used to increase the residence time of drug delivery systems on eye surface, increasing drug bioavailability. Xyloglucan is a polysaccharide which displays a thermosensitive properties after partial galactose removal rate (GRR). In this study it was established a xyloglucan degalactosylation kinetic, as well as the impact of the β -galactosidase enzyme on the different oligosaccharides components of xyloglucan. Xyloglucan hydrogels with different GRR were evaluated, and verified that there is an inverse proportion between GRR and transition sol-to-gel temperature. Then, a 50 % GRR xyloglucan (Deg⁵⁰-XG) was chosen as it displayed a lower transition temperature. Further, hydrogels at different pre-gel concentrations were prepared, and it shown that increasing Deg⁵⁰-XG concentration decreases the sol-to-gel transition temperature, as well as the time required to gelation at 35 °C. Posteriorly, different volume ratio of NEs were added on an 3.0% (w/v) Deg⁵⁰-XG water solution, and it was observed that an 1:1 volume ratio preserves the thermosensitive behavior, maintaining the mucoadhesive properties from Deg⁵⁰-XG solution without NEs. TA transcorneal permeation assay evidenced that Deg⁵⁰-XG was able to increase drug permeation flux across the cornea, and NE-loading thermosensitive Deg⁵⁰-XG hydrogel samples performed the highest k_p , TL and drug entrapment into the cornea, indicating the potential use of this system for treatment of both anterior and posterior uveitis.

Keywords: Nanoemulsions. Thermosensitive xyloglucan hydrogels. Triamcinolone acetonide.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura anatômica do globo ocular.....	38
Figura 2 – Estrutura química da triancinolona acetonida.....	42
Figura 3 – Representação esquemática das estruturas anatômicas envolvidas na drenagem lacrimonasal de formas farmacêuticas líquidas oftálmicas.....	43
Figura 4 – Representação esquemática do glicocálice.....	44
Figura 5 – Representação esquemática da estrutura histológica da córnea.....	46
Figura 6 – Representação esquemática de uma gotícula pertencente à nanoemulsão.....	49
Figura 7 – Mecanismo de formação das gotículas das nanoemulsões.....	50
Figura 8 – Representação esquemática dos mais comuns mecanismos de instabilidade de nanoemulsões.....	51
Figura 9 – Representação esquemática da estrutura de um hidrogel.....	57
Figura 10 – Representação esquemática da (A) estrutura química da xiloglucana extraída a partir do <i>Tamarindus indica</i> ; e (B) composição dos oligossacarídeos.....	60
Figura 11 – Representação esquemática da organização molecular em uma solução diluída de xiloglucana degalactosilada antes e após aquecimento a 37 °C.....	64

CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES PARA LIBERAÇÃO OCULAR DE TRIANCINOLONA ACETONIDA

Figure 1 – Triamcinolone acetonide oil solubility profile.....	81
Figure 2 – Droplet size (A); polydispersion index (PDI) (B); zeta potential (C); drug loading (D); and entrapment efficiency (E) values obtained for nanoemulsions prepared with different organic to aqueous phase volume ratios.....	83
Figure 3 – Droplet size (A); polydispersion index (PDI) (B); zeta potential (C); drug loading (D); and entrapment efficiency (E) values obtained for nanoemulsions prepared using different MCT oil amounts.....	85

Figure 4 – TEM micrographs obtained from (A) NE I _{200/1:3.3} ; (B) NE II _{200/1:3.3} ; (C) NE III _{200/1:3.3} ; and (D) NE IV _{200/1:3.3} at 400x magnification.....	86
Figure 5 – (A) Droplet size, (B) polydispersion index (PDI), (C) zeta potential, (D) drug loading, and (E) entrapment efficiency values obtained after storing the nanoemulsions at 4 ± 2 °C during 150 days. (●) NE I _{200/1:3.3} ; (○) NE II _{200/1:3.3} ; (■) NE III _{200/1:3.3} ; and (□) NE IV _{200/1:3.3}	87
Figure 6 – (A) Droplet size, (B) polydispersion index (PDI), (C) zeta potential, (D) drug loading, and (E) entrapment efficiency values obtained after storing the nanoemulsions at 25 ± 1 °C during 90 days. (●) NE I _{200/1:3.3} ; (○) NE II _{200/1:3.3} ; (■) NE III _{200/1:3.3} ; and (□) NE IV _{200/1:3.3}	88
Figure 7 – TA release profiles in lachrymal simulated fluid pH 7.4 containing 0.5% (w/v) sodium lauryl sulphate.....	89

CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS TERMOSENSÍVEIS DE XILOGLUCANA PARA LIBERAÇÃO OCULAR DE TRIANCINOLONA ACETONIDA

Scheme 1 – Schematic representation of: (A) xyloglucan structure; and (B) different oligosaccharide building blocks.....	102
Figure 1 – Kinetic of degalactosylation of XG expressed as (A) galactose removal ratio and (B) oligosaccharide composition of xyloglucan polysaccharide over time.....	108
Figure 2 – Temperature sweep rheological analysis of a 3.0% (w/v) aqueous solution of: (A) XG; (B) 47 % GRR Deg-XG; (C) 48 % GRR Deg-XG; and (D) 50 % GRR Deg-XG, where (—) G' on heating step; (—) G'' on heating step; (—) G' on cooling step; and (—) G'' on cooling step.....	110
Figure 3 – Temperature sweep rheological analysis of: (A) 1.5% (w/v) Deg ⁵⁰ -XG; (B) 2.0% (w/v) Deg ⁵⁰ -XG; (C) 2.5% (w/v) Deg ⁵⁰ -XG; and (D) 3.0% (w/v) Deg ⁵⁰ -XG, where (—) G' on heating step; (—) G'' on heating step; (—) G' on cooling step; and (—) G'' on cooling step.....	111
Figure 4 – Time sweep rheological analysis at 35 °C of: (A) 2.0 % (w/v) Deg ⁵⁰ -XG; (B) 2.5 % (w/v) Deg ⁵⁰ -XG; and (C) 3.0 % (w/v) Deg ⁵⁰ -XG, where (—) G' on heating step; (—) G'' on heating step.....	113
Figure 5 – Triamcinolone acetonide release profile obtained from 1.5 %, 2.0 %, 2.5 %, and 3.0 % (w/v) Deg ⁵⁰ -XG thermoresponsive hydrogel.....	114

CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS TERMOSENSÍVEIS DE XILOGLUCANA CONTENDO NANOEMULSÃO PARA LIBERAÇÃO OCULAR DE TRIANCINOLONA ACETONIDA

Figure 1 – (A) Relaxation time distribution at (---) and autocorrelation function at (—○—) 130°, (—○—) 90°, and (—○—) 50° scattering angle, and inverse decay times (τ^{-1}) vs. modulus of the scattering vector (q^2) of NE; and (B) NE image obtained by TEM analysis.....138

Figure 2 – Effect of 3.0% (w/v) Deg⁵⁰-XG water solution: NE_{TA} volume ratio (v/v) on gelation temperature (°C) (—■—), and time for gelling at time at 35 °C (min) (—□—).....140

Figure 3 – Temperature sweep rheological analysis of 3.0% (w/v) Deg⁵⁰-XG water solution:NE_{TA} (v/v) at volume ratio of (A) 1:0 (B) 1:0.5 (C) 1:0.75; (D) 1:1; (E) 1:1.25; and (F) 1:1.5 where (—) G' on heating step; (—) G'' on heating step; (—) G' on cooling step; and (—) G'' on cooling step.....140

Figure 4 – Effect of 3.0% (w/v) Deg⁵⁰-XG water solution:NE_{TA} volume ratio (v/v) on $\Delta G'_{rel}$ at 10 °C (—■—), and at 35 °C (—□—).....141

Figure 5 – Triamcinolone acetonide transcorneal permeation profiles from: (—▲—) NE_{TA}; (—●—) Deg⁵⁰-XG-TA; and (—■—)Deg⁵⁰-XG-NE_{TA}, across excised porcine cornea ($n = 6$).....142

DISCUSSÃO GERAL

Figure 1 – Efeito da razão volumétrica (v/v) entre uma solução aquosa a 3.0% (m/V) de Deg⁵⁰-XG e NE_{TA} sobre $\Delta \tan \delta$ a 10 °C (—■—), e $\Delta \tan \delta$ a 35 °C (—□—).....160

APÊNDICE A

Figure 1 – Sobreposição dos cromatogramas das: (A) Diluente; (B) Extração da nanoemulsão branca; (C) Extração da córnea fresca; (D) Solução padrão de triancinolona acetona; (E) Extração da nanoemulsão contendo triancinolona acetona; e (F) Extração da córnea contendo triancinolona acetona retida.....179

Figure 2 – Curva de calibração de triancinolona acetona.....180

Figure 3 – Sobreposição dos cromatogramas das: (A) Diluente; (B) Extrato da córnea suína no diluente; (C) Solução padrão de triancinolona acetona em diluente; (D) Solução padrão de triancinolona acetona preparada no diluente contendo extrato da córnea suína; (E) Solução amostra do meio de liberação; e (F) Solução de triancinolona acetona permeada através da córnea suína utilizando amostra de Deg⁵⁰-XG:NETA.....186

Figure 4 – Curva de calibração de triancinolona acetona.....187

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES PARA LIBERAÇÃO OCULAR DE TRIANCINOLONA ACETONIDA

Table 1 – Nanoemulsion formulations.....	80
Table 2 – Physicochemical and drug loading properties of TA-loaded nanoemulsions (n =3).....	85
Table 3 – Dissolution efficiency values obtained for TA-loaded nanoemulsions and free drug.....	90

CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS TERMOSENSÍVEIS DE XILOGLUCANA PARA LIBERAÇÃO OCULAR DE TRIANCINOLONA ACETONIDA

Table 1 – Dissolution efficiency values (DE%) and kinetic parameters obtained from TA release profile from Deg ⁵⁰ -XG hydrogel	117
---	-----

CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS TERMOSENSÍVEIS DE XILOGLUCANA CONTENDO NANOEMULSÃO PARA LIBERAÇÃO OCULAR DE TRIANCINOLONA ACETONIDA

Table 1 – Transcorneal TA permeation parameters (n = 6).....	145
--	-----

DISCUSSÃO GERAL

Table 1 – Parâmetros reológicos para as diferentes concentrações de Deg ⁵⁰ -XG na temperatura de 35 °C, temperatura de transição sol-gel e tempo para transição a 35 °C.....	157
---	-----

APÊNDICE A

Table 1 – Parâmetros cromatográficos avaliados para determinação da robustez do método.....	178
Table 2 – Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade do método cromatográfico para determinação da triancinolona acetona.....	180
Table 3 – Resultados obtidos na avaliação da precisão intermediária do método cromatográfico para determinação da triancinolona acetona.....	181
Table 4 – Recuperação da triancinolona acetona após contaminação da amostra de branca de nanoemulsão e à amostra de córnea suína fresca.....	181
Table 5 – Resultados obtidos na avaliação da robustez do método de quantificação da triancinolona acetona por HPLC.....	182
Table 6 – Parâmetros cromatográficos avaliados para determinação da robustez do método.....	185
Table 7 – Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade do método cromatográfico para determinação da triancinolona acetona.....	188
Table 8 – Resultados obtidos na avaliação da precisão intermediária do método cromatográfico para determinação da triancinolona acetona.....	188
Table 9 – Recuperação da triancinolona acetona após contaminação da amostra de branca de nanoemulsão e à amostra de córnea suína fresca.....	189
Table 10 – Resultados obtidos na avaliação da robustez do método de quantificação da triancinolona acetona por HPLC.....	189

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ALF – Fluido lacrimal simulado, do inglês Artificial lachrymal fluid

ANOVA – Análise da variância

AP – Fase aquosa, do inglês Aqueous phase

AP-1 – Proteína ativadora 1

ATB O,+ – Transportador de aminoácidos catiônicos e neutros

AUC – Área sob a curva, do inglês Area under curve

BCRP – Proteína de resistência de câncer de mama

CNT2 – Transportadores de nucleotídeos

C*[η] – Concentração crítica

COX-2 – Enzima ciclooxygenase-2

Δ – Movimento Browniano

D – Coeficiente de difusão

DE% – Eficiência de dissolução

Deg⁵⁰-XG – Xiloglucana com grau de degalactosilação de 50 %.

Deg⁵⁰-XG-NE-TA – Hidrogel termosensível de xiloglucana contendo nanoemulsões carreando triancinolona acetonida

Deg⁵⁰-XG-TA – Hidrogel termosensível de xiloglucana contendo triancinolona acetonida livre

DL – Teor, do inglês Drug loading

DLS – Espalhamento de luz dinâmico

DP7 – XXXG ou heptassacarídeo

DP8 – XLXG, ou XLXG, ou octassacarídeo

DP9 – XLLG ou nonassacarídeo

EE% – Eficiência de encapsulação, do inglês Entrapment Efficiency

Γ – Frequência de relaxamento

ft – Fração do fármaco liberado, do inglês Fraction of the drug release at time

g – Aceleração da gravidade

G` – Módulo dinâmico de armazenamento

G`` – Módulo dinâmico viscoso

GC–MS – Cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas
GR α – Receptor de glicocorticoide α
GR β – Receptor de glicocorticoide β
GRR – Razão de remoção de galactose
 η – Viscosidade
HL % – Nível de hidratação da córnea, do inglês Corneal hydration level
HPAE–PAD – Cromatografia líquida de troca iônica com detector de potencial amperométrico
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
HPMC - Hidroxipropilmetilcelulose
IgG – Imunoglobulina G
IL – Interleucina
Js – Fluxo
K0 – Constante de zero-ordem
K1 – Constante de primeira ordem
kB – Constante de Boltzmann
KH – Constante de Higuchi.
KKP – Constante de Korsmeyer-Peppas
kp – Coeficiente de permeação
LCST – Temperatura crítica inferior de solubilização
LVR – Região linear viscoelástica, do inglês Linear viscoelastic regime
MCT – Triglicerídeo de cadeia média (inglês Medium chain triglyceride).
MRP – Proteínas multi-fármacos resistentes
MUC1, MUC4 e MUC16 – Mucina associada à membrana
MUC5AC – Mucina formadora de gel de alta massa molar
MUC7 – Mucina de menor massa molar
v – Velocidade de cremagem
NEs – Nanoemulsões
NE-TA – Nanoemulsão contendo triancinolona acetonida
NF- κ B – Fator nuclear κ B
OP – Fase orgânica, do inglês Organic phase
P1 – Coeficiente de partição
P2 – Coeficiente de difusão
PDI – Índice de polidispersão

PEO – Poli(óxido de etileno)
PepT1 – Transportador de peptídeos
Pg-P – Glicoproteína-P
pH – Potencial hidrogeniônico
pKa – Potencial da constante de acidez
PPO – Poli(óxido de propileno)
q² – Vetor de onda
Qt – Massa de fármaco permeado, do inglês Amount of drug permeated
r – raio
R² – Coeficiente de correlação
Rg – Raio de giração
Rh – Raio hidrodinâmico
SAXS – Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
SLS – Espalhamento de luz estático
SUN – The Standardization of Uveitis Nomenclature
τ – Tempo de relaxamento
t – Tempo
TA – Triancinolona acetona, ou Triamcinolone acetone
TEM – Microscopia eletrônica de transmissão, do inglês Transmission electron microscopy
TFA – Ácido trifluoroacético
TKP – Pó da semente de tamarindo, do inglês Tamarind kernel powder
TL – Tempo de latência
UCST – Temperatura crítica superior de solubilização
USP – Farmacopéia dos Estados Unidos da América, do inglês United States Pharmacopoeia
UV – Ultravioleta
XG – Xiloglucana
XLLG – Nonassacarídeo da xiloglucana
XLXG – Octassacarídeo da xiloglucana
XXLG – Octassacarídeo da xiloglucana
XXXG – Heptassacarídeo da xiloglucana
ξ potential – Potencial zeta

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	INTRODUÇÃO	29
1.1	OBJETIVOS.....	32
1.1.1	Objetivo Geral	32
1.1.2	Objetivos Específicos	32
	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	37
2.1	UVEÍTE.....	37
2.2	CORTICOSTEROIDES	40
2.2.1	Triancinolona acetona	41
2.3	ADMINISTRAÇÃO OCULAR POR VIA TÓPICA.....	42
2.4	NANOEMULSÕES	48
2.4.1	Preparo das nanoemulsões	49
2.4.2	Estabilidade das nanoemulsões	51
2.4.3	Emprego das nanoemulsões para liberação ocular de fármacos	54
2.5	HIDROGÉIS.....	56
2.5.1	Xiloglucana	59
2.5.1.1	Hidrogéis termosensíveis de xiloglucana	62
2.6	SISTEMAS MUCOADESIVOS	66
	CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES PARA LIBERAÇÃO OCULAR DE TRIANCINOLONA ACETONIDA	71
	CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS TERMOSENSÍVEIS DE XILOGLUCANA PARA LIBERAÇÃO OCULAR DE TRIANCINOLONA ACETONIDA	95

	CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS TERMOSENSÍVEIS DE XILOGLUCANA CONTENDO NANOEMULSÃO PARA LIBERAÇÃO OCULAR DE TRIANCINOLONA ACETONIDA.....	123
	DISCUSSÃO GERAL	151
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	163
	APÊNDICE A – VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE TRIANCINOLONA ACETONIDA.....	171
1	MÉTODO I.....	175
1.1	METODOLOGIA	175
1.1.1	Condição cromatográfica.....	175
1.1.2	Especificidade	175
1.1.3	Linearidade e Limites de quantificação e de detecção.....	176
1.1.4	Precisão	176
1.1.5	Exatidão	177
1.1.6	Robustez.....	177
1.2	RESULTADOS.....	178
1.2.1	Especificidade.....	178
1.2.2	Linearidade e limites de quantificação e de detecção	179
1.2.3	Precisão	180
1.2.4	Exatidão	181
1.2.5	Robustez.....	181
1.3	CONCLUSÕES	182
2	MÉTODO II.....	183
2.1	METODOLOGIA	183
2.1.1	Condição cromatográfica.....	183
2.1.2	Especificidade.....	183
2.1.3	Linearidade e limites de quantificação e de detecção	184
2.1.4	Precisão	184

2.1.5	Exatidão	184
2.1.6	Robustez	185
2.2	RESULTADOS	185
2.2.1	Especificidade	185
2.2.2	Linearidade e limites de quantificação e de detecção	186
2.2.3	Precisão	187
2.2.4	Exatidão	187
2.2.5	Robustez	188
2.3	CONCLUSÕES	188
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	191

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Uveíte é um termo geral que descreve uma ampla variedade de condições inflamatórias da via ocular. É uma doença prevalente em todo o mundo que pode comprometer consideravelmente a capacidade visual, sendo responsável por 10 % dos casos de perda total de visão nos países industrializados. Seu tratamento consiste, basicamente, na terapia com corticosteroides, os quais exibem poderosos efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores (ABAD et al., 2009).

A triancinolona acetonida é um anti-inflamatório corticosteroide, geralmente administrada por via tópica oftálmica ou via oral. A administração tópica ocular deste fármaco tem sido proposta por proporcionar maiores concentrações de fármaco nos tecidos oculares, e paralelamente reduzir a incidência dos efeitos adversos, quando comparada com a administração oral da triancinolona acetonida (CUNNINGHAM JUNIOR; WENDER, 2010; GAUDANA et al., 2010). Dentre as preparações de uso oftálmico, as formas farmacêuticas líquidas são de fácil administração, porém apresentam desvantagens devido a sua diluição no filme lacrimal, à drenagem para a cavidade pré-corneal e à drenagem lacrimonasal, que restringem o tempo de contato do medicamento com o olho. Estes fatores pré-corneais somados agem como barreira, levando à eliminação de mais de 90 % da dose administrada, antes que ocorra a absorção do fármaco (VENKATA; MADHAVI; RAJESH, 2011).

Diferentes estratégias têm sido adotadas para a melhoria da biodisponibilidade ocular de fármacos, destacando-se o uso de promotores de viscosidade, polímeros mucoadesivos e sistemas de liberação coloidais. Estas estratégias visam o aumento do tempo de retenção da forma farmacêutica no olho e, conseqüentemente, a elevação da permeação transcorneal e biodisponibilidade ocular do fármaco (RUPONEN; URTTI, 2015).

Nas últimas décadas, têm sido demonstrado o interesse da utilização de nanoemulsões como veículos para a liberação ocular de fármacos. Nanoemulsões são dispersões coloidais cineticamente estáveis, constituídas de óleo e água, em que a fase dispersa apresenta tamanho entre 50 e 200 nm. Estes sistemas possuem capacidade de veicular fármacos hidrofóbicos, atuando como reservatórios, além

controlar a liberação, promover a permeação e inibir efluxo dos mesmos (GAUDANA et al., 2010; DIVSALAR et al., 2012).

Os hidrogéis também figuram como sistemas de liberação promissores para administração ocular de fármacos. Estes permitem um prolongamento do tempo de residência da forma farmacêutica na superfície do olho, devido à redução da drenagem lacrimal (ANDREWS; LAVERLY; JONES, 2009). Os hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos capazes de imobilizar grandes quantidade de água ou de fluidos biológicos, e podem ser formados por meio de estímulos específicos, como a alteração da temperatura, transitando de solução viscosa para estado gel em função da mesma. Quando um polímero é dissolvido em água, três tipos de interações estão presentes: entre as moléculas do polímero, entre o polímero e a água e entre as moléculas de água. Nos polímeros termosensíveis, a alteração da temperatura resulta em uma energia livre de Gibbs negativa, o que torna desfavorável a associação entre polímero e água, facilitando as interações polímero-polímero através de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, entre outras (KLOUDA; MIKOS, 2008; RUEL-GARIÉPY; LEROUX, 2004).

Existem dois tipos principais de polímeros termosensíveis; o primeiro apresenta uma temperatura crítica inferior de solubilização (LCST, do inglês lower critical solution temperature), enquanto o segundo possui uma temperatura crítica superior de solubilização (UCST, upper critical solution temperature). LCST e UCST são, respectivamente, pontos críticos de temperaturas abaixo ou acima das temperaturas nas quais os polímeros são completamente miscíveis em um dado solvente (WARD; GEORGIU, 2011). Abaixo da LCST o polímero se encontra no estado solúvel, caracterizado por uma solução translúcida e homogênea, e a medida que a temperatura é elevada (acima da LCST), o polímero se torna insolúvel, levando à formação do hidrogel. Este fenômeno também é conhecido como efeito hidrofóbico, em que a entropia aumenta devido à associação água-água. Na temperatura crítica, as ligações de hidrogênio entre o polímero e água começam a ser desfavoráveis, comparado às interações polímero-polímero e água-água, e uma transição abrupta ocorre quando a macromolécula solvatada rapidamente desidrata e se torna mais hidrofóbica (KLOUDA; MIKOS, 2008; RUEL-GARIÉPY; LEROUX, 2004).

Muitos polímeros têm sido utilizados no preparo de géis termosensíveis, e uma atenção especial tem sido dedicada aos polissacarídeos (NISBET et al., 2006). A xiloglucana é um polissacarídeo neutro, não tóxico e biodegradável, derivado da semente da tamarindo. É composto de uma cadeia principal β -(1,4)-D-glicosídica substituída lateralmente por ligações α -(1,6)-D-xilose, estes resíduos de xilose, por sua vez são parcialmente substituídos por resíduos de β -(1,2)-D-galactose. O polissacarídeo xiloglucana é composto por uma mistura de quatro oligômeros diferentes denominados heptasacarídeos, octosacarídeos e nonasacarídeos, os quais diferem no número de cadeias laterais de galactose.

A xiloglucana apresenta propriedade termosensível somente quando parcialmente degalactosilada (SHIRAKAWA; YAMATOYA; NISHINARI, 1998), sendo a temperatura de transição do estado sol-gel inversamente proporcional à concentração do polímero e à taxa de remoção da galactose (BRUN-GRAEPPPI et al., 2010; RUEL-GARIÉPY; LEROUX, 2004). Adicionalmente, a xiloglucana apresenta propriedade mucoadesiva, ou seja, interage com a camada de muco que reveste as mucosas, o que permite reter a formulação na superfície ocular. O muco lubrifica e protege os tecidos epiteliais de danos mecânicos e químicos. O principal componente do muco é a proteína glicosilada chamada mucina, uma molécula de núcleo proteico com cadeias de carboidratos ligados covalentemente ao longo de seu comprimento. Estas glicoproteínas são responsáveis pelas propriedades tipo gel do muco (SERRA; DOMÉNECH; PEPPAS, 2006).

A via de administração tópica é uma alternativa interessante e mais segura para o tratamento de doenças oftálmicas, no entanto, baixas concentrações de fármaco são permeadas através dos tecidos oculares, em função dos mecanismos de proteção do olho e do efeito barreira promovido pela estrutura do epitélio corneal (GAUDANA et al., 2010; GUNDA et al., 2008) Assim, a necessidade do aprimoramento da terapia tópica é de extrema importância para aumento da eficácia terapêutica e segurança no tratamento. Tendo em vista as vantagens apresentadas com o uso das nanoemulsões e dos hidrogéis mucoadesivos, este trabalho tem como objetivo desenvolver hidrogéis de xiloglucana contendo nanoemulsões, para o

aumento do tempo de residência da formulação na superfície ocular e da permeação transcorneal da triancinolona acetona, com vistas ao tratamento da uveíte.

Este trabalho está subdividido em três capítulos, escritos na forma de artigos científicos. O Capítulo I aborda os estudos de pré-formulação, desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões contendo triancinolona acetona, enquanto o Capítulo II apresenta a degalactosilação da xiloglucana, bem como a seleção de parâmetros adequados para o preparo dos hidrogéis termosensíveis de xiloglucana. O Capítulo III, por sua vez, apresenta o desenvolvimento e caracterização de hidrogéis termosensíveis de xiloglucana contendo nanoemulsões para a liberação oftálmica de triancinolona acetona, e avalia as propriedades de permeação transcorneal do fármaco a partir dos sistemas desenvolvidos. Posteriormente será apresentada uma sessão de discussões gerais e considerações finais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver hidrogéis de xiloglucana contendo nanoemulsões, para o aumento do tempo de residência da formulação na superfície ocular e da permeação transcorneal da triancinolona acetona, com vistas ao tratamento da uveíte.

1.1.2 Objetivos Específicos

Desenvolver nanoemulsões contendo triancinolona acetona.

Avaliar os efeitos dos parâmetros de formulação sobre as propriedades físico-químicas das nanoemulsões e sobre a eficiência de encapsulação da triancinolona acetona.

Avaliar a estabilidade física das nanoemulsões frente ao armazenamento a 4 °C e 25 °C.

Avaliar o perfil de liberação da triancinolona acetona a partir das nanoemulsões.

Obter hidrogéis termosensíveis através da degalactosilação enzimática da xiloglucana.

Avaliar as propriedades reológicas dos hidrogéis de xiloglucana com diferentes concentrações do polímero.

Avaliar a capacidade dos hidrogéis em incorporar as nanoemulsões e avaliar o efeito da incorporação das mesmas nas propriedades reológicas.

Avaliar as propriedades mucoadesivas dos hidrogéis de xiloglucana contendo as nanoemulsões.

Avaliar o perfil de permeação transcorneal da triancinolona acetona a partir do hidrogel de xiloglucana.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção serão apresentados os embasamentos teóricos para construção da problemática e das hipóteses desta tese.

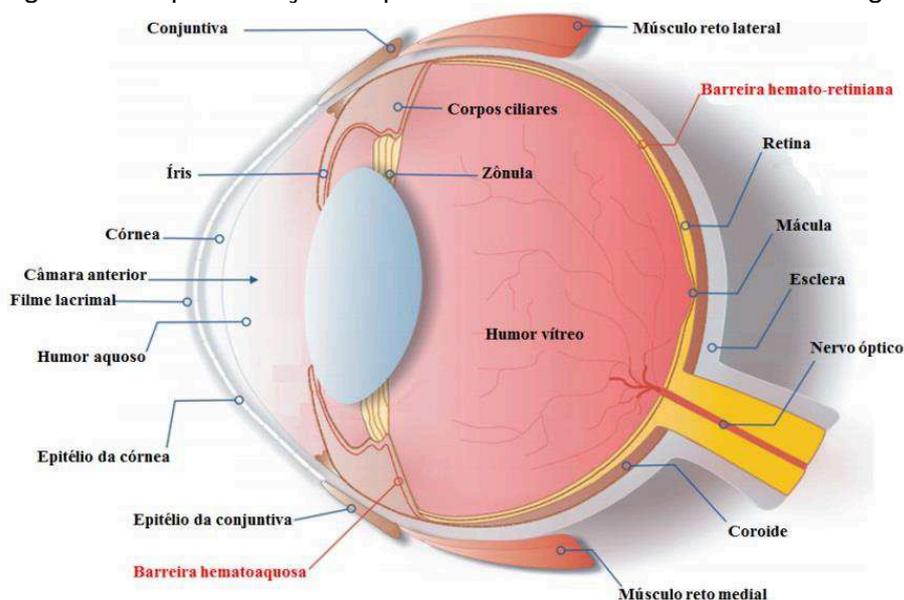
2.1 UVEÍTE

A uveíte é definida como um processo inflamatório do trato uveal, ou úvea, que compreende a íris, os corpos ciliares, e a coroide. No entanto, o uso deste termo se refere, ainda, à inflamação de tecidos adjacentes, incluindo a córnea, esclera, retina, e até mesmo o nervo ótico (DUNN, 2015). De acordo com *The Standardization of Uveitis Nomenclature* (SUN) (2005), a uveíte pode ser classificada, em função da localização anatômica do processo inflamatório, em: uveíte anterior, que compreende a porção anterior do globo ocular; intermediária, que acomete a região vítrea; posterior, compreendendo a retina ou a coroide; e a panuveíte, que inclui a porção anterior, a região vítrea, e a retina ou a coroide (Figura 1). Esta ainda pode ocorrer de forma unilateral, quando somente um dos olhos é afetado, ou bilateral, quando os dois olhos são acometidos simultaneamente. De acordo com a evolução clínica, a uveíte pode ser classificada como: aguda, duração de até 3 meses; crônica, duração superior a 3 meses; ou recorrente, quando há reincidência da doença após remissão completa. Quanto à anatomopatologia, pode ser subdividida em: granulomatosa, caracterizada pela tendência a formação de nódulos de íris e precipitados ceráticos; e não granulomatosa, com pequena ou nenhuma tendência à formação tanto de nódulos quanto de precipitados ceráticos (DESCHENES et al., 2008; DIAMANTAS; LOWDER; MUCCIOLI, 2003).

A uveíte é uma doença heterogênea com influências poligênicas e ambientais. Sua etiologia pode ser de caráter infeccioso, decorrente de doenças como sífilis, tuberculose, toxoplasmose, entre outras; ou não-infeccioso, mediada pelo sistema imune ou induzida por medicamentos (ABAD, et al., 2009; MOORTHY; VALLURI; JAMPOL, 1998; WILLERMAIN et al., 2012). Os casos de uveíte não-

infecciosa modulados pelo sistema imune são mais prevalentes e são caracterizados pela infiltração de leucócitos no tecido intraocular. No entanto, o mecanismo envolvido na uveíte ainda não é completamente esclarecido, mas vem sendo estudado em modelos animais (COMMODARO et al., 2011). Os sintomas da uveíte variam de acordo com a localização anatômica, tipo e duração da uveíte, mas de modo geral incluem desordens visuais, dor, fotofobia, fotopsia, pontos cegos, e halos, sendo que catarata, edema macular, membrana epirretiniana, e glaucoma são algumas das complicações mais comuns da uveíte, causando perda visual (DUNN, 2015).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura anatômica do globo ocular



Fonte: Adaptado de Barrar, Javadzede e Omidi (2008).

Estudos epidemiológicos sobre a prevalência da uveíte têm sido realizados, porém sempre considerando uma parcela muito restrita da população. De forma geral, a incidência em países desenvolvidos é de aproximadamente 17 a 52 casos a cada 100.000 habitantes, tendo ocorrido cerca de 38 a 714 casos por 100.000 habitantes no ano de 2000 (CHANG; WAKEFIELD, 2002; GRITZ; WONG, 2004; SAARI et al., 1995; de SMET et al., 2011). Estima-se que mais de 2 milhões de pessoas no mundo sejam afetadas pela uveíte, porém com avanços significativos no tratamento desta doença, a prevalência de cegueira secundária à uveíte foi reduzida significativamente nos últimos 30 anos. No entanto, em um estudo realizado nos

Estados Unidos, a incidência da uveíte mostrou ser aproximadamente três vezes maior àquela estimada e pareceu aumentar em decorrência do envelhecimento da população (GRITZ; WONG, 2004), sendo que a uveíte anterior apresentou maior prevalência, seguido da panuveíte, da uveíte posterior e da uveíte intermediária (FOSTER et al., 2015). Adicionalmente, Chang e Wakefield (2002) relatam que há influência de variáveis geográficas, ambientais, e genéticas sobre a prevalência da uveíte no mundo.

No Brasil, estudos regionais vêm sendo realizados de forma isolada. Camilo, Moura e Arantes (2014) avaliaram 480 pacientes entre os meses de maio e julho de 2012, dos quais 117 foram diagnosticados com uveíte. Dentre os pacientes com uveíte, foi observado que 70,1 % apresentavam uveíte anterior, 26,5 % uveíte posterior, e 3,4% panuveíte (afetando a região anterior e posterior). Os pacientes com uveíte posterior possuíam idade média inferior àqueles com uveíte anterior e panuveíte. Gouveia e colaboradores (2004), ao avaliar pacientes no Serviço de Uveítes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina na Universidade de São Paulo no período de fevereiro a agosto de 2002, observaram que as principais causas de uveíte no Brasil estão relacionadas à doença de Behçet, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada, toxoplasmose e à artrite reumatoide juvenil. Teixeira e colaboradores (2016) observaram uma incidência de 3,2 pacientes diagnosticados com uveíte em cada 1000 pacientes, no Hospital de Olhos Francisco Vilar em Teresina, Piauí. Fernandez e colaboradores (2016) observaram que 29,25 % dos pacientes diagnosticados com uveíte apresentavam uveíte anterior, 7,22 % uveíte intermediária, 40,08 % uveíte posterior, 15,97 % com panuveíte, e 7,50 % esclerite, sendo que destes pacientes, 40,74 % apresentavam uveíte crônica. Os autores ainda apontam que 10,9 % dos pacientes com uveíte apresentavam como comorbidade a síndrome da imunodeficiência adquirida e 24 % a toxoplasmose, tuberculose ou sífilis.

Dunn (2015) relata que a uveíte é a quarta doença, dentre aquelas que possuem prevenção, que mais causa cegueira em população de meia-idade em países desenvolvidos, e é responsável por cerca de 10 a 15 % dos casos de cegueira no mundo, incluindo 30000 novos casos ao ano nos EUA. Além disso, as

comorbidades associadas à uveíte causam um forte impacto sobre os adultos em idade economicamente ativa, uma vez que 70 a 90 % dos pacientes que apresentam uveíte se encontram na faixa etária de 20 a 60 anos.

Não existe um regime padrão de tratamento para a uveíte, e a terapia é baseada na eficácia, lateralidade, localização anatômica, resposta à tratamentos anteriores, tolerância ao tratamento, e existência de comorbidades. O tratamento mais comum é o emprego de corticoesteróides, progredindo para agentes imunossupressores caso não haja resposta ao tratamento inicial (DUNN, 2015).

2.2 CORTICOSTEROIDES

Os corticoesteroides podem ser utilizados de forma local (tópica, periocular, ou intravítrea) ou sistêmica (oral ou intravenosa), e seu efeito anti-inflamatório e imunossupressor não possui um mecanismo completamente elucidado. Sabe-se que esta classe de fármacos possui a capacidade de inibir as manifestações iniciais e tardias da inflamação, além de afetar as reações inflamatórias causadas por patógenos invasores, por estímulos químicos ou físicos, ou por respostas autoimunes (RANG et al., 2004).

Após penetrarem nas células, os corticoesteroides se ligam a receptores específicos ($GR\alpha$ e $GR\beta$) no citoplasma. Os complexos receptor-corticoesteroide formam dímeros, que a seguir migram para o núcleo e interagem com o ADN (ou DNA), induzindo ou inibindo a expressão de genes específicos. Estes agentes inibem a ação de fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1, responsáveis pela indução da transcrição dos genes da ciclooxigenase-2 (COX-2), de várias citocinas, e de fatores de adesão, bem como da isoforma induzível da óxido nítrico sintase (CUNNINGHAM JUNIOR; WENDER, 2010; RANG et al., 2004).

Os corticoesteroides podem induzir a síntese de anexina-1 (ou lipocortina-1) que inibe a atividade da fosfolipase A_2 , impedindo que o ácido aracdônico seja liberado da membrana fosfolipídica (JERMAK et al., 2007). A atividade anti-inflamatória ainda pode ser exercida pela redução do recrutamento de neutrófilos e pela redução da atividade dos neutrófilos e dos macrófagos, devido à transcrição diminuída dos genes dos fatores de adesão celular e das citocinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- γ ; diminuição da ação das células T auxiliares e proliferação clonal

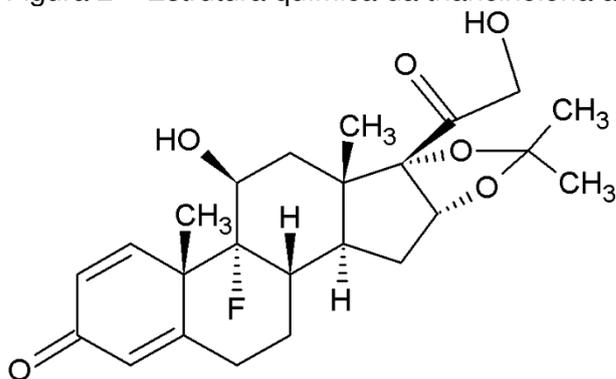
reduzida de células T, principalmente através da transcrição diminuída dos genes da IL-2 e seu receptor; redução na concentração plasmática dos componentes do complemento; redução na produção de óxido nítrico induzido; redução da liberação de histamina dos basófilos; e redução da produção de IgG, são outros mecanismos envolvidos na ação anti-inflamatória dos corticosteroides (RANG et al., 2004).

2.2.1 Triancinolona acetonida

A triancinolona acetonida (TA) (Figura 2) é um anti-inflamatório corticosteroide sintético, amplamente utilizado, que apresenta caráter lipofílico, com solubilidade aquosa à 37 °C inferior a 21 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ com redução da solubilidade em função da adição de sais (BEHL; BLOCK; BORKE, 1976), log P e pKa estimados de 2,31 e 13,4, respectivamente (DRUGBANK, 2016).

Possui absorção oral, metabolismo e excreção relativamente rápidos e extensos, atingindo níveis plasmáticos máximos em torno de 1,5 a 2,0 horas após administração de uma única dose oral de 800 mg, onde cerca de 68 % do fármaco se liga às proteínas plasmáticas, e nenhum composto relacionado ou metabólito é detectado no plasma 24 horas após administração oral. Os metabólitos da triancinolona apresentam reduzida atividade anti-inflamatória devido a alterações estruturais. Sendo assim, altas concentrações de fármaco com grande frequência de doses são requeridas (ARGENTI et al., 2000; JONAS, 2004; JERMAK et al., 2007). Assim, como os demais corticoesteróides, a exposição sistêmica prolongada à TA pode levar ao desenvolvimento de efeitos indesejáveis, tais como insuficiência suprarrenal, supressão da resposta a infecções, supressão da síntese de corticosteroides endógenos, síndrome de Cushing, osteoporose, tendência à hiperglicemia, glaucoma, elevação da pressão intracraniana, hipercoagulabilidade, incidência maior de catarata, entre outros (RANG et al., 2004). Logo, rotas de administração alternativas à via oral são recomendadas.

Figura 2 – Estrutura química da triancinolona acetona.



Fonte: Produzido pelo autor.

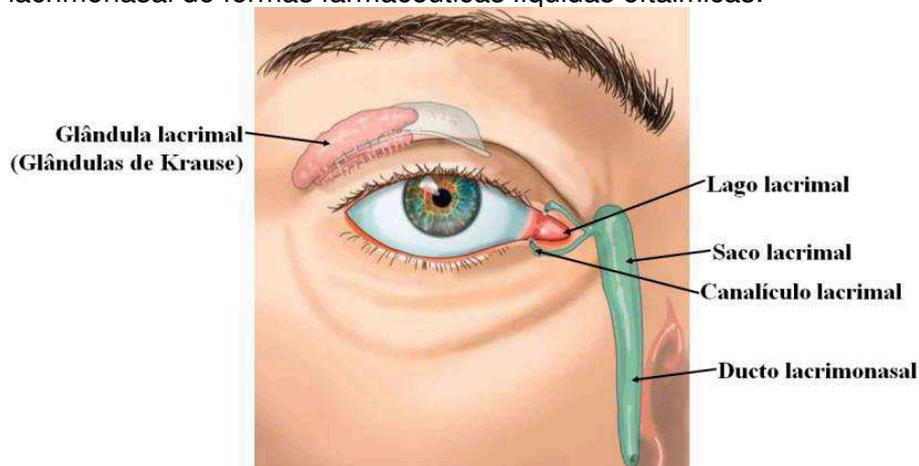
Para o tratamento da uveíte, a triancinolona é utilizada na forma de injeção intravítrea quando se requer tratamento em longo prazo (SHEN et al., 2010). No entanto, vários estudos relatam desenvolvimento de efeitos adversos como catarata, hipertensão ocular, glaucoma, deslocamento da retina, hemorragia vítrea, e endoftalmites (CUNNINGHAM JUNIOR; WENDER, 2010; JERMAK et al., 2007; de SMET, 2005). Chang e Wu (2008) descreveram um aumento da incidência de hipertensão ocular em 36,5 % dos pacientes, ocorrendo aproximadamente 4 semanas após a injeção. Jonas e colaboradores (2005) observaram que, após uma injeção de 20 mg de TA, 40 % dos pacientes apresentavam aumento significativo da pressão ocular. Estes dados corroboram com Yamamoto e colaboradores (2008) que observaram um aumento na pressão intraocular em 34,1 % dos pacientes, após injeção intravítrea de 4 mg de TA. Considerando os riscos inerentes à injeção intravítrea da TA, há um grande interesse no desenvolvimento de medicamentos que utilizem estratégias que permitam a administração tópica deste fármaco no olho de modo seguro e eficaz.

2.3 ADMINISTRAÇÃO OCULAR POR VIA TÓPICA

A administração tópica de corticosteroides é usualmente utilizada para o tratamento da uveíte anterior. Esta estratégia permite o alcance de concentrações terapêuticas nas diferentes camadas da córnea, conjuntiva, esclera, e em outros tecidos do segmento anterior, como a íris e os corpos ciliares (uvea anterior) (Figura 1), com menor incidência de efeitos colaterais sistêmicos causados pela administração oral ou intravenosa desses compostos (CUNNINGHAM JUNIOR;

WENDER, 2010; GAUDANA et al., 2010). Estes compostos são geralmente apresentados na forma de soluções, suspensões e pomadas oftálmicas. Em especial, as formas farmacêuticas líquidas são de fácil administração, porém sofrem com as desvantagens inerentes à via oftálmica, sobretudo, devido fatores que podem ser divididos em efeitos pré-corneais e de barreira à permeação de compostos (GAUDANA et al., 2010; GUNDA et al., 2008). Quando instiladas, a forma farmacêutica sofre primeiramente os efeitos pré-corneais, fazendo com que o tempo de contato com a superfície ocular seja de apenas alguns minutos. O fármaco é imediatamente diluído no filme lacrimal, e rapidamente drenado para a cavidade pré-corneal pelo fluxo lacrimal constante, processo que ocorre com maior intensidade em tecidos inflamados, além de poder ser drenado através da cavidade lacrimonasal (Figura 3). Desta forma, a absorção do fármaco deve ocorrer durante os primeiros 2 – 3 minutos após a instilação (RUPONEN; URTTI, 2015; VENKATA; MADHAVI; RAJESH, 2011).

Figura 3 – Representação esquemática das estruturas anatômicas envolvidas na drenagem lacrimonasal de formas farmacêuticas líquidas oftálmicas.

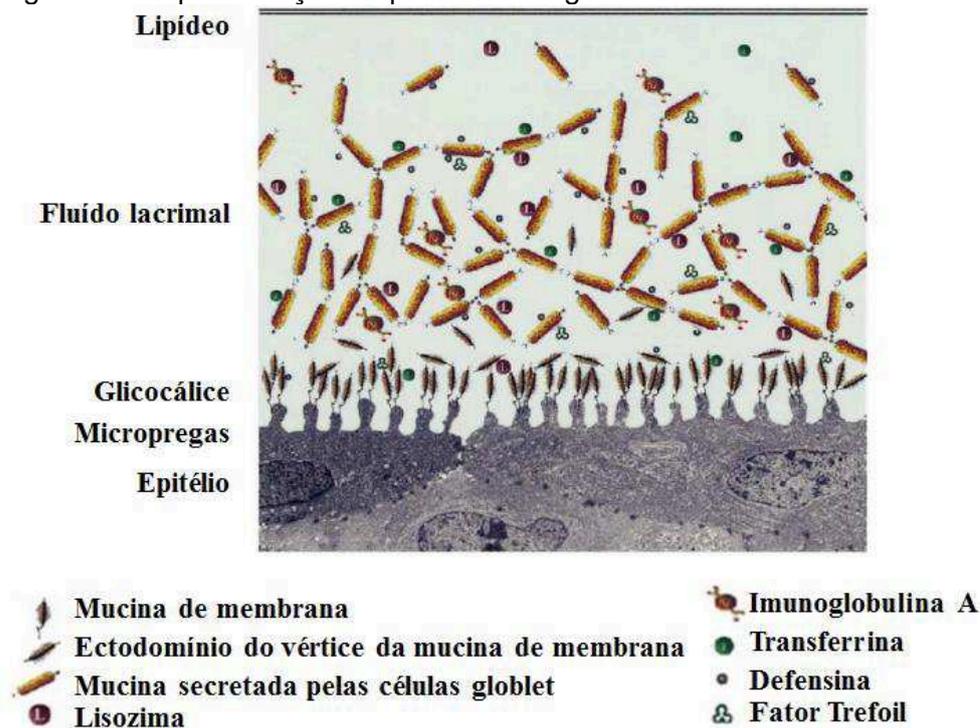


Fonte: Adaptado de Imaios (2015).

Adicionalmente, a córnea e a conjuntiva são revestidas com uma camada de muco que atua protegendo estes tecidos. O muco é composto de moléculas de mucina, a qual corresponde a uma família de ao menos 20 proteínas aniônicas altamente *O*-glicosiladas. A mucina pode ser subdividida em dois grupos: mucina secretada, que se localiza no fluido lacrimal, e mucina da superfície celular, que se

encontra imobilizada na superfície do epitélio formando o glicocálice (Figura 4), uma camada altamente hidrofílica que pode se estender da superfície do epitélio até uma distância de 500 nm. Esta estrutura é capaz de reter a forma farmacêutica, elevando a eficiência da remoção do fármaco da superfície ocular pelos demais efeitos pré-corneais descritos anteriormente (RUPONEN; URTTI, 2015).

Figura 4 – Representação esquemática do glicocálice.

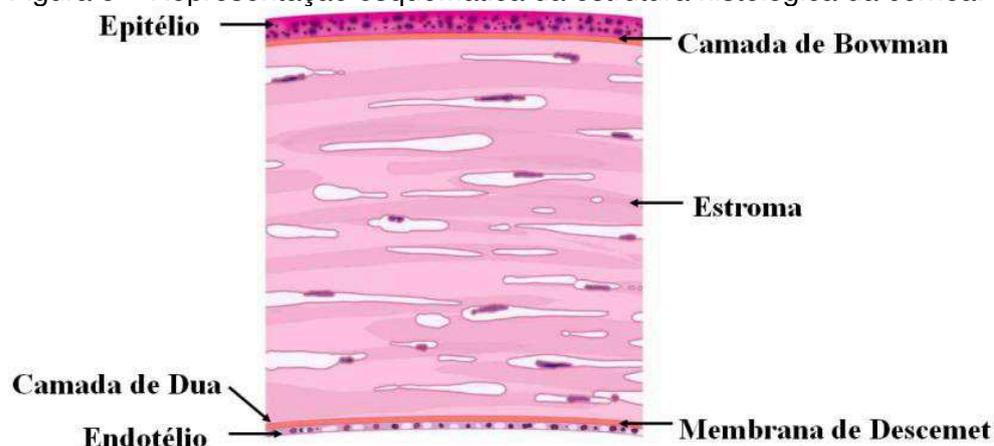


Fonte: Adaptado de Gipson e Argüeso (2003).

Além dos efeitos pré-corneais, fármacos instilados no olho também estão sujeitos a efeitos de barreira, decorrentes das características anatômicas e histológicas dos tecidos que compõem a câmara anterior, e que limitam a penetração dos mesmos. A primeira barreira mecânica e química encontrada pelo fármaco é a córnea, um tecido fino, transparente, avascular e altamente innervado, composto de seis camadas celulares: epitélio, camada de Bowman, estroma, camada de Dua, membrana de Descemet e endotélio (Figura 5). A permeação dos fármacos é controlada por dois principais fatores: o tempo de contato do fármaco com a superfície ocular e a permeabilidade do fármaco através da córnea, cujo mecanismo pode ser governado por difusão passiva, difusão facilitada ou transporte ativo. O epitélio da córnea é uma camada lipofílica, formado de cinco a seis

camadas de células epiteliais estratificadas e escamosas não-queratinizadas, que limita a permeação de fármacos hidrofílicos. Adicionalmente, a presença de junções oclusivas tende a promover resistência à permeação de moléculas pela rota paracelular. Na sequência, o estroma é a camada mais espessa, e é composto de matriz extracelular e de lamelas de fibras de colágeno, intercaladas com queratinócitos. Esta estrutura altamente hidratada possui significativo efeito barreira à permeação de fármacos altamente hidrofóbicos. O endotélio, por sua vez, é constituído por uma monocamada de células hexagonais (4 a 6 µm de espessura) que separa o estroma do humor aquoso, e permite a passagem de macromoléculas do humor aquoso para o estroma, não apresentando um efeito barreira tão severo quanto às estruturas anteriormente citadas. Nesta camada ainda se encontram transportadores de membrana, onde o transporte mediado por carreadores e/ou receptores pode limitar a permeação de fármacos para o humor aquoso. Em contrapartida, a presença de junções oclusivas fracas tende a proporcionar a permeação de moléculas hidrofílicas, onde o transporte parece ser mediado por gradiente osmótico através das membranas basolaterais e apicais das células, ou por forças eletro-osmóticas, devido ao transporte de bicarbonato e das bombas de Na⁺ nas junções oclusivas. Sendo assim, o epitélio da córnea controla a permeação de fármacos, em particular de compostos hidrofílicos, enquanto o estroma e o endotélio possuem menor capacidade de retenção destes fármacos (BARAR; JAVADZADEH; OMIDI, 2008; CHOLKAR et al., 2013; GAUDANA et al., 2010; MANNERMAA; VELLONEN; URTTI, 2006).

Figura 5 – Representação esquemática da estrutura histológica da córnea.



Fonte: Adaptado de Imaios (2015).

A via preferencial de permeação de fármacos após administração ocular é a córnea, porém alguns fármacos ainda podem permear através da conjuntiva e esclera. As vias conjuntival e escleral são competitivas e paralelas e, mesmo que menos eficiente, quando comparada à permeação através da córnea, podem contribuir significativamente para a permeação ocular de alguns fármacos. A conjuntiva é uma membrana mucosa fina e transparente que recobre a superfície anterior da esclera, se estendendo até a extremidade da córnea (o limbo corneano). Esta membrana é constituída de três principais camadas: (1) o epitélio, camada externa que proporciona o efeito barreira e que possui junções oclusivas fortes; (2) substância própria, formada por tecido conjuntivo laxo, contendo inervações e vasos sanguíneos e linfáticos; e (3) submucosa, que proporciona uma adesão mais frouxa à esclera adjacente (cápsula de Tenon). Devido a sua natureza vascularizada, uma significativa perda de fármaco para a circulação sistêmica é observada nesta via de permeação, reduzindo a biodisponibilidade ocular. Além disso, as junções oclusivas do epitélio conjuntival podem atuar retardando a permeação de fármacos hidrofílicos. Vários transportadores são expressos no epitélio da conjuntiva, entre estes, os transportadores de aminoácidos catiônicos e neutros ($ATB^{O,+}$), de nucleosídeos (CNT2) e de peptídeos (PepT1), além de bombas de efluxo, incluindo a glicoproteína P e proteínas relacionadas à resistência a múltiplos fármacos (MRP1) (AHMED et al., 1987; BARAR; JAVADZADEH; OMIDI, 2008; GAUDANA et al., 2010).

A porção de fármaco que permear a conjuntiva e não alcançar a circulação sistêmica atinge a esclera, tecido composto principalmente de fibras de colágeno e

proteoglicanos embebidos em matriz extracelular. Este tecido pouco vascularizado é significativamente mais permeável que a córnea, porém menos permeável que a conjuntiva (BARAR; JAVADZADEH; OMIDI, 2008; GAUDANA et al., 2010).

Tendo em vista a limitada permeação de fármacos hidrofílicos através da córnea e conjuntiva, estas rotas parecem ser mais promissoras para fármacos que apresentem determinado grau de hidrofobicidade. Schoenwald e Ward (1978) avaliaram a permeabilidade de esteroides através da córnea em função do coeficiente de partição ($\log P$). Estes autores verificaram que à medida que o $\log P$ aumentava, um aumento proporcional da permeabilidade dos esteroides através da córnea ocorria, sendo a permeabilidade máxima observada com substâncias apresentando valores de $\log P$ entre 2,5 e 3,0. Para valores superiores de $\log P$, a elevada hidrofobicidade reduzia demasiadamente a solubilidade do esteroide no fluido lacrimal e, conseqüentemente, impedia a permeação, sendo a partícula suspensa do fármaco provavelmente removida pelo fluxo lacrimal.

Ahmed e colaboradores (1987) avaliaram a permeabilidade de β -bloqueadores com diferentes coeficientes de partição e observaram que, para todos os fármacos avaliados, a permeabilidade na esclera era maior que a respectiva permeabilidade transcorneal. Adicionalmente, a massa molar do soluto apresentou um efeito mais pronunciado sobre a permeação através da esclera do que da córnea. Ao comparar a permeação da sacarose e inulina nestes tecidos, os autores observaram que o aumento da massa molar (inulina possui maior massa molar) reduzia em 16 vezes a permeação através da esclera e 8 em vezes através da córnea. Os autores ainda relatam que a conjuntiva apresentou pouca permeabilidade aos fármacos testados, sendo que somente o timolol e a inulina permearam através deste tecido de forma mais eficaz que através da córnea. A esclera é composta, principalmente, por colágeno e mucopolissacarídeos, permitindo que fármacos difundam por três possíveis vias: (1) através dos espaços perivascularres, (2) através do meio gelatinoso de mucopolissacarídeos ou (3) através dos componentes da matriz de colágeno. Sendo assim, a esclera tende a oferecer menor resistência à permeação de fármacos, quando comparado à córnea (AHMED et al., 1987).

Adicionalmente, as células que compõe o tecido corneal expressam proteínas transmembranares transportadoras, conhecidas como bomba de efluxo, que apresentam como substratos diferentes fármacos, como a triancinolona acetona. Dentre estas proteínas se destacam a glicoproteína-P (Pg-P), proteínas associadas à resistência multifármacos (MRP) e proteína de resistência de câncer de mama (BCRP), presentes no epitélio corneal proporcionando o efluxo de fármacos para o fluxo lacrimal (DI PIETRO et al., 1999; GAUDANA et al., 2010; KARLA et al., 2007; KARLA et al., 2009).

Assim, a biodisponibilidade de fármacos administrados pela via ocular tende a ser baixa, variando entre 0,1 e 5 %, principalmente devido aos efeitos relacionados ao fluxo lacrimal, à barreira imposta pelas diferentes camadas de células, e à presença de mucina no filme lacrimal, que forma uma camada hidrofílica eficaz na proteção do tecido ocular. Sendo assim, mais de 90 % da dose administrada é eliminada antes da absorção do fármaco (RUPONEN; URTTI, 2015; VENKATA; MADHAVI; RAJESH, 2011).

A fim de contornar parte das limitações desta via e aumentar a biodisponibilidade ocular, três principais estratégias vêm sendo adotadas, incluindo a modulação das propriedades físico-químicas dos fármacos, utilizando-os como pró-fármacos, o aumento do tempo de contato da forma farmacêutica com a superfície do olho, por meio do uso de implantes oculares e/ou sistemas mucoadesivos, e a utilização de sistemas de liberação que visam vetorizar fármacos a alvos terapêuticos específicos (GAUDANA et al., 2010; KIM et al., 2014; RUPONEN; URTTI, 2015).

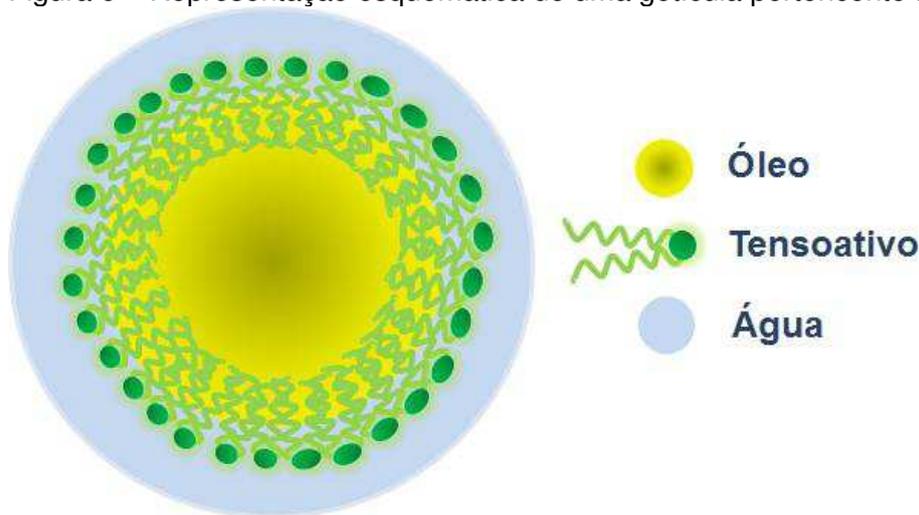
2.4 NANOEMULSÕES

Nas últimas décadas, o uso de carreadores coloidais vem sendo abordado como uma estratégia promissora para aplicação tópica oftálmica. Esses sistemas possuem capacidade de atuar como reservatórios, promover a permeação e/ou inibir o efluxo de fármacos (GAUDANA et al., 2010). Vários sistemas coloidais, tais como os lipossomas, as nanopartículas e as nanoemulsões, podem ser empregados na liberação tópica ocular de fármacos, aumentando a sua biodisponibilidade (SASAKI

et al., 2013). Dentre os sistemas coloidais, as nanoemulsões destacam-se como potenciais candidatas para administração de fármacos pela via ocular (Figura 6).

As nanoemulsões são dispersões coloidais cineticamente estáveis, constituídas de dois líquidos imiscíveis entre si, cuja fase interna, geralmente oleosa, apresenta diâmetro de gotícula que varia entre 20 a 300 nm (ANTON; VANDAMME, 2009; FORGIARINI et al., 2001; SADURNÍ et al., 2005; TADROS et al., 2003). As nanoemulsões possuem vantagens como: (1) maior estabilidade frente aos fenômenos de cremagem, floculação, coalescência e sedimentação, em relação às emulsões grosseiras; (2) possibilidade de vetorização em sítios específicos; (3) proteção do fármaco frente à degradação física ou química; (4) e pequeno tamanho de gota, elevando a área superficial de contato, em relação ao volume da gotícula (DIVSALAR et al., 2012; GAUDANA et al., 2010).

Figura 6 – Representação esquemática de uma gotícula pertencente à nanoemulsão.



Fonte: Preparado pelo autor.

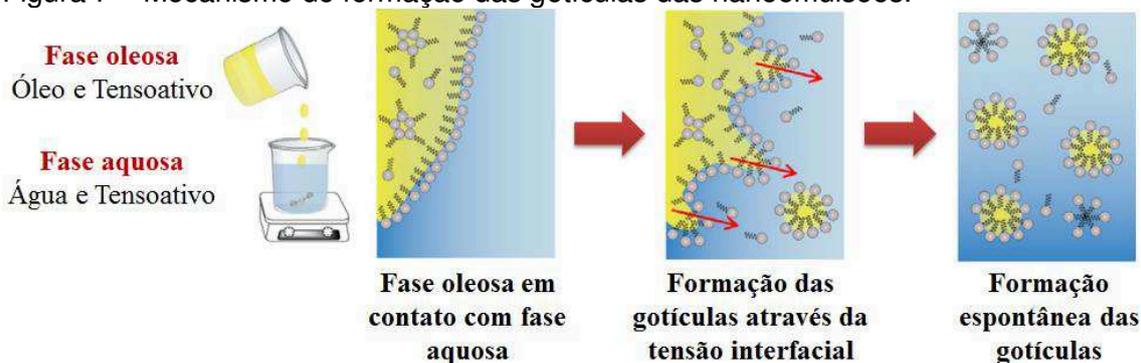
2.4.1 Preparo das nanoemulsões

As nanoemulsões podem ser preparadas por métodos de baixa ou de alta energia (ANTON; VANDAMME, 2009). Métodos de alta energia empregam equipamentos específicos para redução do tamanho das gotículas, como homogeneizadores de alto cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão e

homogeneizadores ultrassônicos. Em contraste, métodos de baixa energia são capazes de formar espontaneamente partículas de tamanho reduzido mediante o controle das condições de preparo, devido às propriedades físico-químicas intrínsecas dos surfactantes, co-surfactantes e excipientes utilizados na formulação. Este método apresenta fácil transposição para escala industrial e emprega processos menos agressivos para fármacos quimicamente instáveis (sensíveis à temperatura, variação de pH, e oxidação) (ANTON; VANDAMME, 2009; SABERI; FANG; MCCLEMENTS, 2013; WALKER; DECKER; MCCLEMENTS, 2015).

O método da emulsificação espontânea consiste na formação de uma emulsão submicrônica como resultado da mistura de uma fase oleosa constituída de óleo, surfactante lipofílico e solvente orgânico miscível em água, em uma fase aquosa contendo ou não um tensoativo hidrofílico. O mecanismo que governa o processo de emulsificação espontânea é o deslocamento do solvente orgânico da fase oleosa, induzindo à turbulência na interface óleo/água. A rápida transferência do solvente da fase oleosa para a fase aquosa resulta em um aumento drástico da área interfacial, proporcionando a formação de uma emulsão (Figura 7) (ANTON; VANDAMME, 2009; SABERI; FANG; MCCLEMENTS, 2013). Alguns fatores, como tipo e concentração de óleo, tipo e concentração de tensoativo, temperatura, velocidade de agitação e volume das fases oleosa e aquosa, têm mostrado afetar consideravelmente o tamanho das gotículas da nanoemulsão (SABERI, FANG e MCCLEMENTS, 2013). Assim, o efeito destes fatores pode ser estudado com o intuito de obter sistemas coloidais com características físico-químicas desejáveis para uma dada aplicação.

Figura 7 – Mecanismo de formação das gotículas das nanoemulsões.

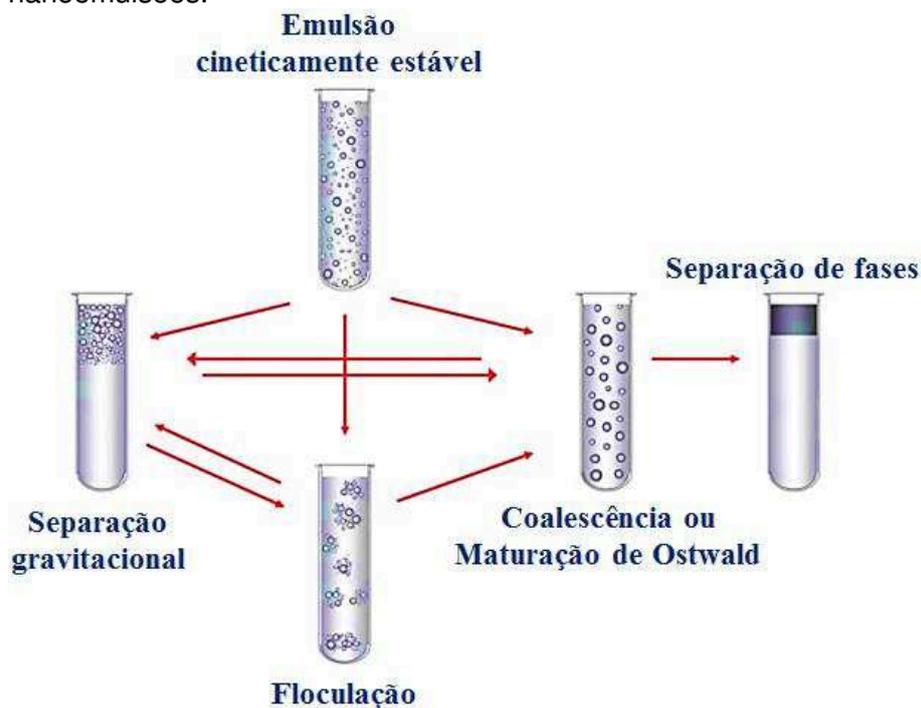


Fonte: Adaptado de Saberi, Fang, e McClements (2013).

2.4.2 Estabilidade das nanoemulsões

As nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis devido à energia livre de Gibbs positiva associada à criação da interface óleo/água, possuindo, então, a tendência à separação das fases em função do tempo, devido a vários mecanismos físico-químicos, incluindo separação gravitacional, floculação, coalescência, e/ou maturação de Ostwald (Figura 8) (MCCLEMENTS, 2011; MCCLEMENTS; RAO, 2011). Comparadas às emulsões convencionais, as nanoemulsões tendem a apresentar melhor estabilidade frente à separação gravitacional e à agregação dos glóbulos, mas pior em relação à maturação de Ostwald (MCCLEMENTS, 2011).

Figura 8 – Representação esquemática dos mais comuns mecanismos de instabilidade de nanoemulsões.



Fonte: Adaptado de McClements (2011).

A separação gravitacional é uma das formas mais comuns de instabilidade das emulsões convencionais, e podem ocorrer como cremagem ou sedimentação, dependendo da densidade relativa das fases oleosa e aquosa. Cremagem é o termo

que relaciona o movimento das gotículas para a porção superior da formulação, quando estas possuem uma densidade inferior àquela do meio que a circunda, enquanto sedimentação, trata do movimento das gotículas para a porção inferior, uma vez que a fase oleosa apresenta densidade superior à fase aquosa (MCCLEMENTS, 2011; MCCLEMENTS; RAO, 2011). Os óleos empregados na obtenção das emulsões apresentam densidades mais baixas do que a água, portanto, a cremagem ocorre de modo mais frequente nas emulsões óleo em água. A velocidade com que uma gota movimenta-se ao topo da emulsão, devido à separação gravitacional é dada pela lei de Stokes:

$$v_{Stokes} = \frac{2gr^2(\rho_1 - \rho_2)}{9\eta} \quad (1)$$

onde v é a velocidade cremagem, r é o raio do glóbulo, g é a aceleração da gravidade, ρ_1 é a densidade de cada uma das fases e η é a viscosidade.

Por outro lado, as gotículas de uma nanoemulsão também apresentam movimento browniano, associado à energia térmica do sistema. O deslocamento quadrático médio de uma partícula devido ao movimento Browniano (Δ) é dada por

$$\Delta = \sqrt{2Dt} \quad (2)$$

onde D é o coeficiente de difusão da gotícula e t o tempo.

Considerando que o tamanho da gota é diretamente proporcional à velocidade de cremagem e inversamente proporcional ao coeficiente de difusão (D), emulsões apresentando tamanhos de gota maiores estão mais sujeitas à separação pela ação da gravidade, enquanto o movimento Browniano é mais acentuado nas nanoemulsões (MCCLEMENTS, 2011).

Nanoemulsões tendem a apresentar maior estabilidade frente à agregação das gotículas (floculação e coalescência) que as emulsões convencionais, devido ao efeito do tamanho reduzido da gotícula sobre as interações coloidais. A interação

entre duas gotículas em uma nanoemulsão pode ser descrita pela soma das interações de van der Waals, eletrostática, estérica e hidrofóbica, sendo estas dependentes das propriedades físico-químicas dos componentes da formulação. As interações hidrofóbicas e de van der Waals favorecem a atração entre as gotículas, enquanto as interações estéricas e eletrostáticas conduzem à repulsão das mesmas. De forma geral, a magnitude das interações atrativas e repulsivas tende a aumentar com o aumento do tamanho de gotícula. Por outro lado, o emprego de tensoativos aniônicos ou catiônicos tende a elevar a repulsão eletrostática entre as gotículas, aumentando assim a estabilidade física do sistema frente à agregação (MCCLEMENTS; RAO, 2011).

A maturação de Ostwald corresponde ao processo onde o diâmetro médio das gotículas aumenta em função do tempo, devido à difusão de moléculas de óleo de uma gotícula menor para uma gotícula maior. A solubilidade aquosa de um óleo contido em uma gotícula esférica aumenta com a redução do diâmetro da mesma, fazendo com que uma maior concentração de moléculas de óleo circunde uma gotícula de menor tamanho, em relação às gotículas maiores. Devido ao gradiente de concentração, estas moléculas tendem a se mover da gotícula menor para uma gotícula maior, resultando em um aumento do diâmetro em função do tempo. Assim, o principal fator que determina a estabilidade de uma nanoemulsão frente à maturação de Ostwald é a solubilidade aquosa da fase oleosa. (MCCLEMENTS; RAO, 2011; TAYLOR, 1998).

Nos casos em que os constituintes do óleo são quimicamente instáveis, a redução do diâmetro das gotículas da fase oleosa tende a acelerar a sua degradação na fase aquosa. A redução do tamanho de gotícula implica no aumento da área de contato da fase oleosa com a fase aquosa, levando à maior exposição do óleo ao meio onde ele não é estável. Neste caso, as condições de preparo e armazenamento devem ser adequadas de modo a manter a estabilidade das nanoemulsões (MCCLEMENTS; RAO, 2011).

A estabilidade das nanoemulsões pode ser melhorada por meio da seleção dos componentes da formulação. As propriedades físico-químicas emulsões dependem do tipo e da concentração dos componentes utilizados na sua

preparação. Adicionalmente, a composição da fase oleosa é particularmente importante para a encapsulação de moléculas hidrofóbicas, solúveis nesta fase. Os fármacos hidrofóbicos são solubilizados na fase oleosa, e desta forma, permanecem em contato com o óleo durante o processo de formação das gotículas. No entanto, sua localização na dispersão coloidal final depende de suas propriedades físico-químicas, como hidrofobicidade, tensoatividade, coeficiente de partição, solubilidade tanto na fase oleosa quanto na fase aquosa, e ponto de fusão. Quando o fármaco é quimicamente instável, a sua cinética de degradação pode ser afetada pela sua localização na emulsão (MCCLEMENTS, 2011).

Os surfactantes, moléculas anfifílicas que apresentam alta solubilidade em ao menos uma das fases líquidas da emulsão, desempenham uma importante função no preparo das nanoemulsões, sendo responsáveis pela redução da tensão interfacial ao se adsorver na interface óleo/água, promovendo a sua estabilização. Quando as interfaces óleo-água de duas gotículas estabilizadas com surfactante se aproximam, forma-se um filme fino de água entre as interfaces formadas. De acordo com a natureza da porção polar da molécula de surfactante, as duas interfaces podem se repelir devido efeito eletrostático (tensoativos aniônicos, catiônicos, ou anfotéricos), ou o contato entre as interfaces é impedido por efeito estérico das moléculas de tensoativo (não-iônicos). A manutenção do filme fino de água entre as interfaces estabiliza as gotículas da nanoemulsão, prevenindo a coalescência (HELGESON, 2016; MASON et al., 2006).

2.4.3 Emprego das nanoemulsões para liberação ocular de fármacos

Muitos estudos têm sido realizados visando aumentar a biodisponibilidade ocular de fármacos pelo uso de nanocarreadores. Nanocarreadores lipídicos e poliméricos vêm sendo amplamente avaliados como carreadores para liberação, principalmente, de fármacos lipofílicos. Dentre os sistemas nanocarreadores, as nanopartículas poliméricas são frequentemente empregadas devido a biodegradabilidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade, mucoadesão, e relativo baixo custo dos biomateriais empregados em seu preparo (ALMEIDA et al., 2014). Zhang e colaboradores (2016) prepararam nanopartículas de quitosana contendo naringenina incorporada em sulfabutiléster β -ciclodextrina, e demonstraram que o

sistema nanoparticulado elevou consideravelmente a biodisponibilidade e o tempo de residência do polifenol na superfície ocular de coelhos. Enquanto Cañadas e colaboradores (2016) demonstraram que nanopartículas preparadas a partir do polímero sintético PLGA (poli-ácido lático-co-ácido glicólico) foram capazes de aumentar a eficácia terapêutica do pranoprofeno, quando comparada com as formulações comerciais.

No entanto, grandes atenções vêm sendo destinadas ao uso de sistemas lipídicos de liberação de fármacos, sobretudo em função da matriz ser, normalmente, composta de lipídicos fisiologicamente compatíveis, minimizando o risco de toxicidade aguda ou crônica (BAIG et al., 2016). Araújo e colaboradores (2012) desenvolveram carreadores lipídicos nanoestruturados contendo triancinolona acetonida e observaram que houve uma redução significativa do fluxo de permeação do fármaco na esclera em modelo *in vitro* de permeação, ao passo aumenta a retenção da triancinolona acetonida no tecido ocular. Hou e colaboradores (2016) prepararam nanopartículas lipídicas contendo cloridrato de betaxolol e evidenciaram que o nanocarreador lipídico foi capaz de elevar a permeação do fármaco em modelo de permeação *in vitro*, quando comparado com a solução de cloridrato de betaxolol. Além destes sistemas, as nanoemulsões vêm atraindo bastante atenção como potenciais sistemas capazes de incorporar fármacos lipofílicos, liberando-os de forma menos retardada que as nanopartículas lipídicas sólidas e dos carreadores lipídicos nanoestruturados (GÖNÜLLÜ et al., 2015; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015).

Usando um modelo *ex vivo* de permeação em córnea de coelhos, Calvo, Vila-Jato, e Alonso (1996) observaram um aumento de 3,65 vezes na permeabilidade da indometacina, quando esta foi administrada na forma de nanoemulsão. Yamaguchi e colaboradores (2005) verificaram um aumento de 5–7 vezes na concentração do glicocorticoide difluprednato no humor aquoso de coelhos, após instilação de nanoemulsões contendo o fármaco, em comparação com a administração de suspensões. Ying, Tahara, e Takeuchi (2013) avaliaram o efeito da carga superficial de nanoemulsões na permeação transcorneal da 6-cumarina, e verificaram que nanoemulsões com cargas superficiais positivas foram mais

eficientes em promover a permeação transcorneal deste composto, do que aquelas carregadas negativamente. Estes autores sugeriram que a carga positiva das nanoemulsões interagia com a superfície negativamente carregadas das células do epitélio da córnea, favorecendo a permeação. Os autores ainda avaliaram o efeito da modificação da superfície das nanoemulsões carregadas negativamente com a adição de quitosana ou Poloxamer 407, e observaram que ambos aumentavam consideravelmente a permeação da 6-cumarina através da córnea, não havendo diferença na permeação com o emprego da quitosana (polímero catiônico) ou do Poloxamer 407 (polímero não-iônico). Os autores sugeriram que, enquanto a quitosana interagia com as células da córnea por meios de interações eletrostáticas, o Poloxamer 407 provocava um aumento na fluidez da membrana celular, igualmente promovendo a permeação desta substância.

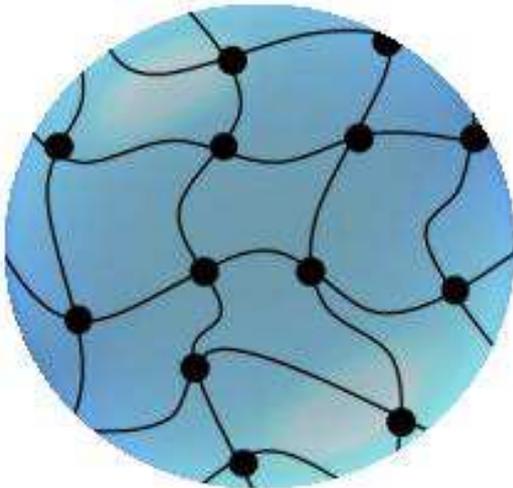
O uso de sistemas nanoemulsionados também tem mostrado aumentar o tempo de permanência do fármaco na superfície do olho. Em estudo de Beilin, Barllan, e Amselem (1995), citado por Tamilvanan e Benita (2004), foi avaliado o tempo de retenção de um marcador fluorescente na superfície ocular. Os autores observaram que 1 minuto após a instilação de uma nanoemulsão contendo o marcador fluorescente, 39,9 % da dose administrada foi encontrada na superfície ocular, enquanto que quando o marcador foi instilado na forma de uma solução, apenas 6,8 % da dose foi encontrada após o primeiro minuto. No entanto, assim como as soluções oftálmicas, as nanoemulsões são sistemas de baixa viscosidade suscetíveis aos efeitos pré-corneais descritos anteriormente. Assim, outras estratégias para aumentar o tempo de contato da forma farmacêutica com a superfície do olho devem ser adotadas, a fim de produzir um incremento na biodisponibilidade de fármacos por esta via de administração (ALMEIDA et al., 2014).

2.5 HIDROGÉIS

Os hidrogéis também figuram como sistemas de liberação promissores para administração ocular de fármacos, permitindo um prolongamento do tempo de residência da forma farmacêutica na porção pré-corneal, devido à redução da drenagem lacrimal (GAUDANA et al., 2010). Estes são constituídos de redes

tridimensionais de polímeros hidrofílicos capazes de imobilizar grande quantidade de água ou de fluidos biológicos (Figura 9), e podem ser subdivididos em hidrogéis pré-formados ou preparados *in situ*. Hidrogéis pré-formados são géis viscosos que se apresentam como gel sem sofrer modificação após administração, enquanto os hidrogéis preparados *in situ* apresentam-se na forma de soluções de baixa ou moderada viscosidade que sofrem transição de fase para formar um gel após um estímulo específico, como alteração de temperatura, pH, composição iônica ou presença de agentes redutores/oxidantes. Os hidrogéis preparados *in situ* despertam grande interesse devido à possibilidade de veicular a forma farmacêutica como uma solução oftálmica, facilitando a administração do fármaco e aplicando uma dosagem precisa e reprodutível (ANUMOLU et al., 2009; KIM et al., 2014; PEPPAS et al., 2000). Hidrogéis preparados *in situ* possuem a habilidade de responder às alterações do ambiente externo, exibindo mudanças drásticas no seu perfil de intumescimento, estrutura de rede, permeabilidade e/ou resistência mecânica, em função destas alterações (PEPPAS et al., 2000).

Figura 9 – Representação esquemática da estrutura de um hidrogel.



Fonte: Adaptado de Gawlitza e colaboradores (2013).

Dentre os hidrogéis preparados *in situ* destinados para administração ocular, destacam-se o hidrogéis termosensíveis, que transitam de fase em função da variação de temperatura no meio. Estes podem ser classificados em dois grupos: (1) sistema termosensível positivo, os quais são constituídos de polímeros que

apresentam uma temperatura de solução crítica superior (UCST, do inglês *upper critical solution temperature*), onde o polímero se contrai durante resfriamento abaixo da UCST, formando o hidrogel durante o resfriamento; e (2) sistema termosensível negativo, onde o polímero apresenta uma temperatura de solução crítica inferior (LCST, do inglês *lower critical solution temperature*), se contraindo em temperaturas superiores à LCST, formando o hidrogel durante o aquecimento.

Quando um polímero é dissolvido em água, três tipos de interações estão existentes: entre as moléculas do polímero, entre o polímero e água e entre as moléculas de água. No caso de polímeros apresentando temperaturas de solução crítica inferiores (LCST), o aumento da temperatura resulta em uma energia livre de Gibbs positiva do sistema, o que torna desfavorável a associação entre polímero e água, favorecendo os outros dois tipos de interações. Este fenômeno também é conhecido como efeito hidrofóbico, onde a entropia aumenta devido à associação água-água. Na temperatura crítica, a formação de pontes de hidrogênio entre o polímero e a água é desfavorecida, comparado às interações polímero-polímero e água-água, e uma transição abrupta ocorre quando a macromolécula solvatada rapidamente desidrata e se torna mais hidrofóbica (KLOUDA; MIKOS, 2008; PEPPAS et al., 2000; RUEL-GARIÉPY. LEROUX, 2004).

Os polímeros termosensíveis são estruturas que refletem um balanço delicado entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos e, devido a este equilíbrio tênue, pequenas alterações na temperatura podem induzir uma nova ordem de interações hidrofóbicas e hidrofílicas no bloco do polímero, assim como com as moléculas de água (BAJPAI et al., 2008; MATANOVIČ; KRISTL; GRABNAR, 2014). Diferentes mecanismos são propostos para descrever a transição de fase induzida pela alteração de temperatura, entre elas destacam-se: transição de conformação enovelada para hélice, interações hidrofóbicas, empacotamento em forma de micelas, entrelaçamento das cadeias poliméricas e crescimento micelar combinado com interações hidrofóbicas (KLOUDA; MIKOS, 2008).

Muitos polímeros têm sido utilizados no preparo de géis termosensíveis, e uma atenção especial tem sido dedicada ao uso de polissacarídeos como os derivados da celulose, quitosana, dextrana, xiloglucana, entre outros, sobretudo devido à tendência destes compostos em reduzir a tensão interfacial e aumentar a viscosidade de soluções oftálmicas. A redução da tensão interfacial promove a

miscibilidade com o filme lacrimal pré-corneal, enquanto o aumento da viscosidade atua prolongando o tempo de contato do fármaco com a superfície do olho, proporcionando uma melhoria da biodisponibilidade do mesmo (NISBET et al., 2006; SCHOENWALD; WARD, 1978).

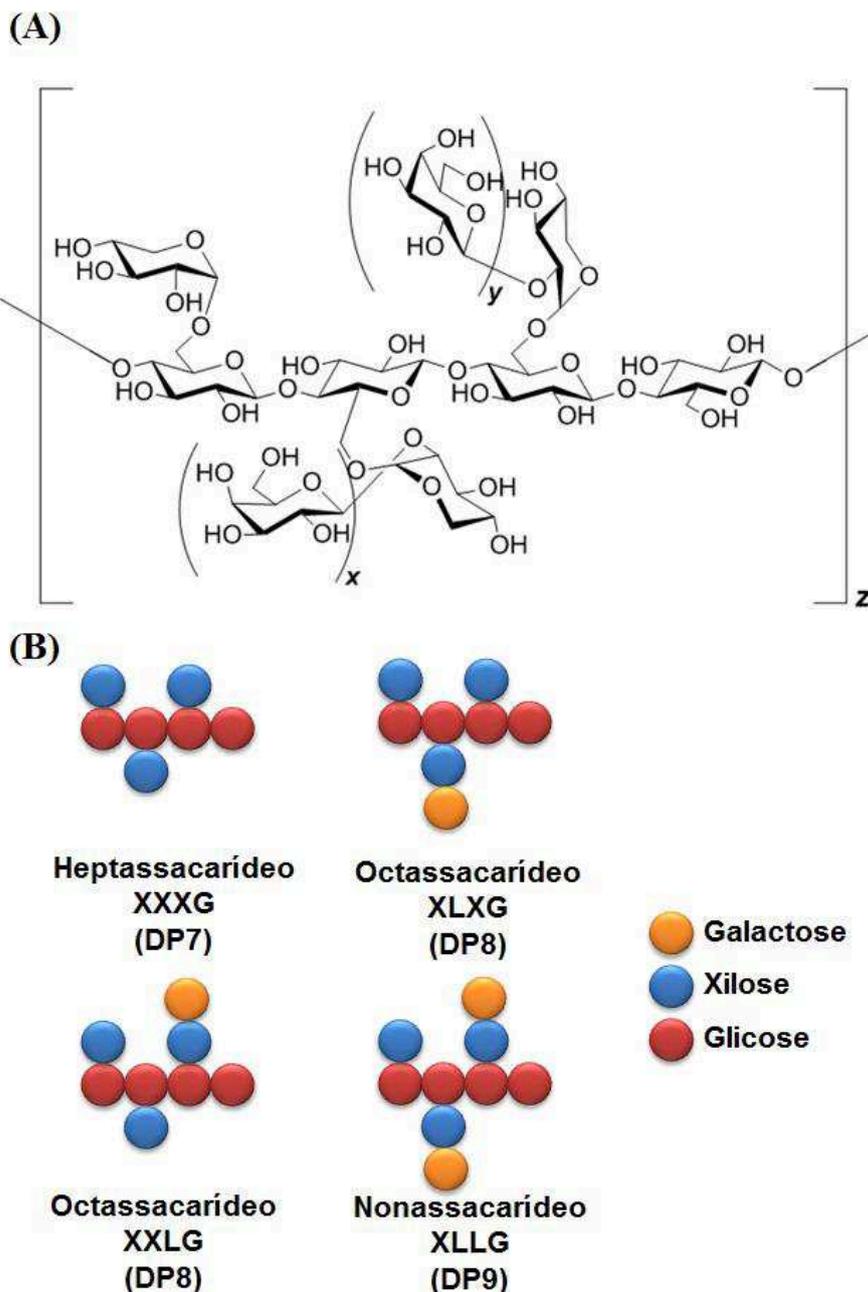
2.5.1 Xiloglucana

A xiloglucana é um polissacarídeo neutro, da família das hemiceluloses, que compõe a parede celular primária em tecidos vegetais, a qual encontra-se entrelaçada com microfibrilas de celulose, estabilizando-a e conferindo estrutura ao dicotilédone das sementes. Possui função de armazenamento e no controle da expansão de sementes (BUCKERIDGE; dos SANTOS; TINÉ, 2000). A composição da xiloglucana varia consideravelmente entre as espécies vegetais, bem como entre células de uma mesma espécie, podendo variar quanto à massa molar, padrão de repetição dos oligossacarídeos, e razão entre os monossacarídeos que compõe este polissacarídeo. Vários estudos vêm sendo realizados com xiloglucanas de diferentes fontes vegetais, se destacando a xiloglucana da semente de *Hymenaea courbaril* (jatobá), da semente de *Copaifera langsdorffii* (copaíba), e da semente de *Tamarindus indica* (tamarindo) (de FREITAS et al., 2015; LUCYSZYN et al., 2009; STUPP et al., 2008; TUOMIVAARA et al., 2015).

A xiloglucana da semente de tamarindo é composta por uma cadeia central β -1,4-D-glicose, substituídas na posição O-6 por cadeias laterais α -D-xilose, que por sua vez são parcialmente substituídas, de forma variável, por resíduos β -1,2-D-galactose (Figura 10A). Para padronizar a nomenclatura dos oligossacarídeos de xiloglucana, um sistema em código foi proposto por Fry e colaboradores (1992), em que “G” corresponde à glicose não substituída na cadeia principal, “X” denota o resíduo de glicose substituído lateralmente com α -D-xilose, “L” denota um resíduo de β -D-galactose ligado à α -D-xilose- β -D-glicose, e “F” quando a α -L-fucose encontra-se ligada à β -D-galactose- α -D-xilose- β -D-glicose (Figura 10B). Assim, os oligossacarídeos da xiloglucana extraída a partir do *Tamarindus indica*, que compõe o polissacarídeo, são compostos por XXXG (heptassacarídeo, ou DP7), XLXG, e

XXLG (octassacarídeo, ou DP8), além do XLLG (nonassacarídeo, ou DP9), os quais diferem no número de unidades de galactose.

Figura 10 – Representação esquemática da (A) estrutura química da xiloglucana extraída a partir do *Tamarindus indica*; e (B) composição dos oligossacarídeos.



Fonte: Preparado pelo autor.

Sims e colaboradores (1998) estudaram a viscosidade de soluções de xiloglucanas originárias de diferentes espécies vegetais, incluindo tamarindo, maçã, e nicotiana, e observaram que as diferenças estruturais entre estas xiloglucanas

afetam consideravelmente a viscosidade das soluções de polissacarídeo. A xiloglucana extraída a partir da nicotiana apresenta resíduos de arabinose na cadeia lateral, enquanto a xiloglucana oriunda da maçã apresenta resíduos de fucose, e a xiloglucana do tamarindo não contém estes resíduos na cadeia lateral. Porém os autores salientaram que, apesar da diferença na composição de monossacarídeos entre as xiloglucanas, a massa molar e o raio de giração parecem influenciar de forma mais impactante nas propriedades reológicas do polímero. As amostras oriundas da nicotiana (raio de giração de 34 nm e massa molar de 129 kDa) apresentaram viscosidade inferior as das amostras de xiloglucana de maçã (raio de giração de 70 nm e massa molar de 219 kDa), enquanto as amostras de xiloglucana extraída a partir do tamarindo (raio de giração de 136 nm e massa molar de 833 kDa) exibiram maior viscosidade. Khounvilay e Sittikilyothin (2012) realizaram estudos viscosimétricos de soluções aquosas de xiloglucana nas regiões diluídas e semi-diluídas e observaram que o polímero apresenta comportamento correspondente a polímeros aleatoriamente enovelados, exibindo valor de concentração crítica ($C^*[\eta]$) semelhante aos obtidos para hidrocoloides enovelados.

A cadeia principal glicosídica da xiloglucana promove interações intermoleculares, porém a presença dos resíduos de xilose e galactose previne a cristalização, como ocorre com a celulose. Adicionalmente, a molécula de xiloglucana apresenta um equilíbrio entre caráter hidrofílico e hidrofóbico, onde as moléculas não são completamente hidratadas, podendo ocorrer a formação de agregados supramoleculares planos e fibrilares, mesmo em soluções muito diluídas (NISHINARI et al., 2009). De Freitas e colaboradores (2015) relatam que o tempo de relaxação imposto pela taxa de deformação de soluções de xiloglucana extraída a partir do jatobá é fortemente dependente da temperatura, sinalizando a ocorrência de interações específicas, provavelmente por ligações de hidrogênio, entre diferentes porções das cadeias poliméricas em solução. Segundo os autores, a xiloglucana apresenta característica semelhante a outros polissacarídeos, como a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e a goma guar. Wientjes e colaboradores (2000) propuseram dois tipos de ligações que ocorrem em solução, em que o primeiro ocorre de forma relativamente rápida e é responsável pela formação de uma rede

polimérica transiente, e o segundo refere-se às ligações cruzadas de longa duração, formadas por uma rede fraca quase permanente. Conforme os estudos realizados por de Freitas e colaboradores (2015), a densidade das ligações cruzadas tende a aumentar em função do aumento da temperatura da solução, sugerindo a formação de ligações de hidrogênio. A modificação enzimática das moléculas de xiloglucana permitiu mostrar que a dependência da temperatura está relacionada à rigidez da cadeia central da xiloglucana (β -1,4-D-glicose).

2.5.1.1 Hidrogéis termosensíveis de xiloglucana

Conforme descrito acima, a xiloglucana é um polímero solúvel em água que forma soluções viscosas em baixas concentrações, mas não possui a capacidade de formar hidrogéis, atuando somente como um promotor de viscosidade. No entanto, uma vez que os resíduos de galactose ligados à cadeia lateral da xiloglucana parecem impedir as interações intermoleculares para a formação do hidrogel, estudos têm sido realizados visando a remoção parcial das unidades de galactose, usando enzimas específicas para a hidrólise deste monossacarídeo. Shirakawa, Yamatoya, e Nishinari (1998) demonstraram que a xiloglucana passa a apresentar propriedade termosensível na formação de hidrogéis quando aproximadamente 35 % dos resíduos de galactose são removidos pela ação da enzima β -galactosilase. Os autores descrevem a existência de duas temperaturas de transição para a xiloglucana degalactosilada; uma temperatura inferior, relacionada com a transição sol-gel; e uma temperatura superior, relativa à transição gel-sol. A diferença entre as temperaturas de transição inferiores e superiores é aumentada em função do aumento do grau de degalactosilação do polissacarídeo, e que a transição sol-gel é reversível mediante resfriamento do gel, apresentando, assim, caráter reversível. Nisbet e colaboradores (2006) observaram que a medida que a concentração da solução de xiloglucana degalactosilada é aumentada, a temperatura de transição de estado sol-gel é reduzida. Por outro lado, Brun-Graeppi e colaboradores (2010) observaram uma redução da temperatura de transição, em função do aumento do grau de degalactosilação. Os autores verificaram que a transição sol-gel decresce de 40 para 5 °C quando a taxa de galactose removida é aumentada de 35 para 58 %.

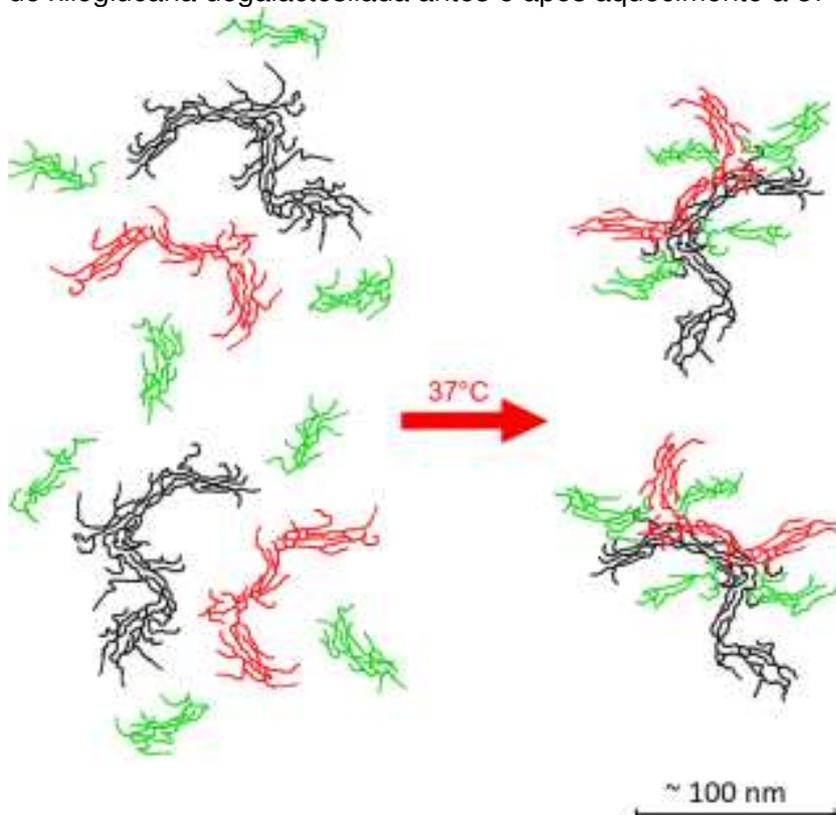
Yamanaka e colaboradores (1999) demonstraram que o processo de gelificação pode ser descrito nos termos da teoria de policondensação de estruturas ramificadas de Flory-Stockmayer, formando uma estrutura plana de cadeias alinhadas de xiloglucana. E Yuguchi e colaboradores (2005) demonstraram que a adição de uma solução de iodo à dispersão de xiloglucana degalactosilada induzia à formação de um gel e que o aquecimento levava a sua descoloração e redução da viscosidade. Utilizando métodos espectroscópicos e de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS), os autores sugeriram que o mecanismo de gelificação da dispersão do polissacarídeo envolvia a interação de duas cadeias de xiloglucana lado a lado e incorporação de iodo e/ou íons iodeto. E posteriormente, Nisbet e colaboradores (2006) demonstraram, através de análises por microscopia eletrônica da varredura, que o hidrogel é constituído por camadas planas interconectadas, confirmando os achados anteriores. Os autores ainda sugerem que o processo de gelificação pode ser dividido em duas etapas, a primeira consistindo na formação de estruturas semelhantes a grandes membranas, e a subsequente correspondendo ao estabelecimento de ligações entre as estruturas planares.

Brun-Graepi e colaboradores (2010) descrevem uma alteração de conformação das cadeias do polímero para uma estrutura mais compacta, devido à redução da razão entre o raio de giração e o raio hidrodinâmico, com concomitante mudança no coeficiente virial, relacionado ao aumento da hidrofobicidade do polímero, a qual favoreceria as associações inter e intramoleculares. Em contraste, Freitas e colaboradores (2011), utilizando a mesma estratégia do grupo anterior, excluíram qualquer influência da transição conformacional das cadeias poliméricas em solução e sugeriram que a agregação das moléculas do polímero é responsável pelo processo de gelificação.

Mais recentemente, Todaro e colaboradores (2015), utilizando espalhamento de luz dinâmico, estático e de raios-x de baixos ângulos (SAXS) verificaram uma redução do raio de giração e aumento do grau de ramificação em alguns nanômetros de uma solução diluída de xiloglucana com grau de degalactosilação de 44 %. quando o polímero é incubado a 37 °C. Este fenômeno ocorreu, segundo os autores, devido à associação lateral prevalente de segmentos hidrofóbicos de

diferentes cadeias poliméricas, formando regiões de junções insolúveis contendo segmentos hidrofílicos ricos em galactose que permanecem em contato com o solvente. Estes clusters poliméricos se apresentam como “micelas com franjas”, formadas por um núcleo rígido, altamente ordenado, de porções lineares das cadeias. Os autores ainda indicaram que, em soluções concentradas, os segmentos de cadeias poliméricas podem condensar por meio de ligações intra- e intermoleculares, formando uma estrutura ainda mais ramificada e compacta, como exemplificado na Figura 11.

Figura 11 – Representação esquemática da organização molecular em uma solução diluída de xiloglucana degalactosilada antes e após aquecimento a 37 °C.



Fonte: Todaro e colaboradores (2015).

Diferentes estudos vêm sendo realizados empregando hidrogéis de xiloglucana para a veiculação de fármacos, por diferentes vias de administração, utilizando xiloglucana com 44 % de grau de degalactosilação. Estes estudos evidenciaram a viabilidade do emprego do hidrogel como veículo para administração oral da indometacina (KAWASAKI et al., 1999), cimetidina (MIYAZAKI et al., 2001), paracetamol (MIYAZAKI et al., 2003) e teofilina (MIYAZAKI et al., 2010), além da

administração retal da indometacina (MIYAZAKI et al., 1998), administração intraperitoneal da mitomicina C (SUISSA et al., 1998), administração ocular do cloridrato de pilocarpina (MIYAZAKI et al., 1999), e administração percutânea do cetoprofeno (TAKAHASHI et al., 2002).

Usando condições que simulavam a via ocular, Miyazaki e colaboradores (2001) avaliaram o perfil de liberação *in vitro* do cloridrato de pilocarpina a partir de hidrogéis de xiloglucana em diferentes concentrações, e compararam os perfis de liberação com aqueles obtidos a partir de uma suspensão do fármaco e de hidrogéis de Pluronic F127 25 % (m/m). Os autores relataram que o cloridrato de pilocarpina é liberado por um mecanismo de difusão, seguindo cinética dependente da raiz quadrada do tempo, de acordo com o modelo de Higuchi, com coeficientes de difusão (D) de 7,96, 8,49 e $6,13 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, para os hidrogéis preparados com a concentração de xiloglucana de 1,0, 1,5 e 2,0 % (m/m), respectivamente. Os autores também relataram a liberação do cloridrato de pilocarpina a partir de hidrogéis de Pluronic F127 com coeficiente de difusão igual a $2,18 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, indicando que a xiloglucana representam uma menor barreira à difusão. Neste mesmo estudo, as formulações foram avaliadas *in vivo* quanto à resposta miótica em coelhos, não sendo observada diferença na atividade miótica quando a solução, o hidrogel de Pluronic 25 % e o hidrogel de xiloglucana 1,0 % foram instilados nos olhos do coelhos. No entanto, a resposta miótica foi significativamente diferente, quando os hidrogéis de xiloglucana 1,5% e 2,0 % foram aplicados, quando comparado à solução do fármaco. Uma redução no tempo para obtenção do pico da resposta miótica com concomitante aumento da duração de ação e da biodisponibilidade do fármaco foram observados para os hidrogéis de xiloglucana a 2 %, indicando que o prolongamento da liberação ocorreu devido à maior resistência difusional provocada pela maior concentração do polímero. Assim, a capacidade em controlar a liberação do fármaco e a possibilidade de obter hidrogéis termoreversíveis em concentrações muito mais baixas que aqueles obtidos com Pluronic F127, tornam a xiloglucana um polímero promissor para obtenção de formas farmacêuticas para administração oftálmica.

2.6 SISTEMAS MUCOADESIVOS

Mucoadesão é definida como a interação entre o material de interesse com a superfície de membranas recobertas com uma camada de muco (SMART, 2005). Dentre as diferentes estratégias descritas para otimizar o efeito terapêutico das formas farmacêuticas oftálmicas, o emprego de sistemas mucoadesivos se destaca pela capacidade de aumentar o tempo de residência da forma farmacêutica na superfície ocular. Este fenômeno tende a reduzir a influência dos fatores pré-corneais e, conseqüentemente, elevar a biodisponibilidade ocular de fármacos contidos nestas formas mucoadesivas (LUDWIG, 2005; SMART, 2005).

O muco, que recobre e protege a superfície dos olhos, é composto de moléculas de mucina, uma família de ao menos 20 diferentes proteínas o-glicosiladas altamente iônicas, cuja massa molar varia de acordo com o gene que a expressa, e podem ser classificadas em duas categorias: (1) mucinas formadoras de gel, que conferem viscosidade ao fluido lacrimal; e (2) mucinas associadas à membrana, que constitui o glicocálice. As mucinas formadoras de gel de alta massa molar (MUC5AC) são secretadas pelas células de Goblet, enquanto que as glândulas lacrimais do epitélio secretam a mucina de menor massa molar e maior solubilidade (MUC7). As células apicais do epitélio estratificado da córnea e do epitélio da conjuntiva expressam ao menos três mucinas associadas à membrana (MUC1, MUC4, e MUC16), que se estendem da superfície apical para formar o glicocálice na interface epitélio-filme lacrimal (GIPSON; ARGÜESO, 2003; RUPONEN; URTTI, 2015). Estas mucinas são definidas como glicoproteínas de alta massa molar ricas em prolina, serina e treonina domínio central, sendo os dois últimos aminoácidos substituídos lateralmente por carboidratos (CHAO; BUTALA; HERP, 1988; GIPSON; ARGÜESO, 2003). Os carboidratos representam aproximadamente 55 % da massa das mucinas presentes no olho humano, sendo majoritariamente representados por galactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina, e ácido siálico, e em menor proporção, fucose, manose e glicose (CHAO; BUTALA; HERP, 1988).

A mucoadesão é um processo complexo, e diferentes teorias vêm sendo propostas para descrever o mecanismo envolvido na adesão de polímeros na camada de muco. Estas teorias incluem o entrelaçamento mecânico entre as

cadeias do polímero e da mucina, a formação de interações eletrostáticas entre o polímero e o muco, a difusão-interpenetração do polímero na camada de muco, e fenômenos de adsorção. Dentre os mecanismos descritos atualmente, aqueles que apresentam maior aceitabilidade são fundamentados na termodinâmica da energia superficial e no processo de difusão/interpenetração das cadeias. As diferentes teorias devem ser consideradas como processos suplementares envolvidos nos diferentes estágios da interação com o muco ou diretamente com a mucina, sendo assim, o mais provável é que a mucoadesão seja governada por mais de um mecanismo que ocorrem simultaneamente ou sequencialmente (ANDREWS; LAVERLY; JONES, 2009; MADSEN; EBERTH; SMART, 1998).

A teoria da molhabilidade é principalmente aplicada às formas farmacêuticas líquidas ou pouco viscosas, e se baseia na espalhabilidade do líquido no tecido recoberto com muco. De acordo com esta teoria, a forma farmacêutica penetra através das irregularidades da superfície. Assim, sistemas poliméricos que possuam estrutura e grupamentos funcionais similares ao muco apresentarão melhor espalhabilidade e maior contato com a superfície do tecido (ANDREWS; LAVERLY; JONES, 2009; SMART, 2005). A teoria eletrostática descreve a adesão devido à transferência de elétrons entre o muco e o sistema mucoadesivo, resultando na formação de uma dupla camada de cargas elétricas na interface muco-polímero. Esta interação é mediada pelas forças de atração nesta dupla camada eletrônica (ANDREWS; LAVERLY; JONES, 2009; LEE; PARK; ROBINSON, 2000). A teoria da adsorção, por sua vez, é definida como sendo o resultado de várias interações superficiais entre o polímero adesivo e o muco. Primeiramente, a adsorção ocorre devido à interação iônica ou ligação covalente, e secundariamente, ocorrem as interações devido a forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, e ligações de hidrogênio. Este mecanismo de interação requer menos energia para ser revertido, sendo a forma mais predominante de interações superficiais em processos mucoadesivos, pois possui a vantagem de desenvolver “ligações semi-permanentes” (ANDREWS; LAVERLY; JONES, 2009; SMART, 2005). Finalmente, a teoria da difusão-entrelaçamento é governada pela difusão tempo-dependente das cadeias do polímero na rede glicoproteica formada pela mucina. Este processo ocorre em

função dos coeficientes de difusão do polímero e da mucina, os quais são dependentes da massa molar, densidade de ligações cruzadas, mobilidade e flexibilidade da cadeia polimérica, e da capacidade de expansão de ambos os polímeros (LEE; PARK; ROBINSON, 2000).

Uma vez que a interação entre polímeros mucoadesivos e o muco ocorre principalmente devido à interpenetração das cadeias poliméricas, seguido da formação de ligações secundárias não-covalentes entre o polímero e a mucina, o potencial mucoadesivo de materiais poliméricos é dependente da presença de grupamentos hidrofílicos capazes de formarem ligações de hidrogênio, como carboxila, hidroxila, amida, sulfeto, entre outros (ANDREWS; LAVERLY; JONES, 2009; HUANG et al., 2000; LEUNG, 1990). Consequentemente, polímeros que apresentam uma maior densidade de hidrogênios disponíveis para ligação são mais suscetíveis a interagir de forma mais forte com a mucina (MADSEN; EBERTH; SMART, 1998). Estima-se que o principal mecanismo mucoadesivo da xiloglucana consiste na adsorção e entrelaçamento das cadeias poliméricas, devido às interações químicas secundárias, como forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas, mas igualmente em função da similaridade estrutural entre a xiloglucana e a mucina, decorrente da presença de resíduos de xilose e galactose (AVACHAT; GUJAR; WAGH, 2013; DILBAGHI et al., 2013).

Polímeros mucoadesivos interagem com o muco por outros mecanismos, além da difusão-entrelaçamento das cadeias poliméricas. As interações secundárias, como as ligações de hidrogênio, contribuem para a formação e fortalecimento da rede polimérica. Os principais sítios para interações mucoadesivas parecem ser os resíduos de carboidrato, via interações eletrostáticas ou hidrofóbicas nas porções fucosiladas, devido à presença de grupos metila (HARDING, 2006).

Os polímeros mucoadesivos podem ser classificados em duas categorias, polímeros de primeira e de segunda geração. Os polímeros de primeira geração são aqueles inespecíficos, podendo ser classificados em aniônicos, catiônicos e não-aniônicos. Os polímeros aniônicos apresentam grupamentos carregados negativamente, dependendo do pKa do polímero. Entre os exemplos mais comuns estão o ácido poliacrílico e a carboximetilcelulose sódica, e se destacam por formar ligações de hidrogênio fortes com a mucina. Os polímeros catiônicos, que apresentam grupamentos carregados positivamente, têm sido os mais

extensivamente estudados, como a quitosana. Além da formação de ligações de hidrogênio, os polímeros catiônicos também interagem com o muco via interações eletrostáticas entre os grupamentos carregados positivamente, como os grupamentos amina da quitosana, e os resíduos de ácido siálico e ácido sulfônico da mucina. Os polímeros não-iônicos, que não apresentam grupos ionizáveis, interagem com a mucina principalmente pelo estabelecimento de ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas (ANDREWS; LAVERLY; JONES, 2009; SERRA; DOMÉNECH; PEPPAS, 2009).

Os polímeros de segunda geração são derivados dos polímeros de primeira geração, e obtidos através de modificações químicas pontuais, que potencializam o potencial mucoadesivo. Entre estes destacam-se os polímeros tiolados, ou tiômeros, que são polímeros contendo um grupamento tiol que proporciona a este, a capacidade de formar ligações covalentes (dissulfeto) com os subdomínios ricos em cisteína presentes na mucina. Os grupamentos tiólicos ainda proporcionam um efeito promotor da permeabilidade na córnea, devido à capacidade de desestruturar reversivelmente as junções oclusivas entre as células do epitélio, e devido à inibição das bombas de efluxo. Sendo assim, estes polímeros tendem a prolongar o tempo de residência da forma farmacêutica na superfície ocular, além de promover a permeação do fármaco através das camadas celulares, elevando a biodisponibilidade do fármaco (ANDREWS; LAVERLY; JONES, 2009; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2005; HORVÁT et al., 2015). Neste sentido, a alteração da estrutura de polímeros para aumento das propriedades mucoadesivas tem sido estudada, sobretudo quanto à tiolação de polissacarídeos. Mahajan e colaboradores (2013) modificaram a estrutura da xiloglucana esterificando-a com ácido tioglicólico, e demonstraram que a adição do grupamento tiol no polissacarídeo foi capaz de elevar em 1,5 vezes a mucoadesão e aproximadamente em 11 vezes a coesão do hidrogel. Horvát e colaboradores (2015) realizaram a tiolação do ácido poliaspártico com cloreto de cisteamina e observaram o prolongamento do tempo de retenção dos hidrogéis preparados com o polímero modificado, e da maior resistência à remoção da superfície da conjuntiva suína excisada utilizando o método de lavagem da conjuntiva com fluido lacrimal simulado.

Neste trabalho, a obtenção de hidrogéis termosensíveis de xiloglucana contendo nanoemulsões é descrita. As propriedades reológicas e mucoadesivas dos hidrogéis, assim como a permeação transcorneal da triancinolona acetona são avaliadas, visando a obtenção de uma forma farmacêutica oftálmica de fácil aplicação e com potencial para o aumento biodisponibilidade ocular do fármaco, no tratamento de uveíte.

**CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES PARA LIBERAÇÃO
OCULAR DE TRIANCINOLONA ACETONIDA**

Estudos recentes vêm demonstrando interesse na aplicação de sistemas de liberação nanoestruturados para liberação de fármacos pela via ocular (ARAÚJO et al., 2012; CAÑADAS et al., 2016; CHOLKAR et al., 2013). No entanto, apesar da crescente dedicação no desenvolvimento de sistemas nanoparticulados, pouca atenção vem sendo destinada ao estudo das nanoemulsões como potenciais carreadores de fármacos destinados à via oftálmica. Este sistema apresenta a capacidade de controle de liberação de fármacos, promoção da permeação ocular, e potencial de inibir o efluxo de moléculas bioativas (ANTON; VANDAMME, 2009; TADROS et al., 2004).

Este estudo visa o desenvolvimento de nanoemulsões contendo triancinolona acetonida, um potente anti-inflamatório utilizado clinicamente como solução oftálmica. Para tanto, foram avaliados os efeitos de parâmetros de formulação com: massa de óleo, proporção volumétrica entre a fase oleosa e a fase aquosa, e concentração dos tensoativos hidrofílicos e hidrofóbicos, sobre as propriedades físico-químicas, teor e eficiência de encapsulação das nanoemulsões. Adicionalmente, foram avaliados a estabilidade física do sistema nanoemulsionado frente ao armazenamento a 4 e 25 °C e o perfil de liberação do fármaco a partir do sistema coloidal.

Este artigo foi aceito para publicação pelo periódico *Latin American Journal of Pharmacy*.

DEVELOPMENT OF TRIAMCINOLONE ACETONIDE-LOADED NANOEMULSION FOR OPHTHALMIC DRUG DELIVERY

Luis F. C. SILVA*, Elenara LEMOS-SENNA

^aPharmaceutical Sciences Department, Federal University of Santa Catarina, Campus Trindade, Florianópolis, SC, 88040-970, Brazil.

*e-mail contact: luis_rsl@yahoo.com.br

Summary

This study aims to develop nanoemulsions loading triamcinolone acetonide (TA) intended to topical ophthalmic administration. The physicochemical and drug loading properties were optimized by changing the organic to aqueous phase volume ratio, medium chain triglyceride oil (MCT) amount, soybean lecithin and Poloxamer 188 concentrations. Nanoemulsions displaying a spherical shape were obtained, with the drug loading and physicochemical properties being affected by the formulation parameters studied. All formulations were stable during 5 months of storage at 4 °C. In contrast, when they were stored at 25 °C, changes in the droplet size, polydispersion index (PDI), zeta potential, and entrapment efficiency (EE%) values were observed, culminating in the nanoemulsion creaming after the 90th storage day. As expected, nanoemulsions released TA in a fast rate. The results indicated that TA-loaded nanoemulsions properties can be optimized by varying some formulations parameters, and due its reservoir structure, these drug delivery systems may provide an adequate TA release rate on the eye surface.

Key words: nanoemulsion, topical ophthalmic drug delivery, triamcinolone acetonide.

INTRODUCTION

Uveitis is a term used to describe a wide variety of inflammatory conditions affecting the uveal tract, which comprises the choroid, the ciliary body, and the iris,

although in common usage uveitis also includes inflammation of the adjacent tissues, as the cornea, sclera, retina and even the optic nerve¹. The Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) Working Group² defined uveitis according the anatomical location of inflammatory process in anterior uveitis, which affects the anterior chamber of the eye; intermediate uveitis, that reach the vitreous humor; posterior uveitis, affecting retina, choroid, and optic nerve; and panuveitis, which commits the anterior chamber, vitreous humor, retina, choroid, and optic nerve. The treatment of uveitis is based on the use of corticosteroids, mainly triamcinolone acetonide (TA), which is often administrated as sub-tenon, subconjunctival, or intravitreal injection³. However, these invasive treatments are frequently associated to serious side effects such as cataract, ocular hypertension or increment on ocular pressure, retinal detachment, vitreous hemorrhage, and endophthalmitis⁴⁻⁹.

Topical ophthalmic administration is commonly used for the management of the anterior uveitis, since it provides therapeutic drug levels in the anterior chamber with low incidence of side effects^{5,10}. Besides, eye drop formulations allow the patient self-administration, avoiding hospital care, and decreasing the treatment cost. However, bioavailability of topically administered drugs is strongly affected by ocular physiological and anatomical barriers. Physiological barriers in the precorneal area include solution drainage, blinking tear film, tear turnover, increased lacrimation, and entrapment on mucin hydrophilic layer that recover the eye surface. These physiological barriers reduce the contact time of the drug with absorptive membranes and are considered to be the primary reason of the low reach of the applied dose into the intraocular tissues¹⁰⁻¹². In addition, various layers of the cornea, conjunctiva, and sclera play an important role in the drug permeation. The cornea is the anterior most layer of the eye that limits the entry of exogenous substances into the eye, due to its particular structure consisted by different polarity layers, which are the epithelium, stroma, and endothelium. Compared to the cornea, conjunctival drug absorption is considered to be nonproductive due to the presence of conjunctival blood capillaries and lymphatics, which causes significant drug loss into the systemic circulation after drug instillation. Finally, the sclera is composed of collagen fiber and proteoglycans embedded in an extracellular matrix and displays a drug permeability comparable to that of the corneal stroma^{10,13,14}.

A number of recent studies have proven that nanoformulations can significantly enhance the therapeutic efficacy and bioavailability of ocular drugs. In particular, nanoemulsions have been investigated as vehicles for ophthalmic administration of lipophilic drugs, i.e. indomethacin, cyclosporine, and diclofenac¹⁵. This drug delivery system offers several advantages over the conventional ophthalmic drug delivery systems, including the sustained drug delivery, the promotion of the drug permeation, and the ability to overcome the efflux-related issues associated with the parent drug¹⁶⁻¹⁸.

Nanoemulsions are fine dispersions of two immiscible liquids, in which the dispersed phase displays droplets in the submicron range. They are considered thermodynamically unstable systems that breakdown over time, depending on the power of the energetic barrier between nanoemulsion and separate states, and this energy defines the kinetic stability of the system. The power of the energy is determined, mostly, by physicochemical phenomena that avoid droplets from being in contact with each other, like repulsive hydrodynamic and colloidal interactions, i.e., steric and electrostatic hindrance. Nanoemulsions exhibiting relatively long kinetic stabilities may be prepared by proper selection of particle size distributions, oil type, and emulsifiers¹⁹.

Considering the above mentioned, this study aims to develop triamcinolone acetonide-loaded nanoemulsions intended for ocular treatment of the anterior uveitis. In this study, we evaluate the effect of some formulation variables on the particle size, zeta potential, drug loading, storage stability, and drug release profile, when the spontaneous emulsification method is used. This approach allows the preparation of nanoemulsions at room temperature, without the use of complex equipments, only by adjusting a few formulation parameters to optimize their physicochemical properties. Besides, the easy scaling-up to produce larger quantities and the feasibility of sterilization increases the interest of these systems as vehicles for ocular drug delivery²⁰.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Medium chain triglyceride oil (MCT, Ritamollient CCT) was acquired from Brasquim (Brazil). Hydrogenated soybean lecithin (LIPOID S100, 97.5 % phosphatidylcholine) was purchased from Lipid Ingredients & Technology (Brazil). Triamcinolone acetonide was acquired from Pharma Nostra (Brazil). Poloxamer 188 (Lutrol F68), peanut oil, olive oil, and cotton seed oil were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Except for HPLC-grade acetonitrile, all other solvents and reagents were analytical grade and were used as received.

Triamcinolone Acetonide Solubility Studies

The solubility of TA in different oils was previously evaluated by adding an excess amount of drug in 1.0 g of peanut oil, olive oil, cotton seed oil, or MCT oil. The mixtures were stirred for 72 h at room temperature in dark conditions. The samples were centrifuged at 3000 rpm for 30 minutes and an aliquot of each supernatant was withdrawn and analyzed by HPLC in a Perkin Elmer Series 200 chromatograph (PerkinElmer, USA). The analyses were carried out in reversed phase mode using a Luna C18 5 μm (150 mm x 4.6 mm) column, eluted with acetonitrile:water (6:4, v/v) at flow rate of 1.0 mL.min⁻¹. The injection volume was 10 μL and detection was performed by UV at 240 nm. The analyses were performed in triplicate.

Triamcinolone Acetonide-Loaded Nanoemulsion Preparation

Nanoemulsions were prepared by the spontaneous emulsification method²¹. An organic phase, composed by the selected oil, soybean lecithin, and TA, previously dissolved in ethanol, was poured into 50 mL of an aqueous phase containing Poloxamer 188, under magnetic stirring at room temperature. After, the organic solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the final volume was adjusted to 20 mL. Then, the colloidal dispersions were filtered through an 8 μm pore size quantitative paper. All formulations were prepared in triplicate and stored at 4 °C. The influence of the oil, soybean lecithin, and poloxamer concentration, as well as of the organic to aqueous phase volume ratio on droplet size, size distribution,

and drug loading was evaluated. The nanoemulsion formulations tested in this study are demonstrated in the Table 1.

Droplet size and zeta potential

The mean particle diameter and zeta potential were determined by dynamic light scattering and laser-Doppler anemometry, respectively, using a Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, UK). The measurements were performed at 25 °C after appropriate dilution of the samples in ultrapure water (MilliQ, Millipore, USA). Size analyses were performed at a fixed scattering angle of 173°. The nanoemulsion droplet size was determined using the Stokes-Einstein equation. For measurements of zeta potential (ζ potential), samples were placed in an electrophoretic cell, where a potential of ± 150 mV was established. The ζ potential values were calculated from mean electrophoretic mobility values using Smoluchowski's equation. All analyses were carried out in triplicate.

Morphology evaluation

Nanoemulsion morphology was examined by transmission electron microscopy in a JEOL-1011 microscope (JEOL Ltd, Japan), with an operating voltage of 100 kV. Samples were diluted in ultrapure water, deposited on 200 mesh carbon-coated copper grids and negatively stained with 1 % (w/v) phosphotungstic acid.

Determination of Drug Loading and Entrapment Efficiency

Drug loading (DL) was estimated after HPLC analysis of TA in the solutions obtained after dilution of the samples in acetonitrile, using the chromatographic conditions described previously. The entrapment efficiency (EE%) was determined as being the difference between the total TA concentration found in the colloidal dispersions, after their complete dissolution in acetonitrile, and the drug concentration found in the supernatant obtained after ultrafiltration/centrifugation procedure, using YM-100 Ultracel devices (10,000 Da NMWL, Millipore Corp., USA). All formulations were analyzed in triplicate.

Table 1 – Nanoemulsion formulations.

Constituents	Formulation code			
	I	II	III	IV
Oil (mg)	x	x	x	x
Soybean Lecithin (mg)	10	20	10	20
TA (mg)	5	5	5	5
OP to AP volume ratio (v/v)	y	y	y	y
Poloxamer 188 concentration (%)	0.10	0.10	0.25	0.25
Aqueous phase (mL)	50	50	50	50

x is amount of the selected oil: 50, 100, 200 or 300 mg.

y is the organic phase to aqueous phase volume ratio: 1:10, 1:5, 1:3.3, or 1:2.5.

Storage stability study

The storage stability of TA-loaded nanoemulsions was investigated after storing the formulations at 25 ± 1 °C and 4 ± 2 °C for 5 months. At predetermined time intervals, aliquots of the nanoemulsion formulations were withdrawn and were evaluated according their macroscopic appearance, droplet size and size distribution, zeta potential, and drug loading and entrapment efficiency, as described above. All analyses were performed in triplicate.

In vitro TA release studies

An aliquot of 5 mL of each formulation was placed into a dialysis bag (Spectra/Por® CE MWCO 10000, USA), which were placed into a USP dissolution apparatus II Model 299 (Nova Ética, Brazil) containing 300 mL of sodium laurylsulphate solution 0.5 % (w/v) in Simulated Lachrymal Fluid pH 7.4²². The release medium was maintained at 37° C under mechanical stirring at 50 rpm. Aliquots of the release medium were withdrawn at predetermined intervals, and the volume was replaced with fresh dissolution medium to maintain the *sink* condition. TA was determined by HPLC, using the chromatographic conditions described in 3.1. The cumulative amounts of TA released (%) were plotted against time (h). The release profiles were compared after calculating the dissolution efficiency (DE%) as described in equation 1. The area under curve of the release profiles was determined by the trapezoidal method.

$$DE\% = \frac{AUC_{sample}}{Q_{100} \times t} \times 100 \quad (1)$$

being AUC_{sample} the area under curve of release profile, Q_{100} is total dissolution (100 %), and t is time (h).

Statistical analysis

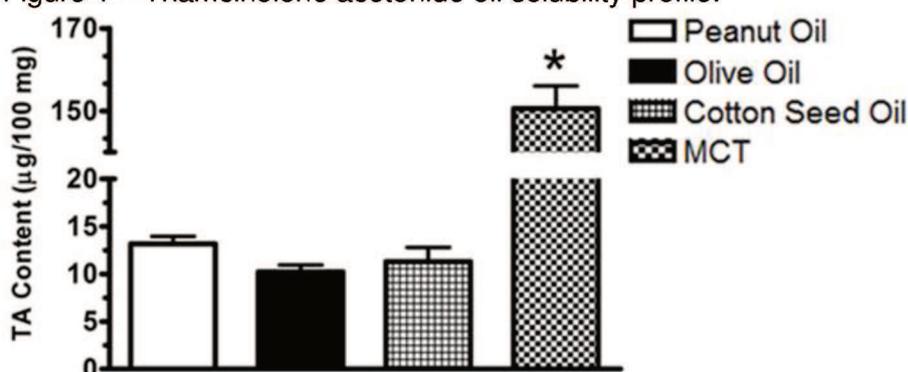
Data were expressed as mean \pm standard deviation (s.d.) and the statistical significance was assessed by the analysis of variance (ANOVA) followed by t-test ($\alpha = 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Triamcinolone Acetonide Solubility Study

Different oils were evaluated in order to select that which is able to solubilize the highest amount of TA. As shown in Figure 1, MCT was demonstrated to be able to solubilize a significantly higher amount of drug ($p < 0.05$), and it was selected to prepare the nanoemulsions. While the other vegetable oils are constituted mainly by long chains fatty acid as palmitic (C16:0), oleic (C18:1), and linoleic (C18:2) acids, MCT are triglycerides whose fatty acids have an aliphatic chain of 6–12 carbon atoms. However, not only the composition, but also the lower viscosity displayed by the MCT oil should have favored the higher solubilization of the drug.

Figure 1 – Triamcinolone acetonide oil solubility profile.



Triamcinolone Acetonide-Loaded Nanoemulsion Preparation

Once MCT was chosen as oil matrix, some formulation parameters were varied to optimize the nanoemulsion formulation (Table 1). To evaluate the effect of MCT amount (x) and organic to aqueous phase volume ratio (y) on physicochemical properties and TA-loading of the nanoemulsion, these parameters were ranged individually using four groups of formulations prepared using two different concentrations of soybean lecithin and Poloxamer 188.

Effect of organic to aqueous phase volume ratio

To evaluate the effect of the organic to aqueous phase volume ratio on the nanoemulsion characteristics, formulations were prepared by the spontaneous emulsification method, using a fixed amount of MCT (100 mg) and organic phase volumes of 5.0; 10.0; 15.0; and 20.0 mL, which corresponded to an aqueous phase volume ratio of 1:10, 1:5, 1:3.3 or 1:2.5 (v/v), respectively. As can be observed in Figure 2A-B, the increase of the organic phase volume induced a slight decrease in the droplet size and polydispersion index, with smaller droplet sizes obtained when a 1:3.3 organic to phase volume ratio was tested. The further increase in the organic volume (1:2.5 ratio) carried not only an increase in the droplet size and polydispersion index (PDI), but also conducted to the reduction of the colloidal dispersion stability, leading to the coalescence of the oil droplets after a few hours at 4 °C. It may be related to the slower ethanol displacement/diffusion through aqueous phase and a lower interfacial area, which implies in higher droplet diameter, favoring the Ostwald ripening process, or be related to the increment on oil phase diffusion through aqueous phase, which after ethanol evaporation did not emulsify appropriately^{16,20}. Due its physical instability, no measurements of drug loading or entrapment efficiency were performed for samples prepared using 1:2.5 organic to aqueous phase volume.

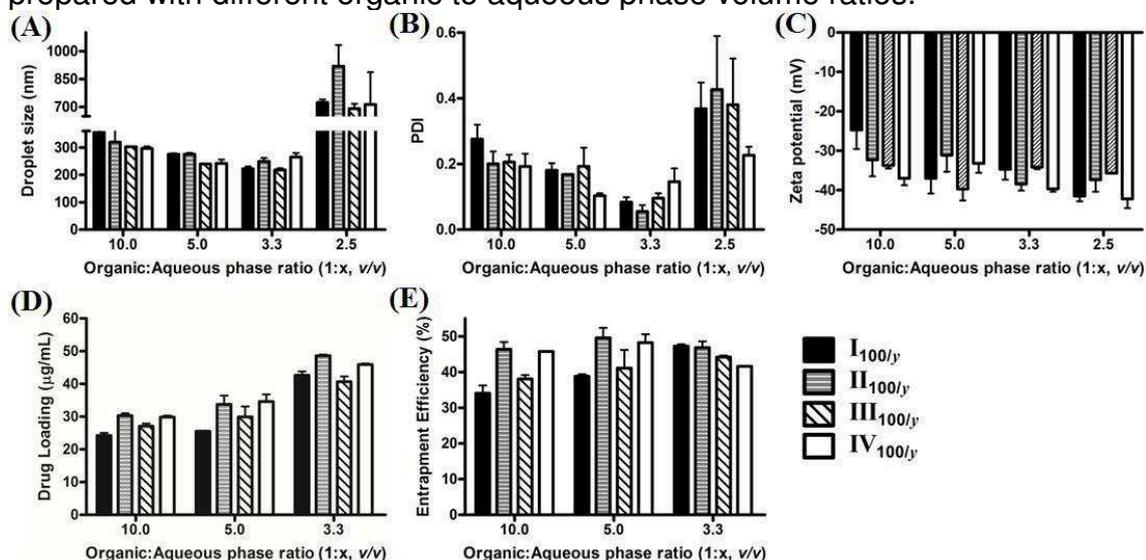
An increase in the drug loading and entrapment efficiency was obtained by increasing the organic phase volume from 5 to 15 mL. Also, the formulations prepared using the highest amount of soybean lecithin displayed a higher triamcinolone acetonide loading, probably due to the greater solubility of the drug in the phospholipid-medium chain triglyceride mixture^{3,24} (Fig. 2D-E; formulation groups II and IV). Since smaller droplet sizes and higher drug loadings were obtained, further

formulations studies were conducted using an organic to aqueous phase volume ratio fixed at 1:3.3 (v/v).

Effect of oil amount

No statistical difference was found in the droplet size and polydispersity index, when MCT amount of the nanoemulsion formulations was varied from 50 to 200 mg (Fig. 3A-B). However, a significant increase of the drug loading and entrapment efficiency were observed ($p < 0.05$) (Figure 3E), indicating that a higher association of the lipophilic drug to the dispersed phase of the colloidal dispersion occurred. When the MCT oil amount was increased to 300 mg, both droplet size and PDI were also increased, indicating that 200 mg of MCT oil is the highest amount that can be used to prepare nanoemulsions displaying high drug loadings, without significant changes in the droplet size²⁵.

Figure 2 – Droplet size (A); polydispersity index (PDI) (B); zeta potential (C); drug loading (D); and entrapment efficiency (E) values obtained for nanoemulsions prepared with different organic to aqueous phase volume ratios.



For both experiments evaluating the effect of the organic to aqueous phase volume ratio and amount of MCT oil on the nanoemulsion properties, no statistical differences were observed in the zeta potential values, which were ranged from -24.7 ± 8.4 to -44.9 ± 4.1 mV (Fig. 3C). Also, the soybean lecithin and Poloxamer 188

concentrations appeared to display a minimal influence on the nanoemulsion physicochemical properties. Nevertheless, a tendency in to decrease the nanoemulsion zeta potential values was observed by increasing the soybean lecithin concentration, probably due to the electronic interaction between the negatively charged free fatty acids present in the MCT oil and the positively charged tertiary amine groups of the phosphatidylcholine²⁴ (Fig. 3C, II and IV). On the other hand, there was a tendency in to increase the drug loading and the entrapment efficiency with the soybean lecithin concentration increment (Fig. 3D-E, II and IV) probably because it enhances the drug solubility into the MCT oil phase and/or the association of the drug at the lecithin layer located at the surface of the droplets.

The physicochemical and drug loading properties of nanoemulsions prepared using 200 mg of MCT oil and an organic to aqueous phase volume ratio of 1:3:3 are demonstrated in the Table 2. Nanoemulsions displaying smaller and more homogeneous droplet size distributions were obtained when soybean lecithin and poloxamer 188 concentrations were increased^{24,26,27}, probably due to the better droplet stabilization and lower interfacial tension.

The TEM micrographs obtained from nanoemulsions were demonstrated in Fig. 4. Morphologically, these samples displayed a spherical or oval shape with a slight rough surface or less defined droplet-water boundary, probably due amphiphilic properties of lecithin, which can interact with oil matrix by the apolar chain, while the polar side of the phospholipid should be in the droplet edge, faced to aqueous phase²³. Deformation of the oil droplets may have taken place after drying the samples dropped on the carbon-coated copper grids. As nanoemulsions are consisted of liquid droplets of oil in a continuous aqueous phase²⁸, and MCT is low viscous oil with a high flowability, it is expected that nanoemulsion droplets present a highly soft and deformable property, changing from spherical to oval or drop-shape, depending on external forces during water removing in the grid preparation step.

All samples seemed to be monodisperses, with a homogeneous droplet size distribution, being this result in agreement with DLS analysis. However, when droplet mean diameters are measured by TEM, they showed to be smaller than 100 nm. This divergence could be related to the coalescence of larger droplets during water removing step of the grid preparation, remaining only a few smaller droplets, and giving a misleading droplet size measurement.

Figure 3 – Droplet size (A); polydispersion index (PDI) (B); zeta potential (C); drug loading (D); and entrapment efficiency (E) values obtained for nanoemulsions prepared using different MCT oil amounts.

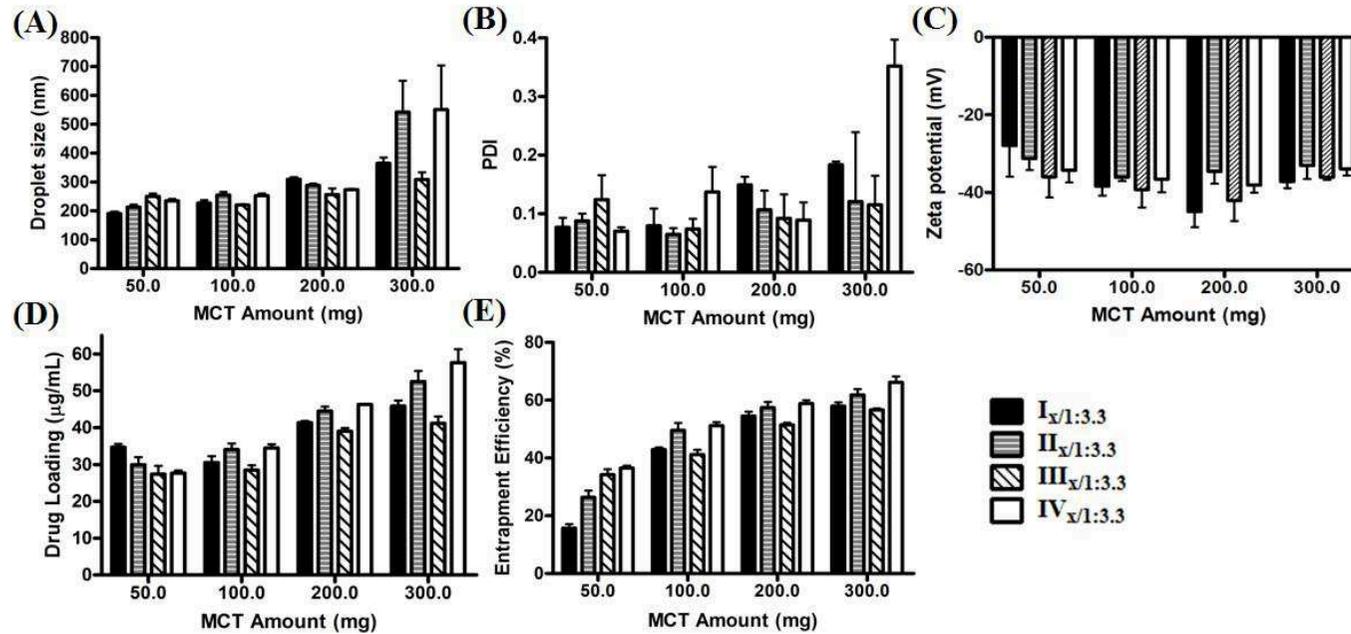
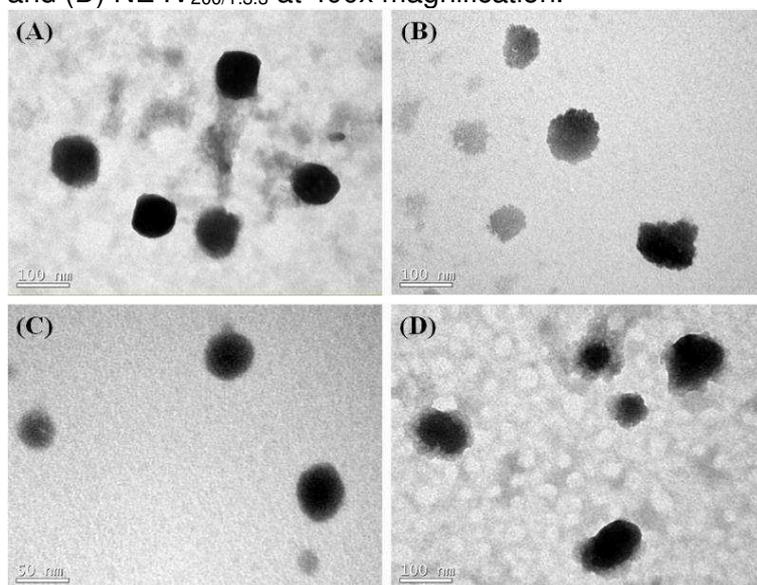


Table 2 – Physicochemical and drug loading properties of TA-loaded nanoemulsions (n =3).

Formulation	Droplet size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	Drug loading (µg.mL ⁻¹)	Entrapment Efficiency (%)
NE I ₂₀₀ /1:3.3	309.5 ± 63.9	0.201 ± 0.051	-44.9 ± 4.1	41.38 ± 0.81	54.53 ± 2.55
NE II ₂₀₀ /1:3.3	276.0 ± 40.7	0.132 ± 0.034	-34.6 ± 3.2	44.52 ± 1.98	57.43 ± 3.41
NE III ₂₀₀ /1:3.3	277.8 ± 27.7	0.123 ± 0.012	-42.1 ± 5.3	39.05 ± 1.41	51.45 ± 1.29
NE IV ₂₀₀ /1:3.3	277.7 ± 49.3	0.158 ± 0.017	-38.1 ± 2.0	46.30 ± 0.23	58.83 ± 1.93

Nanoemulsions intended for ocular drug delivery have been developed with a droplet size ranging from a few nanometers to some hundred nanometers^{18,29}. In our study, nanoemulsions displaying mean droplet sizes of about 300 nm were obtained, which it may be considered a relatively high size. The droplet size and, therefore, the stability of the colloidal dispersions are dependent on the combination of excipients, in particular on the surfactants used in the formulations. However, the concentration of surfactants should be a compromise between stability and safety. Even though the soy bean lecithin and Poloxamer 188 are well tolerated and biocompatible surfactants for instillation onto the eye, the use of surfactant concentrations higher than those used in this study could cause ocular damage³⁰. On the other hand, particles larger than 10 μm tend to be trapped into the protective mucin layer, resulting in a foreign body sensation, being removed from the eye surface due lacrimation and blinking, causing irritation and blur^{31,32}. In this study, the optimized nanoemulsions display droplet sizes that are smaller than micronized drug suspensions (few micrometers)³³ and microparticle carriers^{32,34}, which have also been proposed for ophthalmic drug delivery. Based on the discussed above, nanoemulsions prepared using 200 mg of MCT and an oil phase to aqueous phase ratio of 1:3.3 (v/v) are thought to possess appropriate physicochemical characteristics for ophthalmic delivery.

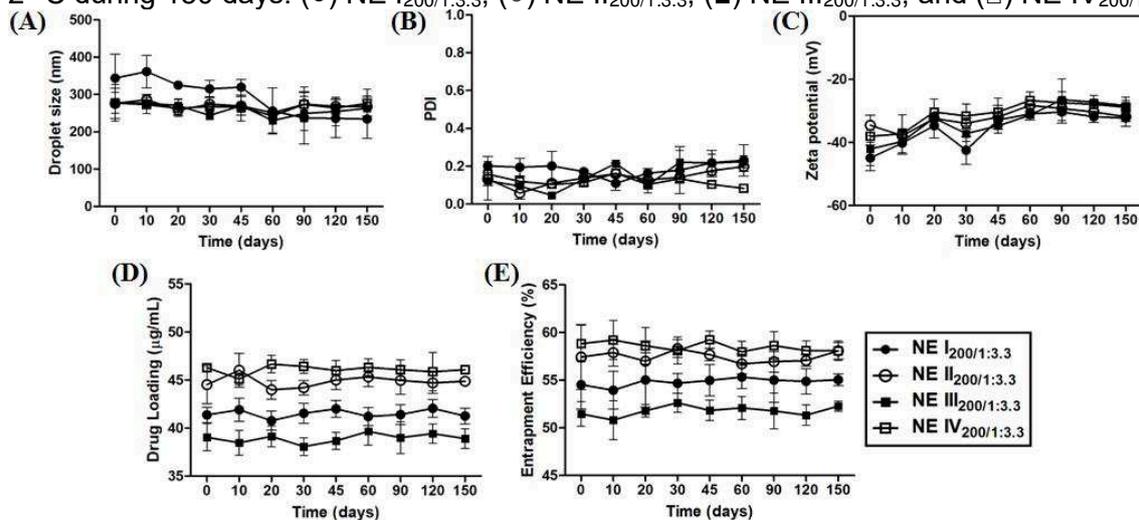
Figure 4 – TEM micrographs obtained from (A) NE I_{200/1:3.3}; (B) NE II_{200/1:3.3}; (C) NE III_{200/1:3.3}; and (D) NE IV_{200/1:3.3} at 400x magnification.



Storage stability studies

When stored at 4 °C, nanoemulsions did not show statistically significant changes in the droplet sizes or in the PDI values over the experiment's time ($p > 0.05$) (Fig. 5A-B). The nanoemulsion stability at this temperature may be related to the ability in to preserve the negative charged surface, resulting in an electrostatic repulsion between droplets (zeta potential ranged from -40 to -30 mV) (Fig. 5C). Additionally, TA loading and entrapment efficiency also did not change, indicating no drug degradation or droplet collapse occurred, which could result in TA releasing from the MCT oil.

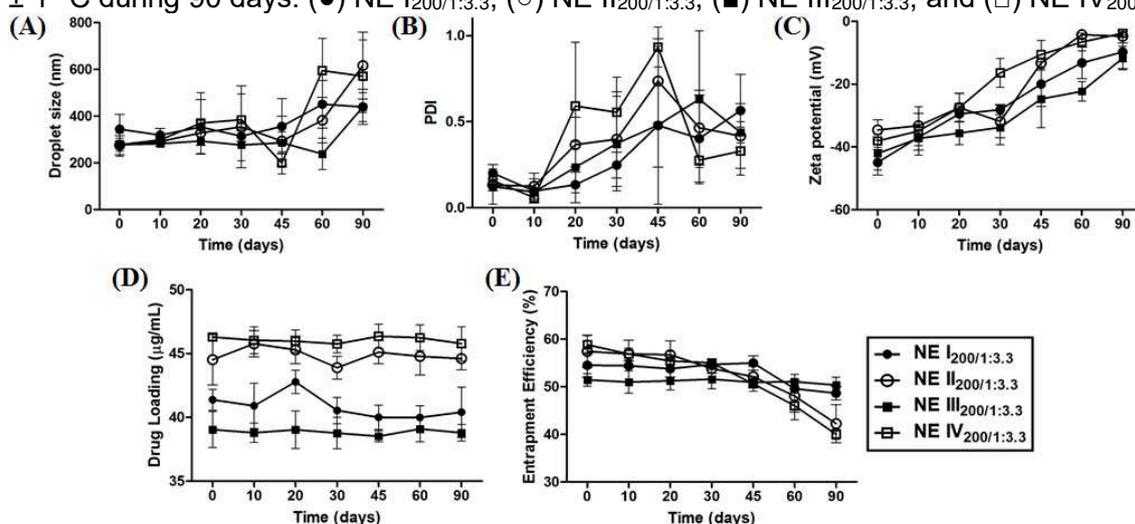
Figure 5 – (A) Droplet size, (B) polydispersion index (PDI), (C) zeta potential, (D) drug loading, and (E) entrapment efficiency values obtained after storing the nanoemulsions at 4 ± 2 °C during 150 days. (●) NE I_{200/1:3.3}; (○) NE II_{200/1:3.3}; (■) NE III_{200/1:3.3}; and (□) NE IV_{200/1:3.3}.



On the other hand, when stored at 25 °C, nanoemulsions prepared with a higher amount of lecithin showed an increase on droplet size on the 60th day storage (Fig. 6A), while those prepared with a smaller amount of phospholipid displayed a slight increment on the droplet size. In addition, all formulations exhibited an increment in the PDI and a decrease in the zeta potential values (Fig. 6B-C). These results may be related to the formation of a more heterogeneous system, with a reduced surface charge, which may have led to the increase of the colloidal attractive forces. The increment on droplet size could lead to coalescence phenomenon,

causing phase separation. All formulations were susceptible to creaming (phase separation due to the gravitational force) after 90 days, and the experiments were discontinued. The drug entrapment efficiency appeared to be slightly decreased during storage at 25 °C (Fig. 6E), and this phenomenon was more evident for formulations prepared with a higher amounts of soybean lecithin; NE I_{200/1:3.3} showed no variation in the entrapment efficiency during storage. On the other hand, no change was observed in drug loading (Fig. 6D) during storage of nanoemulsions at 25 °C, meaning that, triamcinolone acetonide remains chemically stable during 90 days, but the physical instability of the samples tends to expel TA from the oil droplet to the surrounding aqueous medium, leading to a decrease on the entrapment efficiency.

Figure 6 – (A) Droplet size, (B) polydispersion index (PDI), (C) zeta potential, (D) drug loading, and (E) entrapment efficiency values obtained after storing the nanoemulsions at 25 ± 1 °C during 90 days. (●) NE I_{200/1:3.3}; (○) NE II_{200/1:3.3}; (■) NE III_{200/1:3.3}; and (□) NE IV_{200/1:3.3}.



The spontaneous emulsification method using in this study was able to prepare physically stable nanoemulsions, when storage at 4 °C for 5 months, however, when stored at 25 °C, changes in physicochemical properties were observed, culminating in a creaming phase separation after the 90th day storage. Despite the physical instability at room temperature, these drug delivery systems remain as an interesting approach to carry TA for ophthalmic administration.

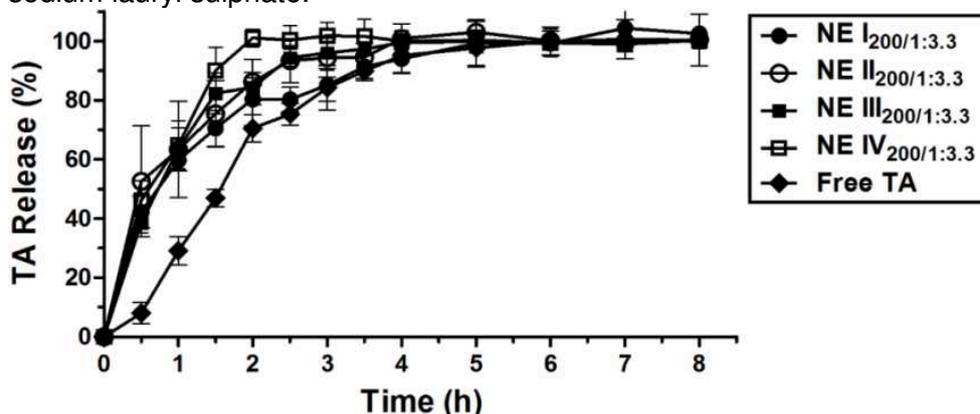
The rate at which a nanoemulsion reverts back to the separated phases is determined by the frequency that the oil droplets come into contact with each other, which depends on the primary mechanism responsible for particle–particle contacts,

like Brownian motion, applied shear, or gravitational forces¹⁹. It may explain the difference between storage stability at 4 and 25 °C. At higher temperature, droplets will have higher Brownian motion than at lower temperatures, due to decrease in the nanoemulsion viscosity and to increment of energy. Increasing Brownian motion enhances droplet-droplet collision probability, provoking coalescence into larger droplets until phase separation.

TA release profile

Nanoemulsions are drug-reservoir systems, which can improve the release properties of hydrophobic drugs, specially enhancing their dispersibility in aqueous medium, but with limited controlled release profile, mainly due their small size, high contact with the fluid, and the liquid state of the nanocarrier²⁷. The release of triamcinolone acetonide from nanoemulsion formulations in lachrymal simulated fluid pH 7.4 was very fast, with almost all drug being released after 2 hours (Fig. 7). This result is probably related to the small droplet size and short diffusion length for the drug to reach the release medium. Besides, the presence of a fraction of the drug adsorbed onto the droplet surface may be contributed for this fast drug release rate. The fast drug release rate displayed by TA loaded in the nanoemulsions can be verified by the dissolution efficiency values exhibited in Table 2. The TA dissolution efficiency values obtained for all nanoemulsions were significantly higher than that obtained for free drug ($p < 0.05$).

Figure 7 – TA release profiles in lachrymal simulated fluid pH 7.4 containing 0.5 % (w/v) sodium lauryl sulphate.



The oil phase did not constitute a barrier to drug release, allowing 80 % of drug release after 90 minutes, for samples prepared with a higher concentration of Poloxamer 188, and 120 minutes, for those prepared with a lower concentration this triblock copolymer. Since Poloxamer 188 has a surfactant effect, it could promote the drug diffusion from the droplet to the dissolution medium, enhancing the drug release rate. Additionally, samples prepared with a higher amount of lecithin tend to display a higher dissolution efficiency value (Table 3), probably due to the higher drug association in the phospholipid layer. On the other hand, no statistical difference was observed between the samples ($p > 0.05$), except when the NE I_{200/1:3.3} and NE IV_{200/1:3.3} were compared ($p < 0.05$). A fast release rate may be desired for ophthalmic drug delivery devices, mainly due low residence time on eye surface. As eye drop formulations performances are strongly affected by precorneal effect¹⁰⁻¹², TA should be delivered in a high rate, otherwise it will be removed from the eye surface inside nanoemulsion droplets, causing a loss of drug dosage.

A few nanoparticulate systems were proposed for TA ophthalmic delivery, concerning mainly on lipid^{35,36} and polymeric nanoparticles³. Our system stands out, when compared with TA-loaded PLGA nanoparticles³, by performing higher entrapment efficiency and faster TA release rate. While nanostructured lipid carriers^{35,36} displayed slower TA release rate, probably due use of high crystalline solid lipids and the 18 times higher lipid:TA weight ratio. Our group was able to prepare a highly physical stable nanoemulsion system, using a smaller weight of lipid, which can delivery TA in a high release rate, avoiding drug depuration inside nanostructured carrier.

Table 3 – Dissolution efficiency values obtained for TA-loaded nanoemulsions and free drug.

Sample	Mean DE ± SD (%)
Free TA	74.82 ± 4.11 ^a
NE I _{200/1 :3.3}	82.91 ± 2.33 ^b
NE II _{200/1 :3.3}	88.89 ± 3.26 ^{bc}
NE III _{200/1 :3.3}	84.82 ± 2.67 ^{bc}
NE IV _{200/1 :3.3}	89.53 ± 1.31 ^c

^{a, b, c}Samples statistically different ($p < 0.05$).

CONCLUSION

Nanoemulsions were successfully prepared by spontaneous emulsification method, and the physicochemical and drug loading properties could be optimized by changing the organic to aqueous phase volume ratio, MCT oil amount, and soybean lecithin and Poloxamer 188 concentrations. In general, nanoemulsions displaying better drug loading and physicochemical properties were obtained using 200 mg of MCT oil and an organic to aqueous phase volume ratio of 1:3.3. The formulations were stable during 150 days storage at 4 °C. However, when stored at 25 °C, the nanoemulsions exhibited changes in their size, PDI and zeta potential values, undergoing creaming, depending on the formulation composition. Nanoemulsions are able to increase the TA release rate, reaching a total drug release after 2 hours. Despite the physical instability at room temperature, these drug delivery systems remain as an interesting approach to carry TA for ophthalmic administration.

Acknowledgements

Authors would like to thank to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support, and to Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME–UFSC) for TEM analysis.

REFERENCES

- (1) Dunn, J.P. (2015) *Prim. Care*, **42**: 305-23.
- (2) The Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) Working Group (2005) *Am. J. Ophthalmol.* **140**: 509-16.
- (3) Sabzevari, A., K. Adibkia, H. Hashemi, A. Hedayatfar, N. Mohsenzadeh, F. Atyabi, *et al.* (2013) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **84**: 63-71.
- (4) Chang, Y.-C. & W.-C. Wu (2008) *Kaohsiung J. Med. Sci.* **24**: 72-7.
- (5) Conningham-Junior, E.T. & J.D. Wender (2010) *Can. J. Ophthalmol.* **45**: 353-8.
- (6) Jermak, C.M., J.T. Dellacroce, J. Heffez & G.A. Peyman (2007) *Surv. Ophthalmol.* **52**: 503-22.

- (7) Jonas, J.B., R.F. Degenring, I. Kreissig, I. Akkoyun & B.A. Kampeter (2005) *Ophthalmol.* **112**: 593-8.
- (8) de Smet, M.D., S.R.T. Taylor, B. Bodaghi, E. Miserocchi, P.I. Murray, U. Pleyer *et al.* (2011) *Prog. Retin. Eye Res.* **30**: 452-70.
- (9) Yamamoto, Y., T. Komatsu, Y. Koura, K. Nishino, A. Fukushima & H. Ueno (2008) *Can. J. Opht.* **43**: 42-7.
- (10) Gaudana, R., H.K. Ananthula, A. Parenky, A.K. Miltra (2010) *AAPS J.* **12**: 348-60.
- (11) Tombran-Tink J. & C.J. Barnstable (2008). "Ocular transporters in ophthalmic diseases and drug delivery", Humana Press, New Jersey, pp. 399-413.
- (12) Ruponen, M. & A. Urtti (2015) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **96**: 442-6.
- (13) Barrar, J., A.R. Javadzadeh & Y. Omid (2008) *Expert Opin. Drug Deliv.* **5**: 567-81.
- (14) Mannermaa, E., K.-S. Vellonen & A. Urtti (2006) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**: 1136-63.
- (15) Cholkar, K.; S.P. Patel, A.D. Vaflapudi & A.K. Mitra (2013) *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **29**: 106-23.
- (16) Anton, N. & T.F. Vandamme (2009) *Int. J. Pharm.*, **377**: 142-7.
- (17) Gallarate, M., D. Chirio, R. Bussano, E. Peira, L. Battaglia, Baratta, F. *et al.* (2013) *Intern. J. Pharm.*, **440**: 126-34.
- (18) Tadros, T., P. Izquierdo, J. Esquena & C. Solans (2004) *Adv. Colloid. Interface Sci.*, **108-109**: 303-18.
- (19) McClements, D.J. (2012) *Soft Matter*, **8**: 1719-29.
- (20) Saberi, A.H., Y. Fang & D.J. McClements (2013) *J. Colloid. Interface Sci.*, **391**: 95-102.
- (21) Bouchemal, K., S. Briançon, E. Perrier & H. Fessi (2004) *Intern. J. Pharm.*, **280**: 241-51.
- (22) Paulsson, M., H. Hägerström, K. Edsman (1999) *Eur. J. Pharm. Sci.*, **9**: 99-105.
- (23) Chu, J., Y.-L. Cheng, A.V. Rao, M. Nourael, S. & Zarate-Muñoz, E.J. Acosta (2014) *Inter. J. Pharm.*, **471**: 91-102.
- (24) Klang, V. & C. Valenta (2011) *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **21**: 55-76.

- (25) Sakeena, M.H.F., S.M. Elrashid, A.S. Munavvar & M.N. Azmin (2011) *J. Oleo Sci.*, **60**: 155-8.
- (26) Teo, B.S.X., M. BASRI, M.R.S ZAKARIA, A.B. SALLEH, R.N.Z.R.A RAHMAN & M.B.A. RAHMAN (2010) *J. Nanobiotechnology.*, **8**: 1-11.
- (27) Wulff-Pérez, M., A. Torcello-Gómez, M.J. Gálvez-Ruiz & A. Martín-Rodríguez (2009) *Food Hydrocolloids.*, **23**: 1096-102.
- (28) Mehnert, W. & K. Mäder (2011) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**: 165-96.
- (29) Lallemand, F., P. Daull, S. Benita, R. Buggage & J.-S. Garrigue (2012) *J. Drug Deliv.*, **2012**: Article ID 604204, 16 pages.
- (30) Leonardi, A., C. Bucolo, G.L. Romano, C.B.M. Platania, F. Drago, G. Puglisi, R. Pignatello (2014) *Intern. J. Pharm.*, **470**: 113-40.
- (31) Gipson, I., P. Argüeso (2003) *Inter. Rev. Cytol.*, **231**: 1-49.
- (32) Choy, Y.B., J.-H. Park, M.R. Prausnitz (2008) *J. Phys. Chem. Solids*, **69**: 1533-6.
- (33) Saettone, M.F., B. Giannaccini, D. Monti (2001) *J. Toxicol.–Cut. & Ocular Toxicol.*, **20**: 183-201.
- (34) Bonferoni, M.C., G. Sandri, E. Gavini, S. Rossi, F. Ferrari, C. Caramella (2007) *J. Drug Deliv. Sci. Tech.*, **17**: 57-62.
- (35) Araújo, J., S. Nikolic, M.A. Egea, E.B. Souto, M.L. Garcia. (2011) *Colloids & Surf B: Biointerfaces*, **88**: 150-7.
- (36) Araújo, J., E. Gonzales-Mira, M.A. Egea, M.L. Garcia, E.B. Souto (2010) *Intern. J. Pharm.*, **393**: 168-76.

**CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS TERMOSENSÍVEIS DE
XILOGLUCANA PARA LIBERAÇÃO OCULAR DE TRIANCINOLONA ACETONIDA**

Polímeros sensíveis a estímulos vêm atraindo bastante interesse em diferentes campos de aplicação. No âmbito farmacêutico estes biomateriais vêm sendo empregados em diversas funções, desde engenharia de tecidos até sistemas de liberação de fármacos (BAJPAI et al., 2008; BAWA et al., 2009; HAN et al., 2013; MATANOVIČ; KRISTL; GRABNAR, 2014). Dentre estes, uma atenção especial vêm sendo dedicada ao emprego de polímeros para formação de hidrogéis termosensíveis para liberação de fármacos, particularmente à via de administração tópica ocular (ANUMOLU et al., 2009; KOPEČEK, 2007; MIYAZAKI et al., 2001). Polímeros que apresentem LCST inferior à temperatura fisiológica são de extremo interesse, especialmente por possibilitar a administração da forma farmacêutica no estado de solução, com formação do hidrogel devido influência da temperatura da superfície ocular. A administração de formas farmacêuticas líquidas tende a elevar a adesão ao tratamento devido a facilidade de auto-administração, e permite a aplicação de doses mais precisas, quando comparados aos géis pré-formados (ANUMOLU et al., 2009; KIM et al., 2014; PEPPAS et al., 2000).

Para o desenvolvimento deste trabalho foi selecionado o polímero xiloglucana, uma hemicelulose de origem vegetal que adquire caráter termosensível quando ao menos 35 % dos resíduos de galactose de sua cadeia lateral são removidos (NISBET et al., 2006; SHIRAKAWA; YAMATOYA; NISHINARI, 1998). Sendo assim, foi avaliada a cinética de degalactosilação da xiloglucana por ação da enzima β -galactosilase e seu impacto sobre a proporção dos oligossacarídeos que compõe a xiloglucana. Foi verificada a influência do grau de degalactosilação e da concentração do polímero em solução sobre a temperatura de transição sol-gel e o tempo necessário para que a formação do hidrogel ocorra na temperatura de 35 °C. Adicionalmente, foi avaliado o perfil e o mecanismo de liberação da triancinolona acetonida a partir dos hidrogéis preparados nas concentrações de 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 % (m/V) do polissacarídeo termosensível.

Este trabalho foi desenvolvido durante estágio sanduíche no Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales vinculado ao Centre National de la Recherche Scientifique (CERMAV-CNRS), na Université Grenoble-Alpes na cidade

de Grenoble, França, sob orientação do Dr. Redouane Borsali e Dr. Sami Halila.
Este artigo foi submetido ao *Journal of Controlled Release*.

Thermoresponsive Xyloglucan Hydrogel for Ophthalmic Triamcinolone Acetonide Delivery

SILVA, L. F. C.^{a,b*}; LEMOS-SENNA, E.^b; HALILA, S.^a; BORSALI, R.^a.

^a Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV-CNRS), Université Joseph Fourier (UJF), Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (ICMG-FR 2607 CNRS), Grenoble Cedex 9, France.

^b Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 88040-900, Florianópolis, Brazil.

*Contact e-mail: borsali@cermav.fr

Abstract

Xyloglucan is a polysaccharide widely distributed in the primary cell wall of dicotyledon plants. After partial galactose removal, xyloglucan aqueous dispersions are able to undergo a sol-to-gel transition by increasing the temperature, which may be an interesting property to deliver drugs into the eye. Thermosensitive degalactosylated-xyloglucan (Deg-XG) hydrogels could be administered as a liquid dosage form with an accurate and reproducible dose, and after gelling at eye temperature, it would allow enhancing the contact time of the drug with the ocular surface, increasing the ocular drug bioavailability. In this paper, we describe the degalactosylation kinetics of xyloglucan and evaluate the effect of the degalactosylation degree and the xyloglucan concentration on the phase-transition temperature and rheological properties of the gels. Hydrogels prepared from 50 % degalactosylated xyloglucan (Deg⁵⁰-XG) and concentration of 3 % (w/v) demonstrated to possess the best rheological properties and a suitable sol-to-gel transition temperature, being able to rapidly transit into a gel-like structure at eye temperature. Thermoresponsive Deg⁵⁰-XG hydrogels were able to release triamcinolone acetonida with a controlled or sustained release rate with strong dependence of polymer chain relaxation on drug Case-II transport mechanism. The overall results evidenced the interest of Deg⁵⁰-XG as a promising biomaterial for ocular drug delivery.

Keywords: Thermoresponsive hydrogel; Xyloglucan; Enzymatic degalactosylation; Ophthalmic drug delivery; Triamcinolone acetonide.

1. Introduction

Corticosteroids, similar to triamcinolone acetonide, are widely used in clinics as eye drop forms for treating different ocular inflammatory processes of the anterior segment of the eye [1]. Topical *versus* oral administration of corticosteroids is highly advantageous since it allows to reach therapeutic concentrations of the drug in the different eye tissues with smaller incidence of side effects [1,2]. However, the ocular bioavailability of topically administered drugs is strongly affected by precorneal factors and anatomical barriers [2,3]. Precorneal factors are those that lead to the removal of drugs from the precorneal area, affecting the drug permeation, including solution drainage, blinking, tear film, tear turnover and induced lacrimation [2,4]. In addition, the remaining drug on the ocular surface will face various cellular layers of the cornea, which limits the entry of exogenous substances into the eye to reach the anterior chamber [2.5.6].

Different strategies have been proposed to overcome the drawbacks of topical ophthalmic drug administration, including the increment of the contact time of the dosage form onto the eye's surface by employing highly viscous solutions, gels or ointments [2,4,7]. Hydrogels are three-dimensional cross-linked networks of water-soluble polymers, known to enhance precorneal residence time of drugs and to decrease the lachrymal drainage effect [2]. Interestingly, hydrogel formation can be mediated by physiological external stimuli, such as changes in pH, temperature, ionic strength, presence of chelating species, and others [8,9]. Among them, the use of thermally sensitive *in situ* forming hydrogels [10] is of great interest due to the possibility of delivering the drug formulation as a liquid form that undergoes a sol-to-gel transition with the temperature change. This approach facilitates administration of the drug formulation with a more accurate and reproducible dose than those provided by administration of preformed hydrogels [7,11,12].

Several natural polymers have been shown to exhibit gelation upon temperature change. Xyloglucan from tamarind seeds (XG), when partially degalactosylated, is

undoubtedly a fascinating gelling biosourced material since sol–gel transition temperature can be finely tuned with the degree of galactose removal [13]. The structure of XG is characterized by the repetition of different building blocks of heptasaccharide (XXXG), octasaccharide (XXLG/XLXG) and nonasaccharide (XLLG) oligomers, which differ in number of galactose side chains [14] (Scheme 1). It is a neutral hemicellulosic polysaccharide (around 700 kDa) that is abundant, biocompatible, biodegradable and exhibits mucoadhesive properties. Thermoresponsive xyloglucan hydrogels have been described as drug vehicles for different pharmaceutical applications, such as for the oral delivery of indomethacin [15] and acetaminophen [16], percutaneous delivery of ketoprofen [17], and ocular delivery of pilocarpine chloride [18].

This study relates the use of thermoresponsive xyloglucan hydrogel as ocular triamcinolone acetonide delivery matrix. In addition to that main goal, we describe a detailed and comprehensive study on the enzymatic preparation of Deg-XG and the rheological behavior as a function of the degree of degalactosylation, temperature, and polymer concentration. Moreover, we evaluate the *in vitro* triamcinolone acetonide release profile depending on Deg-XG hydrogel concentrations.

2. Materials and Methods

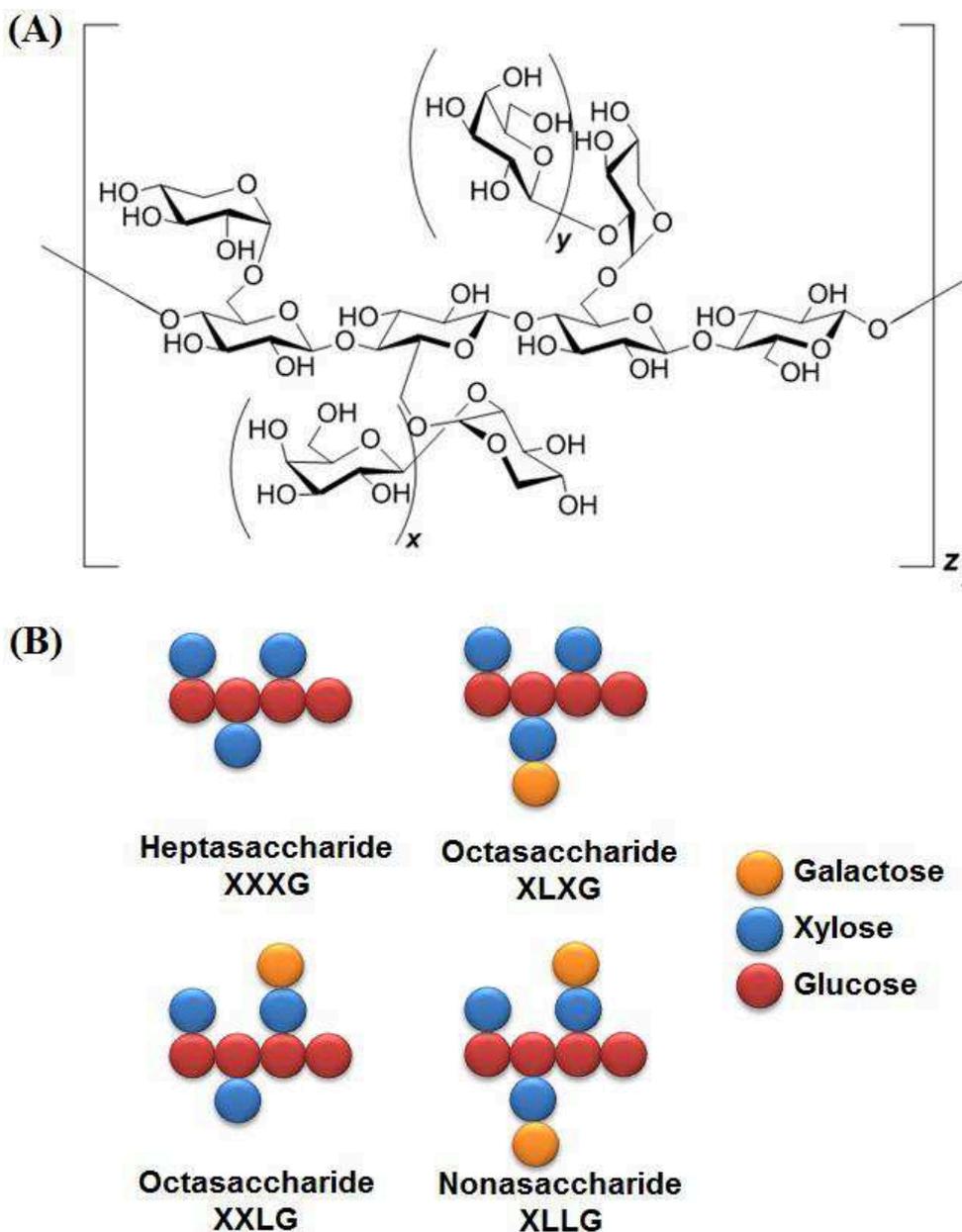
2.1 Materials

Triamcinolone acetonide was purchased from Pharma Nostra (Brazil), β -galactosidase from *A. oryzae*, and cellulase enzyme from *A. niger* were purchased from Sigma Aldrich (France), and tamarind kernel powder (TKP) was kindly offered by Megazyme (Ireland). All grade reagents were purchased from Sigma Aldrich.

2.2 Purification and characterization of xyloglucan

A 1.0 % (w/v) TKP water solution was heated at 80 °C for 1 hour under magnetic stirring. After cooling, the polymer solution was centrifuged at 8,000 \times g for 20 min and the supernatant was filtered, and XG precipitated by adding ethanol. The gelatinous precipitate was collected after centrifugation at 8,000 \times g for 20 min and dried in a vacuum oven at 60 °C.

Scheme 1 – Schematic representation of: (A) xyloglucan structure; and (B) different oligosaccharide building blocks.



2.3 Determination of monosaccharide and oligosaccharide composition

Monosaccharide composition of purified XG was quantified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using the alditol acetate method [19], after total polysaccharide hydrolysis with 1 N trifluoroacetic acid for 4 hours at 110 °C. Samples were analyzed in a 6850 Network GC System equipped with a 5975C VL MSD mass spectrometry triple-axis detector (Agilent Technology, USA). 1 μ L of each sample

was injected into a SP2380 capillary column (Supelco, USA) (30 m x 0.25 mm d.i. x 0.2 μm) and carried by helium gas at a flow rate of 1.1 mL.min⁻¹. The initial column temperature was maintained at 150 °C for 2 min, ramped up to 240 °C at 3.0 °C.min⁻¹, and then held for 5 min. All the analysis was performed in triplicate, and the result was expressed in molar ratio of each monosaccharide.

To determine the oligosaccharide composition, XG was incubated at 37 °C in 50 mM ammonium acetate buffer, pH 5.0 with β -(1,4)-glucanase (cellulase enzyme from *Trichoderma reesei*) for 24 hours. After enzyme thermal inactivation, the resulting solutions were filtered through filter paper and thereafter through 0.45 μm cellulose acetate syringe filters [20]. The samples were freeze-dried and analyzed using a high-performance anion-exchange chromatography method (HPAE) in a Dionex DX300 Carbohydrate Analysis System with CarboPac PA-1 analytical (4x250 mm²) and semi-preparative (9x250 mm²) columns [21]. Peaks were detected with a pulsed amperometric detector (PAD) equipped with a gold working electrode with pulse potentials (E_1 – E_3) and durations (t_1 – t_3) of $E_1 = 0.05$ V ($t_1=360$ ms); $E_2 = 0.80$ V ($t_2=120$ ms); and $E_3 = -0.60$ V ($t_3=420$ ms). Samples were eluted at 1 mL.min⁻¹ at 1500 – 1700 psi with 100 mM NaOH+50 mM NaOAc (0 – 5 min) followed by a gradient to 100 mM NaOH+100 mM NaOAc (5 – 20 min gradient). After each injection, the column was re-equilibrated in 100 mM NaOH+50 mM NaOAc [22].

2.4 Enzymatic degalactosylation of xyloglucan

The partial hydrolysis of galactose side-chain from XG was performed by an enzymatic process and adapted from the literature [8,13] Thus, a 2.0 % (w/v) XG solution in 50 mM acetate buffer pH 4.5 was incubated with 7.4 U.mL⁻¹ of β -galactosidase enzyme from *Aspergillus oryzae* at 50 °C. At the end, all samples were heated up to 90 °C for 20 minutes to inactivate the enzyme, filtered after cooling, and precipitated by adding ethanol. The gelatinous degalactosylated xyloglucan (Deg-XG) precipitates were dried in a vacuum oven, overnight, at 60 °C. The enzymatic degalactosylation kinetic was evaluated using the alditol acetate method by GC-MS, as previously mentioned, in order to determine the effect of the reaction time on the

galactose removal ratio (GRR%). GRR% was then calculated in function of the remained galactose amount after enzymatic degalactosylation, following Eq. (1).

$$GRR\% = \left[\frac{(Gal_{XG} - Gal_{Deg-XG})}{Gal_{XG}} \right] \times 100 \quad (1)$$

where Gal_{Deg-XG} and Gal_{XG} are the galactose amount on degalactosylated and native xyloglucan, respectively.

The changes in the oligosaccharides constitution during the degalactosylation enzymatic reaction of XG was also followed by withdrawing an aliquot of the reaction, and then cellulase-mediated depolymerization to provide oligosaccharides, as previously described. Oligosaccharides were quantified by HPLC-HPAE and plotted as percentage content of XXXG, XLG/XLXG and XLLG over degalactosylation reaction time.

2.5 Rheological evaluation of thermoresponsive xyloglucan hydrogels

The rheological behavior of the aqueous solution of degalactosylated xyloglucan at concentrations of 3.0, 2.5, 2.0 and 1.5 % (w/v) were investigated in order to assess the influence of polysaccharide concentration on the cloud point and the sol-to-gel transition time at 35 °C. The temperature and a time sweep rheological analysis were carried out in a TA AR2000 rheometer (TA Instruments Ltd, UK) with a cone-plate configuration using a 40 mm/4 ° stainless steel cone, and a solvent trap covering the geometry to prevent evaporation. For the temperature sweep analysis, the samples were heated from 10 to 50 °C at a heating rate of 0.5 °C.min⁻¹, and immediately cooled until 10 °C at a 0.5 °C.min⁻¹ cooling rate. All analyzes were carried out in a linear viscoelastic regime (LVR) with 1.0 Hz of frequency and 1.0 % of strain. Changes in storage and viscous moduli were assessed, and the cloud point was determined as the temperature on the crossing over point of G' and G'' curves [8,10]. The time sweep measurement determined the time required to the sol-to-gel transition at a constant temperature (isothermal) regime. In this assay, all measurements were carried out at 35 °C (mean temperature on the ocular surface), and the time of transition was settled at the crossing over point of the dynamic moduli

logarithmic curves. All samples were analyzed on the same LVR as described above [10].

2.6 *In vitro* triamcinolone acetonide release profile

TA-loaded thermoresponsive hydrogels were prepared by adding the drug at concentration of 1 mg.mL⁻¹ in aqueous dispersions of Deg-XG at concentrations of 3.0, 2.5, 2.0 and 1.5 % (w/v). An aliquot of 3.0 mL of each formulation was placed into a sample holder, which was covered with a 0.22 µm cellulose ester membrane. *In vitro* release studies were carried out in a USP dissolution apparatus IV flow-through-cell (Erweka, Germany) at a flow rate of 8 mL.min⁻¹ using Simulated Lachrymal Fluid at pH 7.4 with sodium laurylsulphate 0.5 % (w/v) as release medium. The release medium was maintained at 35 °C in a closed system setting. Aliquots of the release medium were withdrawn at predetermined time intervals, and the volume was replaced with fresh dissolution medium to keep *sink* conditions. The released drug was determined by a HPLC-RP method using a PerkinElmer Series 200 (PerkinElmer, USA) chromatograph with a Luna C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm; Phenomenex®, USA) column. Mobile phase consisted of acetonitrile and water (60:40, v/v), and was isocratically eluted to a flow rate of 1.0 mL.min⁻¹. The injection volume was 20 µL and detection was achieved at 240 nm. All experiments were carried out in six replicates ($n = 6$), and the mean amounts of TA release (%) were plotted over time (h).

The HPLC-RP method was validated according to the ICH Q2(R1) guideline [23], by means of linearity, accuracy, precision parameters, and determination of the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). The method was linear over the range of 0.10 to 1.00 µg.mL⁻¹ ($r = 0.9996$), with a regression equation of mean calibration graph ($n = 3$) equal to $y = 103722x - 3620$. Linearity was confirmed by the variance analysis (ANOVA) as $F_{calculated} > F_{critical}$ ($\alpha = 0.05$), while homoscedasticity was confirmed by Cochran's C test ($C_{calculated} < C_{critical}$, $\alpha = 0.05$). LOD and LOQ were 0.02 and 0.07 µg.mL⁻¹, respectively, indicating enough sensitivity to use the method to determine TA content in the dissolution medium. The recovery values ranged from 99.5 to 100.6 % satisfying the acceptance criteria for accuracy parameter. The intra-

and inter-day relative standard deviation values were lower than 4 %, indicating an acceptable variability of the TA content determination ($\alpha = 0.05$).

The release profiles were compared after calculating the dissolution efficiency (DE%) as described in Eq. (2). The area under curve (AUC) of the release profile was determined by the minimum square method using the following equation:

$$DE\% = \frac{AUC}{A_{100}} \times 100 \quad (2)$$

where the AUC of the release profile and A_{100} correspond to the rectangle area calculated considering 100 % of the drug release over the same time period.

The mechanism of TA release from thermoresponsive Deg⁵⁰-XG hydrogel was evaluated by fitting the release experimental data to zero-order equation, first-order equation, Higuchi model, Korsmeyer-Peppas equation, and Fickian controlled diffusion model, using Eq. (3-7), respectively [24,25]:

$$f_t = K_0 t \quad (3)$$

$$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2.303} \quad (4)$$

$$f_t = K_H \sqrt{t} \quad (5)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_{KP} t^n \quad (6)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left(\frac{8}{\pi^2}\right) e^{-\frac{\pi^2 D t}{h^2}} \quad (7)$$

where f_t is the fraction of the drug released at time t ; M_t is the amount of the drug released at time t ; M_∞ is the absolute cumulative amount of the drug released at infinite time; K_0 , K_1 and K_H are the zero-order, first-order and Higuchi release constants, respectively, and K_{KP} is the release constant incorporating structural and geometric characteristics of the drug dosage form. Release exponent n characterizes the different mechanisms for dosage forms in a cylindrical shape where: $n = 0.45$ corresponds to Fickian diffusion release; $0.45 < n < 0.89$ to an anomalous transport; and $n \geq 0.89$ to a Super Case II transport or polymer swelling model. D is the diffusion coefficient of the drug within the polymer matrix, and h is the thickness of the device [24,26].

2.7 Statistical analysis

The differences in the data averages were compared by analysis of variance (ANOVA), and independent or paired sample t -test. The significance of the difference was determined at 95 % confidence limit ($\alpha = 0.05$).

3. Results and discussion

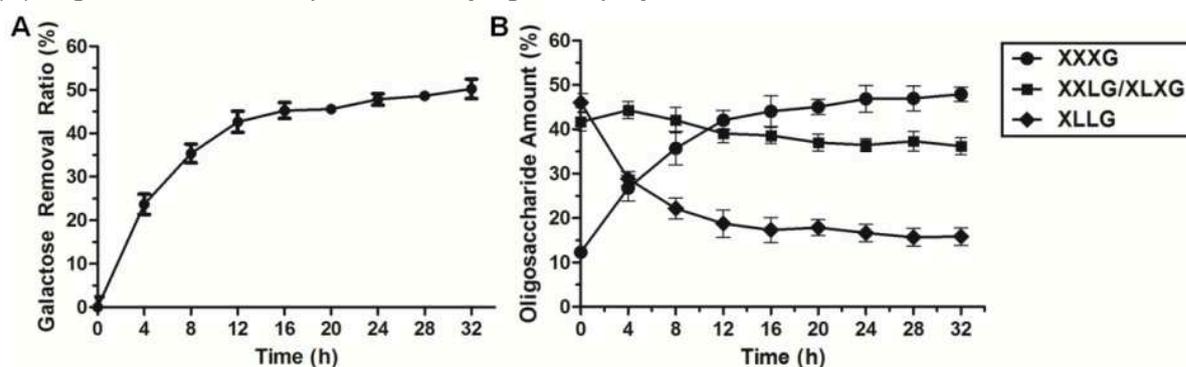
According to the literature, thermoreversible XG with sol-to-gel transitions may be obtained after enzymatic hydrolysis of the galactose-constituting side-chains from 35 % of degalactosylation rate [10,13]. In order to fine-tune the temperature of the sol-to-gel transition, which is closely dependent on the environmental conditions as polymer concentration, presence of electrolytes and organic compounds, pH, and others, it is of first importance to control the degree of degalactosylation and to evaluate the impact on the sol-to-gel transition temperature.

3.1 Enzyme kinetics of degalactosylation

First, monosaccharide composition of XG was performed by GC-MS, revealing the presence of glucose, xylose, and galactose at a 4.09:3.00:1.56 molar ratio. The absence of other monosaccharides, such as fucose or arabinose, is in perfect agreement with literature data [14,27].

The kinetic follow-up of degalactosylation of 2.0 % (w/v) XG dissolved into acetate buffer (50 mM, pH 4.5) was performed by incubating *Aspergillus oryzae* galactosidase (7.4 U.mL⁻¹). As can be seen in Fig. 1A, the removal of galactose residue is relatively rapid during the first 12 hours, reaching around 42 % of galactose removal ratio (GRR) (Fig. 1B). Then, a slower GRR rate is observed until 32 h where up to 50 % of galactose were cut out.

Figure 1 – Kinetics of degalactosylation of XG expressed as (A) galactose removal ratio and (B) oligosaccharide composition of xyloglucan polysaccharide over time.



As already mentioned, the oligosaccharide composition of the xyloglucan polysaccharide can be classified in function of the number of monosaccharides in repeating building blocks as XLLG, XXLG, XLXG, and XXXG [28]. It appears that β -galactosidase acts on galactose sites of XLLG yielding to XXLG/XLXG, which is simultaneously converted into XXXG (Fig. 1B). After the twelfth hour, the reaction was slowed down, showing slight changes in the oligosaccharide composition. According to previous reports demonstrating that XLLG regions exhibit a flat spin conformation, while XXLG/XLXG and XXXG regions are rather slightly twisted [29], we reckon that galactose accessibility is more favorable for XLLG domains than for XXLG/XLXG. Moreover, considering the increase of hydrophobic pockets with the loss of galactose side chains, the aggregation phenomenon prevents the progress of enzymatic degalactosylation [8,30,31].

3.2 Rheological evaluation of thermoresponsive xyloglucan hydrogels

To evaluate the influence of GRR% on the sol-to-gel temperature transition, 3.0 % (w/v) water solutions of XG and Deg-XG samples with 47, 48 and 50 % GRR (Fig. 2) were prepared. As expected, XG showed a rheological profile relative to a viscous solution without changing the physical state in the whole range of the tested temperatures (Fig. 2A) [31,32], with complete overlapping of heating and cooling curves. On the other hand, galactose removal from xyloglucan induces a thermoreversible property in the solution (Fig. 2B-D) [13]. It can be evidenced by the slight changes in the viscous modulus or loss modulus (G''), while elastic modulus or storage modulus (G') showed an initial small decrease with a sudden increase, crossing over the viscous modulus curve at the sol-to-gel transition temperature and reaching a plateau close to 45 °C.

When G' equals G'' ($\tan \delta = 1$), the sample undergoes a phase transition, changing from a viscous to an elastic property. Thus, the point where the dynamic moduli curves cross over is related to gelation temperature of the sample [8,10]. In this study, it was observed that the temperature transition is inversely proportional to GRR, being 28.8 ± 0.3 , 25.9 ± 0.4 , and 24.7 ± 0.1 °C for Deg-XG with GRR of 47, 48 and 50 %, respectively. As reported elsewhere [8,10,31], enhancing GRR% decreases the galactose hindrance effect on xyloglucan polysaccharide, exposing the hydrophobic moieties and consequently leading to a decrease of sol-to-gel temperature transitions. It is worthy of note that even with a slight difference of GRR%, the temperature of transition was significantly shifted, and highlighted the importance to control the enzymatic degalactosylation rate. For extensive studies, a 50 % GRR Deg-XG (Deg⁵⁰-XG) was chosen due to the lower transition temperature and higher storage moduli, being able to transit faster into a gel-like structure at body temperature, increasing the residence time of the dosage form on the ocular surface, and consequently enhancing the drug bioavailability.

Degalactosylated xyloglucan showed a concentration-dependence on rheological profile. Fig. 3 displays a temperature sweep analysis of Deg⁵⁰-XG at different

concentrations, and evidenced that a 1.5% (w/v) aqueous solution of Deg⁵⁰-XG underwent the sol-to-gel phase at 36.4 ± 0.7 °C, while for 2.0, 2.5 and 3.0 % (w/v) Deg⁵⁰-XG aqueous solutions, the observed transitions were at 26.4 ± 0.5 , 26.8 ± 0.2 , and 24.7 ± 0.1 °C, respectively. Enhancing Deg⁵⁰-XG concentration in solution may provoke an increment in the probability of interchain interactions inducing to an early phase separation [10,34]. This phenomenon influenced the dynamic moduli of viscoelastic Deg⁵⁰-XG solutions since an increase of the final and initial storage behavior (G') was observed. Elastic systems were obtained faster with higher concentration of Deg⁵⁰-XG, while loss moduli (G'') values were increased.

Figure 2 – Temperature sweep rheological analysis of a 3.0 % (w/v) aqueous solution of: (A) XG; (B) 47 % GRR Deg-XG; (C) 48 % GRR Deg-XG; and (D) 50 % GRR Deg-XG, where (—) G' on heating step; (—) G'' on heating step; (—) G' on cooling step; and (—) G'' on cooling step.

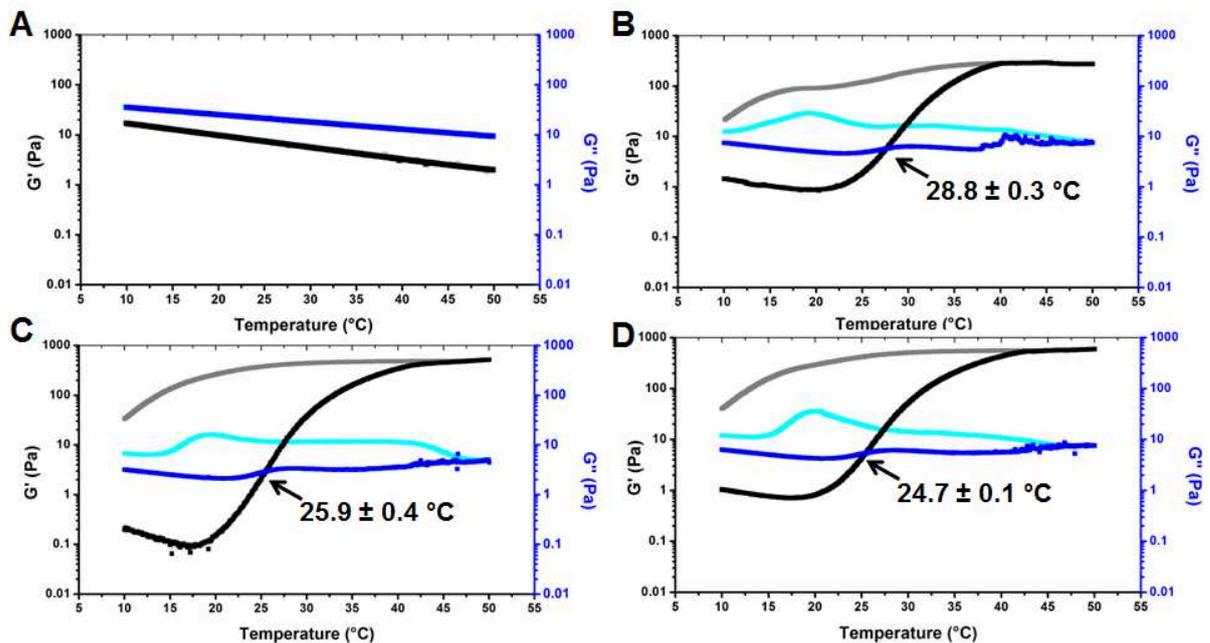
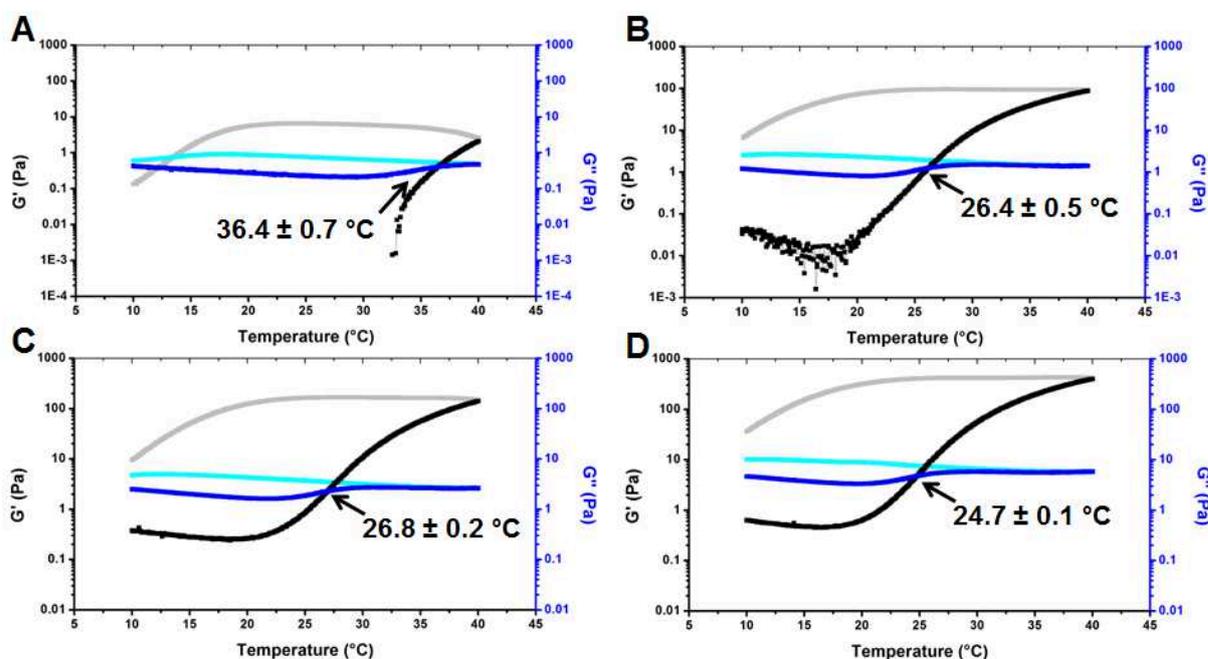


Figure 3 – Temperature sweep rheological analysis of: (A) 1.5% (w/v) Deg⁵⁰-XG; (B) 2.0% (w/v) Deg⁵⁰-XG; (C) 2.5% (w/v) Deg⁵⁰-XG; and (D) 3.0% (w/v) Deg⁵⁰-XG, where (—) G' on heating step; (—) G'' on heating step; (—) G' on cooling step; and (—) G'' on cooling step.



The thermal hysteresis observed in Fig. 2 and 3 is often related to aggregation of rigid polymer chains and the existence of some associated aggregates or weak connections. These differences between heating and cooling dynamic moduli curves may occur due to the kinetics of association and dissociation of Deg⁵⁰-XG chains [8,35,36]. Hysteresis could be interesting because it can enhance the ability of the thermoresponsive hydrogel to maintain its integrity, after reaching the gel-like structure, even at temperatures below the LCST, preserving the capability to increase the drug residence time on the ocular surface. No thermal hysteresis could be observed in XG (Fig. 2A), evidencing the lack of aggregate interactions, indicating that the galactose moieties removal from XG may reduce polysaccharide hydrophilicity, promoting the aggregation of polymer chains [8,29,37]. Following the Fig. 3, rising the Deg⁵⁰-XG concentration should lead to a narrower hysteresis, promoted by a greater number of interchain aggregate interactions. However, this

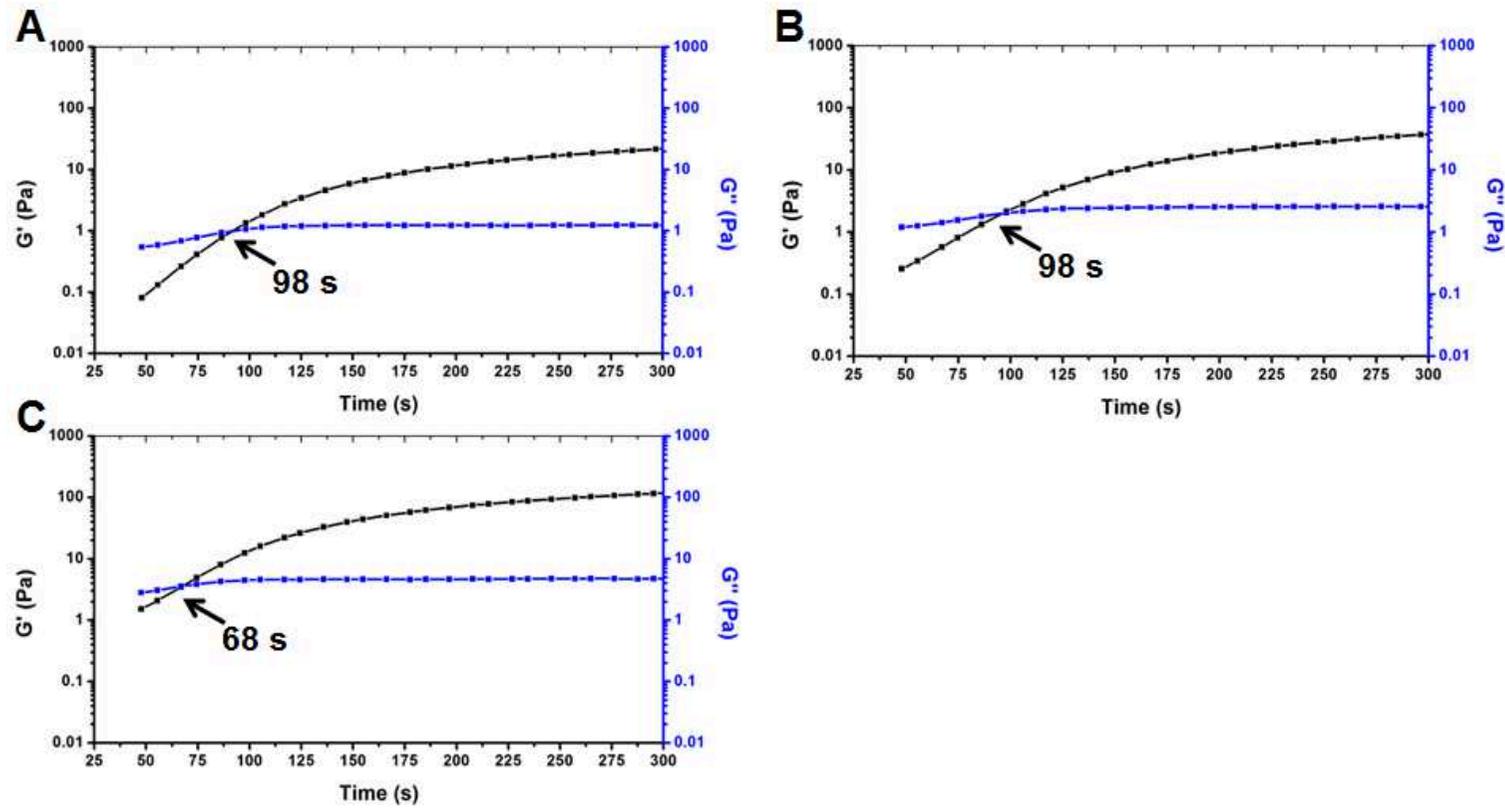
hysteresis was not evidenced in Fig. 3 because lower Deg⁵⁰-XG concentrations induces to smaller elastic moduli, leading to a misunderstanding of this phenomenon. Once instilled on the eye, the drug residence time in ophtalmic drop solutions is estimated around 1-2 minutes in the tear film [38]. It means that the gelation time should be as short as possible in order minimize the loss of drug by precorneal effects and to enhance the bioavailability. In this study, Deg⁵⁰-XG water solutions were heated to 35 °C, which corresponds to the ocular surface temperature, and the dynamic moduli were evaluated over time. Aqueous solutions prepared at 2.0 and 2.5 % (w/v) of Deg⁵⁰-XG and incubated at 35 °C crossed the G' curve over the G'' curve at 98 seconds, while with 3.0 % (w/v) Deg⁵⁰-XG solution, the gelation time was reduced to 68 s. The increase of polysaccharide concentration to 3.0 % (w/v) tends to decrease the required time for the sol-to-gel transition, making the system more suitable for ocular drug delivery application.

According to our studies, it seems that 3.0 % (w/v) Deg⁵⁰-XG water solution combines the best gelation properties, as phase transition at suitable temperature and a short time of gelation. These conditions could be used to evaluate the Deg⁵⁰-Xg as a drug delivery system, like triamcinolone acetonide, on the topical ophthalmic pathway.

3.3 *In vitro* triamcinolone acetonide (TA) release profile

In order to evaluate the influence of Deg⁵⁰-XG concentration on the TA release rate, thermoresponsive hydrogels containing 1.0 mg.mL⁻¹ TA were prepared at Deg⁵⁰-XG concentrations of 1.5 %, 2.0 %, 2.5 % and 3.0 % (w/v). Aliquots were withdrawn periodically and the amount of TA released was quantified to plot the cumulative drug release over time. The TA release profiles are demonstrated in Fig. 5, and the dissolution efficiency values estimated as described in 2.6, Eq. (2), the release rate constants and its respective correlation coefficients (R^2) obtained after fitting these kinetic models, Eq. (3-7) are listed in Table 1. Dissolution efficiency was calculated, as described in Eq. (2), to compare the ability of each thermoresponsive hydrogel to release TA from polymeric matrix [39]. As can be seen, TA was completely released after 6 h of experiment from all Deg⁵⁰-XG hydrogels; however, DE values were dependent on the polysaccharide concentration.

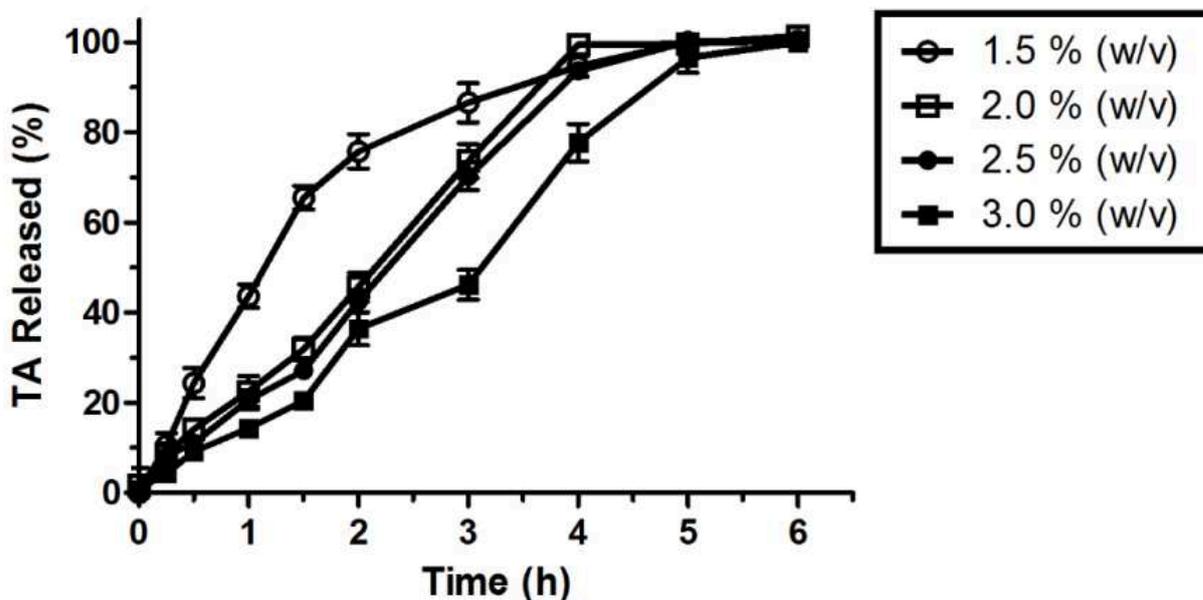
Figure 4 – Time sweep rheological analysis at 35 °C of: (A) 2.0 % (w/v) Deg⁵⁰-XG; (B) 2.5 % (w/v) Deg⁵⁰-XG; and (C) 3.0 % (w/v) Deg⁵⁰-XG, where (—) G' on heating step; (—) G'' on heating step.



The hydrogel prepared with the lower Deg⁵⁰-XG concentration led to a faster release rate of TA ($p < 0.05$), and the increase in the polysaccharide concentration caused the release rate slow. However, no statistical difference was found when hydrogels prepared at Deg⁵⁰-XG concentrations of 2.0 and 2.5 % (w/v) were tested.

There are few studies available concerning the release of drugs from thermoresponsive hydrogels for ophthalmic delivery. Miyazaki and co-workers [18] investigated the release of the pilocarpine hydrochloride at 34 °C using Deg⁴⁴-XG thermoresponsive hydrogels, and observed that there was no difference in the drug release rate when hydrogels prepared at polysaccharide concentration of a 1.0, 1.5 and 2.0 % (w/v) were compared. In contrast, our study revealed that there is influence of Deg⁵⁰-XG concentration on the TA release. However, the effect of the degalactosylation of the xyloglucan on the hydrogel properties and consequently on the drug release cannot be excluded.

Figure 5. Triamcinolone acetonide release profile obtained from (—○—) 1.5 %, (—□—) 2.0 %, (—●—) 2.5 %, and (—■—) 3.0 % (w/v) Deg⁵⁰-XG thermoresponsive hydrogel.



Hydrogel-based devices can be submitted to the swelling-controlled or to the non-swelling controlled drug delivery. In the first case, a polymer network comes in contact with an aqueous solution, and the thermodynamic compatibility of the polymer chains and water causes the polymer to swell, allowing water to penetrate inside the hydrogel structure [25]. The drug trapped into the hydrogel dissolves in

water and diffuses out of the network, characterizing a Fickian diffusion mechanism. On the other hand, the driving force of non-swelling controlled systems is the very slow relaxation rate of the polymer in comparison to the water transport inside the hydrogel, where a Case II transport mechanism can be observed [30]. However, in many swelling-controlled delivery systems, an anomalous transport mechanism has been observed, characterized by an intermediate Fickian diffusion and Case II transport [25,40]. According to correlation coefficient values of the TA release rate from Deg⁵⁰-XG hydrogels at different polymer concentrations, it can be evidenced that 1.5 % (w/v) Deg⁵⁰-XG hydrogels releases TA in a combination of Fickian diffusion and Case II transport, probably due to slow relaxation of polymer chains. The most diluted thermoresponsive hydrogel fitted the Higuchi's and Fickian controlled diffusion models ($R^2 > 0.99$) while fitted, properly, the Zero-order and Korsmeyer-Peppas model ($R^2 > 0.99$) with an exponent coefficient (n) of 0.9498, characteristic of a Super Case-II transport. Since the elastic moduli, and consequently the hydrogel strength, of 1.5 % (w/v) Deg⁵⁰-XG hydrogel are weaker, there is less resistance to water penetration into the hydrogel structure, promoting TA diffusion through the polymer chains. By increasing the Deg⁵⁰-XG concentration to 2.0 % (w/v), a decrease can be observed on release constants (K_0 , K_H , and K_{KP}) with a Zero-order and Korsmeyer-Peppas models with $R^2 > 0.99$, and n indicative of anomalous transport [40]. The same phenomenon can be observed on 2.5 % (w/v) concentration, and both dosage forms show a shift from a Fickian diffusion mechanism, due to a decrease on R^2 of Higuchi's model, to a concentration-dependence on the TA release rate by an increase on the First-order model correlation coefficient [25]. Enhancing elastic dynamic moduli by increasing polymer concentration seems to decrease water penetration into the hydrogel matrix, minimizing the diffusional kinetics on TA delivery. The 3.0 % (w/v) Deg⁵⁰-XG hydrogel tends to release TA in a Super Case-II transport rate by fitting in the Korsmeyer-Peppas kinetic model ($R^2 > 0.98$) with an n value of 0.9933. The decrease of K_{KP} value while the polymer concentration increases indicates that the slow relaxation of polysaccharide chains tends to enhance the controlled release rate of Deg⁵⁰-XG hydrogel [26].

This result is linked with the increase on the G' value, which indicated that more cohesive hydrogels are formed due to an increment in the interactions of the Deg⁵⁰-XG aggregates, inducing phase separation. In this case, the strength of the hydrogel network is enhanced, modifying the drug release rate by a decrease in the diffusion capability of TA through the interchain aggregates of the polysaccharide, as observed in the diffusional coefficient (D) calculated by fitting the Fickian controlled diffusion, and a decrease in the K_H and correlation coefficient from Higuchi's model [41,42]. Herewith, the reduced drug diffusion may be related to increasing hydrophobic drug interactions with hydrophobic polymer aggregates. Once the Deg⁵⁰-XG increased, higher amounts of hydrophobic zones are able to interact with triamcinolone acetonide, reducing the drug diffusion through polymer matrix.

Table 1. Dissolution efficiency values (DE %) and kinetic parameters obtained from TA release profile from Deg⁵⁰-XG hydrogel.

Deg ⁵⁰ -XG concentration (%)	Mean DE % ± SD*	Zero-order K_0 (h ⁻¹) (R ²)	First-order K_1 (h ⁻¹) (R ²)	Higuchi K_H (h ^{-1/2}) (R ²)	Korsmeyer–Peppas		Fickian controlled diffusion D (h.mm ⁻²) (R ²)
					K_{KP} (h ⁻ⁿ) (R ²)	n	
1.5	75.74 ± 1.35 ^a	0.4290 (0.9971)	1.0545 (0.8763)	0.7296 (0.9946)	0.4258 (0.9904)	0.9498	3.630 (0.9959)
2.0	65.40 ± 0.61 ^b	0.2043 (0.9906)	0.9045 (0.9670)	0.3855 (0.9571)	0.2428 (0.9986)	0.7753	1.465 (0.9660)
2.5	63.29 ± 1.42 ^b	0.1902 (0.9748)	0.9296 (0.9808)	0.3576 (0.9301)	0.2145 (0.9705)	0.7835	2.156 (0.9313)
3.0	53.31 ± 1.64 ^c	0.1680 (0.9428)	1.0885 (0.9511)	0.3139 (0.8882)	0.1658 (0.9809)	0.9933	1.072 (0.9655)

*SD stands for standard deviation

^{a,b,c} means statistical difference by ($\alpha = 0.05$).

4. Conclusion

In the present study, thermosensitive degalactosylated xyloglucan hydrogels were prepared regarding the ocular delivery of triamcinolone acetonide. Firstly, the degalactosylation kinetics was evaluated and it was observed that the β -galactosidase enzyme preferentially remove galactose units from nonasaccharide moieties of xyloglucan, leading to a sudden increase of heptasaccharide moieties in the polysaccharide molecule. Also, the sol-to-gel transition temperature was dependent on both degree of galactose removal and concentration of xyloglucan to form the hydrogel. Hydrogels prepared from xyloglucan with degalactosylation degree of 50 % and concentration of 3 % (w/v) demonstrated to possess the highest dynamic modulus, lowest sol-to-gel transition temperature. The TA release rate was slowed down with the increase of the degalactosylated xyloglucan concentration, probably due to the enhancement in the interchain aggregation of polysaccharide. In light of the above, we have demonstrated that degalactosylated xyloglucan constitutes a promising biomaterial to obtain thermoresponsive hydrogels, which, in turn, would allow increasing the residence time of the dosage form onto the ocular surface, and therefore the ocular drug bioavailability. Further studies are ongoing in order to evaluate the potential of *in situ* gelling thermoresponsive degalactosylated xyloglucans as sustained ophthalmic drug delivery systems.

Acknowledgement

The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil), the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq, Brazil), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France), and the Institut Carnot Polynat (France) for the financial support. The authors gratefully acknowledge Claire Boisset and Laurine Buon for their help with the structural composition of the xyloglucan oligosaccharides analysis.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

REFERENCES

- [1] E.T. Cunningham Junior, J.D. Wender, Practical approach to the use of corticosteroids in patients with uveitis, *Can. J. Ophthalmol.* 45 (2010) 352-8.
- [2] R. Gaudana, H.K. Ananthula, A. Parenky, A.K. Miltra, Ocular drug delivery, *Am. Assoc. Pharm. Sci. J.* 12 (2010) 348-60.
- [3] S. Gunda, S; Hariharan, N. Mandava, A.K. Mitra, Barriers in ocular drug delivery, in: J. Tombran-Tink, C.J. Barnstable, *Ocular transporters in ophthalmic diseases and drug delivery*, Humana Press, New Jersey, USA, 2008, pp. 399 – 413.
- [4] M. Ruponen, A. Urtti, Undefined role of mucus as a barrier in ocular drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 96 (2015) 442-6.
- [5] J. Barar, A.R. Javadzadeh, Y. Omid, Ocular novel drug delivery: impacts of membranes and barriers, *Expert Opin. Drug Deliv.* 5 (2008) 567-81.
- [6] E. Mannermaa, K.-S. Vellonen, A. Urtti, Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: Emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 1136-63.
- [7] Y.C. Kim, B. Chiang, X. Wu, M.R. Prausnitz, Ocular delivery of macromolecules, *J. Control. Release.* 190 (2014) 172-81.
- [8] A.K.A.S. Brun-Graeppi, C. Richard, M. Bessodes, D. Scherman, T. Narita, G. Ducouret, O.-W. Merten, Study on the sol-gel transition of xyloglucan hydrogels, *Carbohydr. Polym.* 80 (2010) 555-62.
- [9] J. Kopeček, Hydrogel biomaterials: A smart future?. *Biomater.* 28 (2007) 5185-92.
- [10] D.R. Nisbet, K.E. Crompton, S.D. Hamilton, S. Shirakawa, R.J. Prankerd, D.I. Finkelstein, M.K. Horne, J.S. Forsythe, Morphology and gelation of thermosensitive xyloglucan hydrogels. *Biophys. Chem.* 121 (2006) 14-20.
- [11] S. Anumolu, Y. Singh, D. Gao, S. Stein, J. Sinko, Design and evaluation of novel fast forming pilocarpine-loaded ocular hydrogel for sustained pharmacological response, *J. Control. Release.* 137 (2009) 152-159.
- [12] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 27-46.
- [13] M. Shirakawa, K. Yamatoya, K. Nishinari, Tailoring of xyloglucan properties using an enzyme, *Food Hydrocol.* 12 (1998) 25-8.

- [14] W.S. York, H. van Halbeek, A.G. Darvill, P. Albersheim, Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by ^1H -n.m.r. spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry, *Carbohydr. Res.* 200 (1990) 9-31.
- [15] N. Kawasaki, R. Ohkura, S. Miyazaki, Y. Uno, S. Sugimoto, D. Attwood, Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for oral drug delivery, *Intern. J. Pharm.* 181 (1999) 227-34.
- [16] S. Miyazaki, K. Endo, N. Kawasaki, W. Kubo, H. Watanabe, D. Attwood, Oral sustained delivery of paracetamol from *in situ* gelling xyloglucan formulations, *Drug Develop. Ind. Pharm.* 20 (2003) 113-39.
- [17] A. Takahashi, S. Suzuki, N. Nawasaki, W. Kubo, S. Miyazaki, R. Loebenberg, J. Bachynsky, D. Attwood, Percutaneous absorption of non-steroidal anti-inflammatory drugs from *in situ* gelling xyloglucan formulations in rats, *Intern. J. Pharm.* 246 (2002) 179-86.
- [18] S. Miyazaki, S. Suzuki, N. Kawasaki, K. Endo, A. Takahashi, D. Attwood, *In situ* gelling xyloglucan formulations for sustained release ocular delivery of pilocarpine hydrochloride, *Intern. J. Pharm.* 229 (2001) 29-36.
- [19] M.J. Peña, S.T. Tuomivaara, B.R. Urbanowicz, M.A. O'Neill, W.S. York, Chapter seven – Methods for structural characterization of the products of cellulose- and xyloglucan-hydrolyzing enzymes, in: H.J. Gilbert, *Methods in Enzymology: Cellulase* (510), Elsevier, San Diego, USA, 2012, pp. 121-39.
- [20] J.J. Kochumalayil, Q. Zhou, W. Kasai, L.A. Berglund, Regioselective modification of a xyloglucan hemicellulose for high-performance biopolymer barrier films. *Carbohydr. Polym.* 93 (2013) 466-72.
- [21] M.R. Hardy, R.R. Townsend, Y.C. Lee, Monosaccharide analysis of glycoconjugates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *Anal. Biochem.* 170 (1988) 54-62.
- [22] M. Marry, D.M. Cavalier, J.K. Schnuri, J. Netland, Z. Yang, V. Pezeshk, W.S. York, M. Pauly, A.R. White, Structural characterization of chemically and enzymatically derived standard oligosaccharides isolated from partially purified tamarind xyloglucan, *Carbohydr. Polym.* 51 (2003) 347-56.
- [23] ICH Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedure: text and methodology Q2(R1) (2005).
- [24] G. Kasten, L.F.C. Silva, E. Lemos-Senna, Development of low density azithromycin-loaded polycaprolactone microparticles for pulmonary delivery, *Drug Develop. Ind. Pharm.* 42 (2016) 776-87.
- [25] Y. Fu, W.J. Kao, Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7 (2010) 429-44.

- [26] J. Siepmann, N.A. Peppas, Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48 (2001) 139-57.
- [27] Q. Wang, P.R. Elis, S.B. Ross-Murphy, W. Burchard, Solution characteristics of the xyloglucan extracted from *Detarium senegalense* Gmelin, *Carbohydr. Polym.* 33 (1997) 115-24.
- [28] S. T. Tuomivaara, K. Yaoi, M.A. O'Neill, W.S. York, Generation and structural validation of a library of diverse xyloglucan-derived oligosaccharides, including an update on xyloglucan nomenclature, *Carbohydr. Res.* 402 (2015) 56-66.
- [29] S. Yamanaka, M. Mimura, H. Urakawa, K. Kajiwara, M. Shirakawa, K. Yamatoya, Conformation of tamarind seed xyloglucan oligomers. *Sen'i Gakkaishi*, 55 (1999) 590-6.
- [30] W. Burchard, Light scattering, in: S.B. Ross-Murphy, *Physical techniques for the study of food biopolymers*, Chapman & Hall, Belfast, Ireland, 1994, pp. 151-213.
- [31] R.A. De Freitas, A.P. Busato, D.A. Mitchell, J.L.M. Silveira, Degalactosylation of xyloglucan: Effect on aggregation and conformation, as determined by time dependent static light scattering, HPSEC-MALLS and viscosimetry, *Carbohydr. Polym.* 83 (2011) 1636-42.
- [32] M.J. Gidley, P.J. Lilliford, D.W. Rowlands, P. Lang, M. Dentini, V. Crescenzi, M. Edwards, C. Fanutti, J.S.G. Reid, Structure and solution properties of tamarind-seed polysaccharide, *Carbohydr. Res.* 214 (1991) 299-314.
- [33] I.M. Sims, A.M. Gane, D. Dunstan, G.C. Allan, D.V. Boger, L.D. Melton, A. Basic, Rheological properties of xyloglucan from different plant species, *Carbohydr. Polym.* 37 (1998) 61-9.
- [34] S. Miyazaki, F. Suisha, N. Kawasaki, M. Shirakawa, K. Yamatoya, D. Attwood, Thermally reversible xyloglucan gels as vehicle for rectal drug delivery, *J. Control. Release.* 56 (1998) 75-83.
- [35] Y. Fang, K. Nishinari, Gelation behavior of schizophyllan-sorbitol aqueous solutions, *Biopolym.*, 73 (2004) 44-60.
- [36] L. Li, P.M. Thangamathesvaran, C.Y. Yue, K.C. Tam, X. Hu, Y.C. Lam, Gel network structure of methylcellulose in water. *Langmuir*, 17 (2001) 8062-68.
- [37] S. Todaro, C. Cispenza, M.A. Sabatino, M.G. Ortore, R. Passantino, P.L.S. Biagio, D. Bulone, Temperature-induced self-assembly of degalactosylated

xyloglucan at low concentration, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 53 (2015) 1727-35.

[38] H. Almeida, M.H. Amaral, P. Lobão, J.M.S. Lobo, *In situ* gelling systems: a strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations, *Drug Discov. Today*. 19 (2014) 400-12.

[39] K.A. Khan, The concept of dissolution efficiency, *J. Pharm. Pharmacol.* 27 (1975) 48-9.

[40] L. Serra, J. Doménech, N.A. Peppas, Drug transport mechanism and release kinetics from molecular designed poly(acrylic acid-*g*-ethylene glycol) hydrogels, *Biomater.* 27 (2006) 5440-51.

[41] T.R. Hoare, D.S. Kohane, Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polym.* 49 (2008) 1993-2007.

[42] C.-C. Lin, A.T. Metters, Hydrogel in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006), 1379-1408.

**CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS TERMOSENSÍVEIS DE
XILOGLUCANA CONTENDO NANOEMULSÃO PARA LIBERAÇÃO OCULAR DE
TRIANCINOLONA ACETONIDA**

A administração tópica ocular de fármacos é altamente desejável para o tratamento de doenças oftálmicas, sobretudo por permitir o alcance de alta concentração de fármaco diretamente no sítio de ação. No entanto, os fatores pré-corneais e o efeito barreira tendem a reduzir consideravelmente a biodisponibilidade de moléculas bioativas na via ocular (GAUDANA et al., 2010; GUNDA et al., 2008; VENKATA; MADHAVI; RAJESH, 2011). Dentre as diferentes estratégias utilizadas para superar o efeito pré-corneal destacam-se o uso de sistemas de liberação de fármacos, agentes promotores de viscosidade e os sistemas mucoadesivos, que tendem a elevar o tempo de residência da forma farmacêutica na superfície ocular, elevando assim, a biodisponibilidade dos fármacos (ANDREWS; LAVERLY; JONES, 2009; DIVSALAR et al., 2012; RUPONEN; URTTI, 2015).

Para tanto, nanoemulsões foram desenvolvidas para conter triancinolona acetonida, um anti-inflamatório hidrofóbico amplamente empregado no tratamento de doenças oculares. Devido à baixa viscosidade das nanoemulsões, optou-se por combinar esta estratégia ao uso de hidrogéis termosensíveis, que permitem a aplicação do sistema no estado líquido, com posterior transição para o estado gel em função da variação de temperatura (BRUN-GRAEPPi et al., 2010; KOPEČEK, 2007). Para o preparo do hidrogel termosensível foi selecionado o polímero xiloglucana, uma hemicelulose de origem vegetal que apresenta biodegradabilidade e biocompatibilidade com a via ocular, e possui a propriedade de interagir com as moléculas de mucina que compõe a camada de muco que reveste a superfície ocular (DI COLO et al., 2009; DILBAGHI et al., 2013; MIYAZAKI et al., 1999).

Sendo assim, neste trabalho foi desenvolvido um sistema que compila três diferentes estratégias para o aumento da biodisponibilidade ocular de fármacos. Foi avaliada a capacidade do hidrogel termosensível de xiloglucana em incorporar nanoemulsões, o efeito das nanoemulsões sobre as propriedades reológicas e mucoadesivas do polissacarídeo, além da avaliação do efeito da xiloglucana sobre a permeabilidade transcorneal da triancinolona acetonida.

Triamcinolone Acetonide-Loaded Nanoemulsions in Thermoresponsive Xyloglucan-Based Hydrogels for Ocular Delivery

SILVA, L. F. C.^{a,b}; LEMOS-SENNA, E.^b; HALILA, S.^a; BORSALI, R^{a*}.

^a Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV-CNRS), Université Joseph Fourier (UJF), Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (ICMG-FR 2607 CNRS), Grenoble Cedex 9, France.

^b Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, Brazil.

*Contact e-mail: borsali@cermav.cnrs.fr

Abstract

Ophthalmic topical drug delivery is a desirable pathway to treat local diseases, mostly due its easier self-administration and capacity to provide higher local drug concentration. Nevertheless, there is a need for new strategies to overcome the precorneal and barrier effect drawbacks from topical ophthalmic delivery. In this study, a thermoresponsive xyloglucan hydrogel containing a triamcinolone acetonide-loaded nanoemulsion (DEG⁵⁰-XG-NE_{TA}) was proposed as a new drug delivery system for ocular administration. By rheological measurements it was possible to verify that the increase of the nanoemulsion (NE_{TA}) volume added to a constant volume of xyloglucan solution (DEG⁵⁰-XG) provoked a decrease on the elastic and viscous moduli, increasing both the sol-to-gel transition temperature, and the required time for gelling at 35 °C. The 3% (w/v) DEG⁵⁰-XG solution shown a better mucoadhesive profile at 10 °C than at 35 °C, evidencing that xyloglucana aggregates formed during gelation display a lower capacity to interact with mucin. On the other hand, an optimized ocular drug delivery system, in which the thermosensitive properties could be combined with a desirable mucoadhesiveness behavior, was obtained when a DEG⁵⁰-XG to NE volume ratio of 1:1 was employed. *Ex vivo* corneal permeation and retention studies of TA from DEG⁵⁰-XG-NE_{TA} were

carried out the results were compared with those obtained after assaying a xyloglucan hydrogel containing the free drug (DEG⁵⁰-XG-TA) and the TA-loaded nanoemulsion alone (NE_{TA}). The statistical analysis of the parameters of flux (J_s) and permeability coefficient (k_p) indicated the TA permeation through the cornea increases in the following order: Deg⁵⁰-XG-NE_{TA} > Deg⁵⁰-XG-TA > NE_{TA}. Also, the higher corneal drug retention was obtained by the use of the Deg⁵⁰-XG-NE_{TA}. The results evidenced that the polysaccharide enhances the drug permeability through the corneal tissue, besides to lead a formation of a TA reservoir into the cornea, which could lead to a sustained release of the drug. These characteristics make the xyloglucan hydrogel containing TA-loaded nanoemulsion an interesting strategy to treat inflammatory diseases of the anterior and posterior chambers of the eye.

Keywords: Thermoresponsive hydrogel; Xyloglucan; Nanoemulsion; Mucoadhesion.

1. Introduction

Triamcinolone acetonide (TA) is a hydrophobic drug widely used as eye drops in the treatment of different ophthalmic inflammation processes, in which the pharmacological activity encloses the inhibition of the NF- κ B and AP-1 transcription factors and the expression of several interleukins¹. Topical medication is highly desirable for the treatment of ocular inflammatory diseases, since it allows the drug to reach therapeutic concentrations in the different layers of the cornea, conjunctiva, sclera, and even the iris and ciliary body, with smaller incidence of side effects, and easier patient self-administration^{1,2}. However, the drug bioavailability is deeply affected by the precorneal factors and anatomical barriers^{2,3}. Precornal factors interfere on drug bioavailability by different mechanisms that include nasolacrimal drainage, blinking tear film, tear turn over, and induced lacrimation^{2,4}. The remaining drug that bypass the pre-corneal barriers will still encounter various cellular layers in the cornea, conjunctiva, and sclera tissues, before reaching the anterior chamber^{2,5,6}.

In the last decade, oil-in-water nanoemulsions (NE) have been proposed as vehicles for ophthalmic administration of lipophilic drugs in order to increase the

ocular drug permeation and even to inhibit the drug efflux caused by the main transporters identified on ocular tissues, including the P-glycoprotein, multidrug resistance protein (MRP), and BCRP². The inherent biocompatibility, nanometric droplet size range, easy sterilization, high ability to solubilize poorly water-soluble drugs are others advantages that make NEs promising ocular drug delivery systems⁷⁻⁹. On the other hand, the low viscosity of these colloidal carrier systems are similar to those of the eye drop solutions, requiring addition of viscosity enhancers to increase the thickness of tear film, and reduce the tear drainage, allowing the drug to stay on corneal surface for a longer period^{2,4,10}.

Hydrogels are three-dimensional, cross-linked networks of water-soluble polymers that appear under the spotlight as vehicles to enhance the precorneal residence time of ocular medications². In particular, there is a growing interest in the use of thermally sensitive *in situ* forming hydrogels for ocular drug delivery, due to the possibility to deliver the drug as a liquid dosage form, but that undergoes a rapid transition into a gel phase at the eye temperature. This approach have allowed the ocular administration of the dose in an easier, more accurate, and reproducible manner¹⁰⁻¹².

Several polymers exhibit gelation upon temperature change at a specific range. Xyloglucan is a neutral and non-toxic polysaccharide found in the primary cell walls of higher plants, composed of a (1→4)-β-D-glucan backbone with a (1→6)-α-branched xylose, which is partially substituted by (1→2)-β-D-galactose. Tamarind seed xyloglucan is composed of different units of heptasaccharide (XXXG), octasaccharide (XXLG or XLXG), and nonasaccharide (XLLG) oligomers, which differ in number of galactose side chains¹³. However, xyloglucan is able to form thermoresponsive hidrogels only after partial degalactosylation, which it may be undertake by using a fungal β-galactosidase enzyme¹⁴. In a previous study, we have demonstrated that a 50 % degalactosylated xyloglucan is able to rapidly transit into a gel-like structure at eye temperature, forming hydrogels with suitable rheological properties for ocular administration. This thermoresponsive hydrogel was able to the release TA in a controlled rate by a mechanism enclosing the polymer chain relaxation¹⁵. In this study, we investigate the effect of the incorporation of the TA into

NEs on the rheological properties of the xyloglucan hydrogels and on the *in vitro* transcorneal permeation of the drug. Since xyloglucan can interact with the mucin, the major component of the mucus layer that recover the eye surface^{16,17}, the mucoadhesion properties of the xyloglucan hydrogels containing the TA-loaded NEs is also evaluate.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Medium chain triglycerides (MCT) was purchased from Brasquim (Brazil). Hydrogenated soybean lecithin (LIPOID S100, 97.5 % phosphatidylcholine) was purchased from Lipid Ingredients & Technology (Brazil). Triamcinolone acetonide (TA) was acquired by Pharma Nostra (Brazil). Tamarind kernel powder (TKP) was gently gifted by Megazyme (Ireland). A 50 % degalactosylated xyloglucan (Deg⁵⁰-XG) was obtained from TKP, according described in our previous studies¹⁵. Mucin type III from porcine stomach was purchased from Sigma-Aldrich. Except for HPLC-grade acetonitrile, all other solvents and reagents were analytical grade and were used as received.

2.2 Triamcinolone Acetonide-Loaded Nanoemulsion Preparation

TA-loaded nanoemulsion (NE_{TA}) were prepared by the spontaneous emulsification method as previously described¹⁸. Firstly, 200 mg of MCT oil, 20 mg of soy bean lecithin, and 5 mg of TA were solubilized in 15 mL of ethanol. This organic phase was poured into 50 mL of an aqueous phase containing 0.1 % of Poloxamer 188. After, the organic solvent was evaporated under reduced pressure and the final volume adjusted to 20 mL. Then, the NE_{TA} was filtered through an 8 µm pore size quantitative paper and stored at 4 °C. The NE_{TA} formulation was prepared in triplicate.

2.3 Physicochemical and morphological characterization of the nanoemulsion

2.3.1 Particle size determination

Hydrodynamic radius (R_h) was evaluated by Dynamic Light Scattering (DLS) using an ALV/CG6-8F (ALV-Langen, Germany) goniometer equipped with a 35 mW red helium-neon linearly polarized laser ($\lambda = 632.8$ nm) and an ALV/LSE-5004 (ALV-Langen, Germany) multiple tau digital correlator with a 120 ns initial sampling time. The scattered photons were detected by a very sensitive avalanche diode and data were acquired with the ALV correlator control software. After appropriate dilution with ultrapure water, each sample was placed into cylindrical cells and immersed in a toluene bath maintained at temperature of 25 ± 0.5 °C. The measurements were carried out with a counting time of 300 s at scattering angles ranging from 30 to 150° with a 5° stepwise increment. The relaxation time distribution (τ) was obtained using the CONTIN analysis of the autocorrelation function ($g^{(2)} - 1$). The apparent diffusion coefficient (D) was obtained by plotting the relaxation frequency (τ^{-1}) against the square of scattering vector modulus (q^2). Then, the hydrodynamic radius (R_h) was obtained by employing the Stokes-Einstein equation (Equation 1).

$$R_H = \left(\frac{k_B T}{6\pi\eta D} \right) \quad (1)$$

where k_B is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature, η is the medium viscosity, and D is the diffusion coefficient.

2.3.2 Zeta potential measurement

Zeta potential was evaluated by laser-Doppler anemometry using a Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, UK). After appropriated dilution in ultra-pure water, each sample was placed into an electrophoretic cell, where a potential of ± 150 mV was applied. Zeta potential values were calculated from the mean electrophoretic

mobility values using Smoluchowski's equation. All measurements were carried out in triplicate.

2.3.3 Morphological analysis of nanoemulsions

NE_{TA} morphology was examined by transmission electron microscopy (TEM) using a JEOL-1011 microscope (JEOL Ltd, Japan), with an operating voltage of 100 kV. Samples were diluted in ultrapure water and deposited on 400 mesh carbon-coated copper grids and negatively stained with 1 % (w/v) phosphotungstic acid.

2.4 Determination the Entrapment Efficiency (EE%) and drug loading (DL)

Drug loading was estimated by an RP-HPLC method previously described¹⁵. The analyses were carried out using a Luna C18 5 μ m (150 mm x 4.6 mm) column. The samples were isocratically eluted with acetonitrile:water (6:4, v/v) at flow rate of 1.0 mL.min⁻¹. The injection volume was 10 μ L and detection was performed by UV at 240 nm. The TA loading was expressed as microgram per milliliter of NE (μ g.mL⁻¹). The EE% was determined as being the difference between the whole drug concentration and the drug concentration in the supernatant obtained after ultrafiltration/centrifugation procedure using YM-100 Ultracel devices (10,000 Da NMWL, Millipore Corp., USA). All samples were analyzed in triplicate.

2.5 Preparation of the Deg⁵⁰-XG hydrogels containing TA-loaded nanoemulsions

The hydrogels containing the TA-loaded NEs were prepared by adding the NE formulation into a 3 % (m/V) Deg⁵⁰-XG water solution at volume ratios of 1:0.5; 1:0.75; 1:1; 1:1.25; and 1:1.5 (v/v). All hydrogel formulations were stored at 4 \pm 1 °C. The NE-loaded capacity of Deg⁵⁰-XG hydrogels was evaluated as the volume ratio of NE added on Deg⁵⁰-XG pre-gel solution that does not compromise the thermosensitive and mucoadhesive hydrogel.

2.5.1 Evaluation of the rheological properties of Deg⁵⁰-XG hydrogels containing the TA-loaded NEs

Samples were placed in a TA AR2000 rheometer (TA Instruments Ltd, UK) with a cone-plate configuration using a 40 mm/4 ° stainless steel cone, and a solvent trap covering the geometry to prevent evaporation. To evaluate the influence of nanoemulsion volume in thermosensitive hydrogel sol-to-gel transition, and the sol-to-gel transition time at 35 °C, a temperature and time sweep rheological analysis were carried out. In temperature sweep analysis, the samples were heated from 10 to 40 °C at a heating rate of 0.5 °C.min⁻¹, and immediately cooled until 10 °C at a 0.5 °C.min⁻¹ cooling rate. All analyzes were conducted in a linear viscoelastic regime (LVR), with 1.0 Hz of frequency, and 1.0 of strain. Changes in storage and viscous moduli were assessed, and the cloud point was determined as the temperature on the crossing over point of G' and G'' curves ^{19,20}.

The time sweep measurement set up the time required to sol-to-gel transition at a constant temperature (isothermal) regime. In this assay, all measurements were carried out at 35 °C (mean temperature on the eye surface), and the time of transition was settled on the crossing over point of the dynamic moduli logarithmic curves. All samples were placed on the plate at 10 °C to prevent early gelation process, and the temperature sudden increased to 35 °C to start the analysis. All samples were analyzed on the same LVR as described above ²⁰.

2.5.2 Evaluation of the hydrogel mucoadhesion properties

The interactions of Deg⁵⁰-XG solutions and hydrogels with porcine stomach mucin were evaluated by a rheological mucoadhesion method. Firstly, a 10 % (w/v) porcine stomach mucin dispersion was prepared in artificial lachrymal fluid (ALF) ²¹. Then, samples of the Deg⁵⁰-XG dispersions in a pre-gel state were allowed to interact with the 10 % (w/v) mucin dispersion at volume ratio of 1:1 for 10 minutes. The rheological properties of the samples were evaluated at 10 °C and at 35 °C, using a time sweep method as previously described ¹⁵. The rheological properties of the mucin dispersion and samples were also evaluated, after dilution with ALF at 1:1 volume ratio.

Mucoadhesion properties were expressed as a function of $G'_{relative}$, which was estimated according Equations 2 and 3 ²².

$$G'_s = G'_p + G'_M + G'_I \quad (2)$$

$$G'_{relative} = \frac{G'_s}{(G'_M + G'_p)} \quad (3)$$

where G'_s , G'_M , G'_p and G'_I are the storage moduli of the mucin-sample mixture, mucin, and sample alone, and the storage moduli of interaction between mucin and sample respectively, and $G'_{relative}$ is the interaction component relative to initial G' of mucin and sample solutions.

2.6 *In vitro* triamcinolone acetonide transcorneal permeation

Freshly excised porcine corneas were mounted on a modified Franz cell, which maintained cornea curvature. The corneal area available for diffusion was 0.95 cm². The receptor compartment was filled with 13 mL of freshly prepared ALF pH 7.4 with sodium laurylsulphate 0.5 % (w/v), and all air bubbles were expelled from the compartment.

Aliquots of 0.3 mL of the Deg⁵⁰-XG hydrogel containing TA-loaded nanoemulsions or the free drug, or the TA-loaded nanoemulsion alone were placed into the donor compartment with a total TA amount of 3.86 µg. The receptor fluid was kept at 35 °C with constant magnetic stirring, and the transcorneal permeation assay was carried out over 6 hours. Aliquots of the receptor medium were withdrawn at predetermined intervals, and the volume was immediately replaced with fresh ALF with sodium laurylsulphate 0.5 % (w/v) medium to maintain the sink conditions. Each study was repeated six times, and TA was quantified by HPLC-RP using a Luna C18 5 µm (150 mm x 4.6 mm) column, with an acetonitrile:water (6:4, v/v) isocratic elution mode at flow rate of 1.0 mL.min⁻¹. The injection volume was 20 µL and detection was performed by UV at 240 nm.

The HPLC-RP method was validated as described by ICH Q2(R1) ²³

guideline evaluating the parameters of linearity, accuracy, precision parameters, and determination of the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) using as diluent a corneal extract in ALF pH 7.4 with sodium laurylsulphate 0.5 % (w/v). To prepare the corneal extract, a freshly excised porcine cornea was cut in about 0.01 cm² squares, and placed in 13 mL of ALF pH 7.4 with sodium laurylsulphate 0.5 % (w/v), and submitted to extraction, in ice bath, using an ultrasound homogenizer UP 200 S (Hielscher Ultrasonics GmbH, Germany) in a 60 % of amplitude, 1.0 cycle, and 3 minutes. The method was linear over the range of 0.10 to 1.00 µg.mL⁻¹ ($r = 0.9996$), with a regression equation of mean calibration graph ($n = 3$) equal to $y = 103722x - 3620$. Linearity was confirmed by the variance analysis (ANOVA) as $F_{calculated} > F_{critical}$ ($p < 0.05$), while homoscedasticity was confirmed by Cochran's C test ($C_{calculated} < C_{critical}$; $p > 0.05$). LOD and LOQ were 0.02 and 0.07 µg.mL⁻¹, respectively, indicating enough sensitivity to use the method to determine TA content in the acceptor compartment. The recovery values ranged from 98.8 to 100.0 % satisfying the acceptance criteria for accuracy parameter. The intra- and inter-day relative standard deviation values were lower than 5 %, indicating an acceptable variability of the TA content determination ($\alpha = 0.05$).

Cumulative amount of drug permeated (Q_t) versus time plottings were used to calculate the permeation parameter such as, flux (J_s), and corneal permeability coefficient (K_p), using the equations 4 and 5, respectively. Lag time (T_L) was calculated by linear regression analysis of the cumulative TA permeating the cornea over time plotting, and the intercept estimated as lag time (T_L)²⁴.

$$J_s = \frac{\partial Q}{A \partial t} \quad (4)$$

$$K_p = \left(\frac{J_s}{A \times C_0 \times 6 \times T_L} \right) \quad (5)$$

Where C_0 is the initial concentration of drug into the donor compartment, A is the exposed corneal surface, and t is time.

2.7 Triamcinolone acetonide retention into the cornea

Immediately after *in vitro* transcorneal permeation assay, porcine cornea tissue was washed three times with Milli-Q[®] water to remove the dosage form remained on the surface. The permeated area was excised, ripped, and TA contained into the tissue was extracted in 5 mL of acetonitrile for 1 hour under magnetic stirring. Sample was filtered through 0.45 μm PVDF syringe filter and analyzed by RP-HPLC using the same condition described on item 2.4. Chromatographic method was validated by evaluating the corneal matrix effect on TA quantification. Each experiment was repeated six times and the percentage of drug retained into the cornea calculated based on the drug amount placed on the donor compartment (Equation 6) ²⁵.

$$TA \text{ retention (\%)} = \left(\frac{W_{ret}}{W_{placed}} \right) \times 100 \quad (6)$$

where w_{ret} is the amount of TA retained into the cornea, and w_{placed} is the amount of TA placed on the donor compartment.

2.8 Corneal hydration levels

Corneal hydration level (HL, %) of the cornea was evaluated at the end of the experiments of transcorneal permeation. The tissue was carefully freed from the sclera ring, washed, and weighted (W_{wet}). Cornea was dried at constant weight at 80 °C, and then reweighted (W_{dry}). The HL value were expressed as mean of six experiments, and calculated using the following equation ²⁶.

$$HL = \left[1 - \left(\frac{W_{wet}}{W_{dry}} \right) \times 100 \right] \quad (7)$$

2.9 Statistical analysis

The differences in average of data were compared by analysis of variance (ANOVA), and independent or paired sample *t*-test. The significance of the difference was determined at 95% confidence limit ($\alpha = 0.05$).

3. Results and discussion

3.1 Physicochemical properties of nanoemulsion

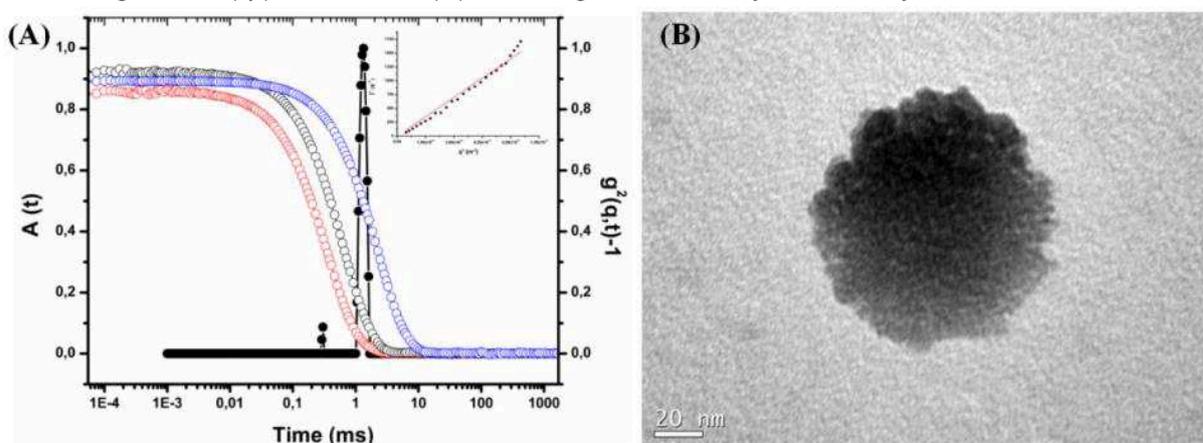
The autocorrelation function $g^2(q, t) - 1$ at 130, 90 and 50° scattering angle, relaxation time distribution $A(t)$ at $\theta = 90^\circ$, and the relaxation frequency in function of the square wave vector modulus are featured in Figure 1A. Relaxation time distribution at 90° shows a narrow peak, indicating a monodisperse distribution of droplets in NEs. Through multiangle DLS analysis it was obtained the apparent diffusion coefficient (D) of $2.21 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, resulting in a calculated apparent hydrodynamic radius of 110.54 nm (Equation 1). NEs also exhibit a $-33.4 \pm 0.95 \text{ mV}$ zeta potential, suggesting physically stable nanodroplets dispersion. Phospholipids, such as lecithins, act as stabilizers due its amphiphilic behavior, interacting with hydrophobic structures by their fatty acid chains, facing the polar moieties in the oil-water interface²⁷. Poloxamers, nonetheless, are triblock copolymers chains which promote steric stabilization on nanemulsion interface through hydrophobic interactions with PPO block, whereas the external hydrophilic PEO blocks solvate and protrude into the aqueous medium creating a steric barrier^{28,29}.

When analyzed by TEM (Figure 1B), NEs displayed a smaller droplet size than those evaluated by DLS. It can happens because there is some architecture changes on NEs over drying step in grid preparation, leading to coalescence of droplets into larger oil aggregates, remaining only smaller droplets³⁰. On the other hand, droplet size measurements obtained by DLS analysis are related to intensity size distribution, while TEM images reveal a number size distribution. This difference in size assessment may induce to a shift on size distribution profile, especially because a large droplet have higher contribution on the global light scattering that a few smaller droplets, overexpressing the intensity relative to larger droplets³¹.

NE was prepared obtaining a $44.52 \pm 1.98 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ drug loading, with a $57.43 \pm 3.40 \%$ of entrapment efficiency. The small EE achieved by NEs could be related to the moderate solubility of TA in the 0.1 % (w/v) Poloxamer 188 solution outside the oil droplet. However, as the contact time of formulation on eye surface is

reduced by pre-corneal effects, a fast delivery is desirable to reach therapeutics doses on the tissue, followed by a controlled release provided by NEs. Then, the TA amount outside oil nanodroplets can be used as fast supplier drug to transcorneal permeation, followed release of TA entrapped into the oil core.

Figure 1 – (A) Relaxation time distribution at (—) and autocorrelation function at (—○—) 130°, (—○—) 90°, and (—○—) 50° scattering angle, and inverse decay times (τ^{-1}) vs. modulus of the scattering vector (q^2) of NE; and (B) NE image obtained by TEM analysis.



3.2 Preparation and characterization of the Deg⁵⁰-XG hydrogels containing the TA-loaded nanoemulsions

3.2.1 Rheological evaluation of nanoemulsion-loaded thermoresponsive xyloglucan hydrogels

In a previous this study ¹⁵, xyloglucan was incubated with β -galactosidase enzyme for 32 hours at 50 °C in order to obtain a 50 % degalactosylated xyloglucan (Deg⁵⁰-XG), and it was possible to verify that a 3.0 (w/v) Deg⁵⁰-XG water solution displays a thermoresponsive behavior, changing from a viscous solution state ($G' < G''$), at lower temperatures, to a hydrogel phase ($G' > G''$) at temperature higher than 25 °C. The phase transition occurs due enhancement of elastic modulus, while viscous modulus varies discreetly ¹⁵. Deg⁵⁰-XG gelation is dependent of hydrophobic interactions between xyloglucan chains, forming compact structures able to retain water ³¹, in which the sol-to-gel transition temperature can be modulated by polymer concentration ¹⁵. In Figure 2 and Figure 3A, it is possible to verify that 3.0 % (w/v) Deg⁵⁰-XG water solution exhibits a sol-to-gel transition at 24.8 °C, and when NE_{TA}

was added to that Deg⁵⁰-XG water solution there was a decrease on initial elastic and viscous moduli, probably due dilution effect caused by the incorporation of the TA-loaded NE (Fig. 2 and Fig, 3B-F), besides the interference of the droplets on polymer chains aggregation process. Nevertheless, the addition of the NE colloidal dispersions at all volume ratios tested produced hydrogels exhibiting sol-to-gel transitions at temperatures below 35 °C (temperature of the eye surface), in spite of significantly ($p < 0.05$) increase the gelation temperature. The 3.0 % (w/v) Deg⁵⁰-XG water solution underwent a sol-to-gel transition at 24.8 °C, while samples with 3.0 % (w/v) Deg⁵⁰-XG containing TA-loaded NE at 1:0.5, 1:0.75, 1:1, 1:1.25, 1:1.5 (v/v) ratios displayed sol-to-gel transition temperatures to 26.7 °C, 29.4, 30.8, 31.1, and 32.8, respectively.

The dilution of the Deg⁵⁰-XG solution upon addition of the NE_{TA} also affected the time for sol-to-gel transition at 35 °C. It can be verified by the faster gelation of the samples that transited to a hydrogel state at lower temperatures (Fig. 2). The Deg⁵⁰-XG solution:NE_{TA} prepared at volume ratio of 1:1.5 required a higher time to gelling, forming a weaker hydrogel, which can not be considered an adequate formulation for ocular drug delivery purposes. To determine which sample can carry the higher amount of NE_{TA}, maintaining suitable thermoresponsive behavior for topical ocular pathway, administration, the hydrogel mucoadhesiveness properties should be evaluated.

3.2.2 Mucoadhesion property evaluation

Xyloglucan is a mucoadhesive polysaccharide, which may prolong the residence time for delivering the drug into the eye by attaching to the mucus layer that covers the eye surface^{16,17}. The rheological measurement of mucoadhesion is based on the fact that the total rheological response of the mixture of the mucoadhesive polymer and mucin is larger than the sum of the contributions from the mucin and the sample separated. The increase on elastic modulus could occur due entanglements or weak inter-molecular forces between polymer and mucin³². When the rheological properties of 1:1 (v/v) Deg⁵⁰-XG hydrogel and mucin mixtures were evaluated, it was

possible to verify that the mucoadhesive properties were dependent on both temperature and Deg⁵⁰-XG solution to NE_{TA} volume ratio (Fig. 4).

Figure 2. Effect of 3.0% (w/v) Deg⁵⁰-XG water solution: NE_{TA} volume ratio (v/v) on gelation temperature (°C) (—■—), and time for gelling at time at 35 °C (min) (—□—).

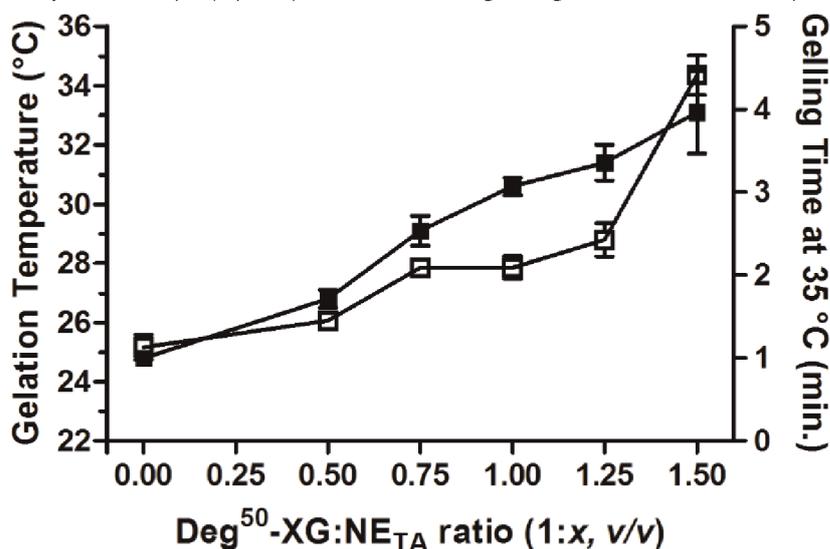
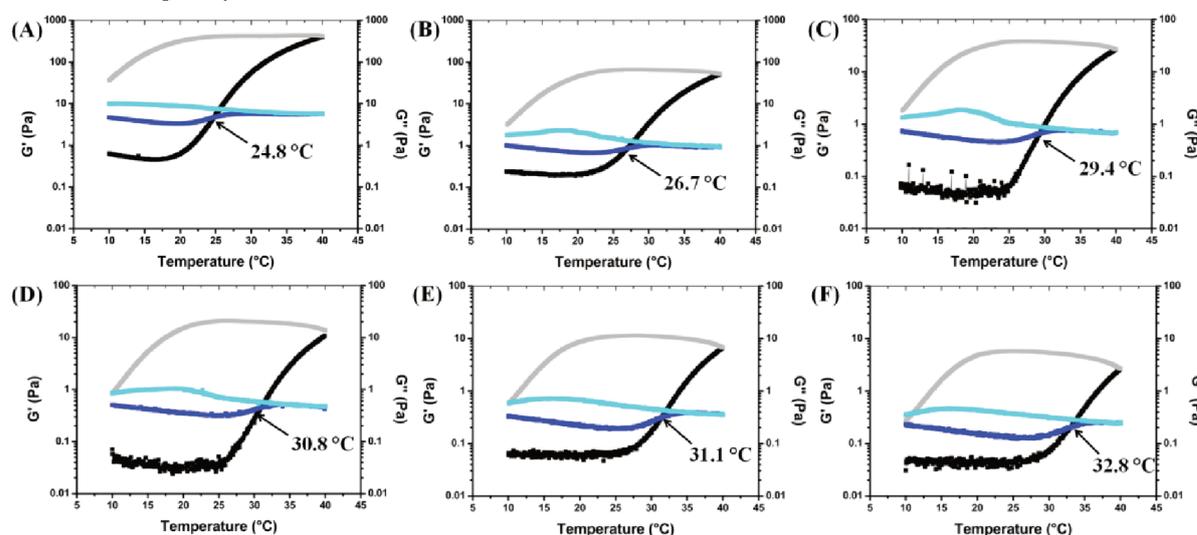


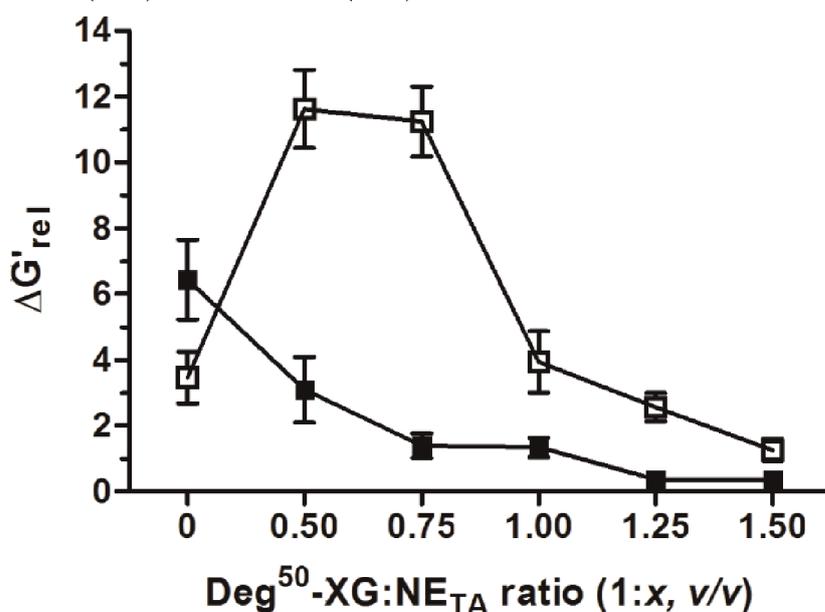
Figure 3 – Temperature sweep rheological analysis of 3.0% (w/v) Deg⁵⁰-XG water solution:NE_{TA} (v/v) at volume ratio of (A) 1:0 (B) 1:0.5 (C) 1:0.75; (D) 1:1; (E) 1:1.25; and (F) 1:1.5 where (—) G' on heating step; (—) G'' on heating step; (—) G' on cooling step; and (—) G'' on cooling step.



At 10 °C, the 3.0 % (w/v) Deg⁵⁰-XG water solution shown better mucoadhesive properties than at 35 °C. Then, it is possible to assume that, as xyloglucan hydrogel is formed by polysaccharide aggregation due to hydrophobic

interactions, there was a decrease in the number of Deg⁵⁰-XG molecules available to interact with mucin at the highest temperature, causing a loss of mucoadhesiveness. Also, at 10 °C, the addition of NE_{TA} to the Deg⁵⁰-XG solution at different volume ratios induced to a reduction of the mucoadhesiveness, probably by a dilution effect caused by the incorporation of the non-mucoadhesive colloidal dispersion to the polymer solution. The NE_{TA} dispersion have negative-charged surface, which may undergoes electrostatic repulsion with negative-charged mucin macromolecules. On the other hand, samples displayed a higher mucoadhesive behavior at 35 °C, with a strong increment on mucoadhesiveness when a 1:0.5 and 1:0.75 Deg⁵⁰-XG water solution to NE_{TA} volume ratios were used. Possibly the presence of NE_{TA} droplets caused a decrease on xyloglucan aggregation kinetics, leading the remaining non-aggregate molecules to interact with the mucin, increasing the interaction between these macromolecules ³³. However, its increment on mucoadhesiveness profile was reversed by addition of NE_{TA} at higher volume ratio, reaching similar mucoadhesive properties than that of the polysaccharide solution when the 1:1 Deg⁵⁰-XG solution to NE_{TA} volume ratio was tested.

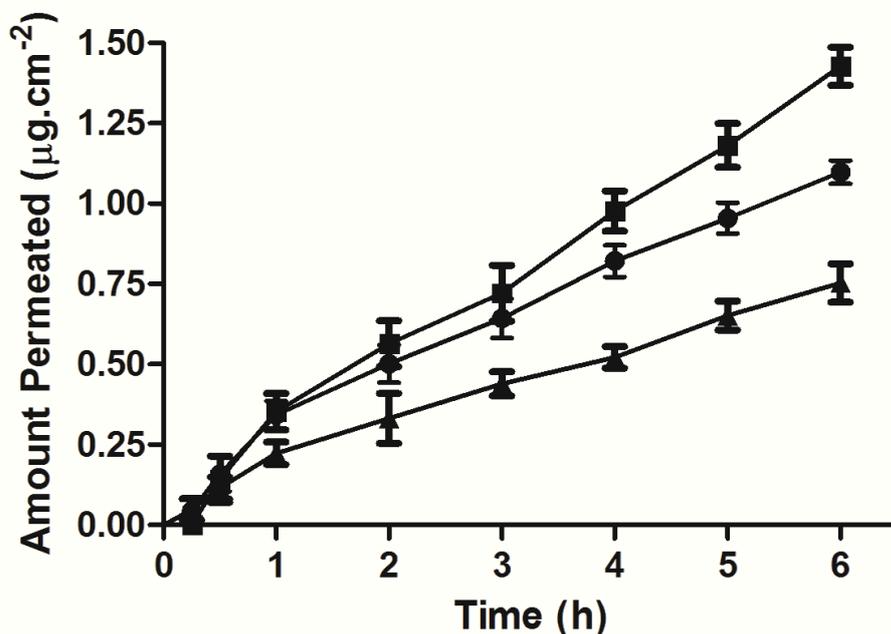
Figure 4 – Effect of 3.0% (w/v) Deg⁵⁰-XG water solution:NE_{TA} volume ratio (v/v) on $\Delta G'_{rel}$ at 10 °C (—■—), and at 35 °C (—□—).



3.3 *In vitro* triamcinolone acetonide transcorneal permeation

The transcorneal permeation profiles of TA from Deg⁵⁰-XG hydrogel containing the TA-loaded NE (Deg⁵⁰-XG-NE_{TA}), Deg⁵⁰-XG hydrogel containing the free drug (Deg⁵⁰-XG-TA), and the TA-loaded colloidal dispersion (NE_{TA}) are demonstrated in Figure 6. The corneal permeation parameters obtained from the TA permeation profiles are described in the Table 2. The statistical analysis of the parameters of flux (J_s) and permeability coefficient (k_p) indicated the drug permeation through the cornea increases in the following order: Deg⁵⁰-XG-NE_{TA} > Deg⁵⁰-XG-TA > NE_{TA}. However, when the lag time (T_L) values were compared, significantly statistical difference was found only when Deg⁵⁰-XG-NE_{TA} was evaluated, evidencing a combination of drug release effect from nanoemulsions and decreased drug diffusion mechanism through viscous polymeric matrix ³⁴.

Figure 5 – Triamcinolone acetonide transcorneal permeation profiles from: (–▲–) NE_{TA}; (–●–) Deg⁵⁰-XG-TA; and (–■–) Deg⁵⁰-XG-NE_{TA}, across excised porcine cornea ($n = 6$).



After transcorneal permeation experiments, excised porcine cornea were carefully separated from sclera ring and evaluated according to the level of hydration (HL). The corneal HL is a parameter frequently used to evaluate the tissue integrity, where a non-damaged cornea has a HL ranging from 76 to 80 %. HL values above the normal value indicates damage of the epithelium or endothelium ^{25,35}. All samples

of corneal tissue remain on the HL% range of 77.72 to 79.54 % indicating that the integrity of porcine cornea after 6h of transcorneal permeability experiment was maintained (Table 1). There was no significant statistical difference ($p > 0.05$) on HL% between the formulations, but there was a tendency of the Deg⁵⁰-XG hydrogels to increase the HL% of the cornea.

The amount of the TA retained in the cornea after 6 h of transcorneal permeation experiment is also given in Table 1. In this case, the xyloglucan hydrogel containing the nanoemulsion also significantly increased the amount of the drug retained into the corneal barrier, compared to the hydrogel containing the free drug and the NE colloidal dispersion. Ghelardi and co-workers³⁶ observed the increase of corneal retention of gentamicin and ofloxacin when instilled on New Zealand rabbit eye as a xyloglucan solution, with lower removal ratio, probably due mucoadhesive polymer property. Withal, xyloglucan was able to increase significantly corneal permeability of gentamicin and ofloxacin. Di Colo and co-worker¹⁶ observed that xyloglucan increased time residence of diclofenac sodium and ketotifen fumarate on eye surface of male New Zealand rabbits in a stronger way than hyaluronic acid, hydroxyethylcellulose and arabinogalactan.

Xyloglucan is also described by increasing conjunctival permeation of rufloxacin and ofloxacin in a bacterial keratitis model using male New Zealand rabbits, where drug-xyloglucan formulations were able to increase significantly the antimicrobial treatment efficiency³⁷. The authors described that the xylose and galactose residues on the xyloglucan polymeric chain are chemically similar to those of mucin MUC-1, being able to bind to the cell surface and intensify the contact between drugs and the cornea³⁷. The interaction between cornea surface and xyloglucan may explain the corneal permeability enhancing effect observed in this study, nevertheless further studies must be carried out to elucidate this phenomenon.

The enhancement of TA entrapment into the corneal tissue by Deg⁵⁰-XG-NE_{TA} hydrogel may be interesting to increase the efficacy of the treatment of inflammatory diseases affecting the anterior chamber of the eye, and it might promote, also, a controlled or sustained drug release to posterior chamber being an

interesting strategy for the treatment of the inflammatory pathologies of inner eye compartments.

The increase of the drug entrapment into the cornea by using lipid and polymeric nanocarriers is a property that has been reported by other authors ^{24,35}, and the improvement of the therapeutic properties has been ascribed to a reservoir effect of the drug, which afford the release of the drug in a controlled maner. Then, considering these results the Deg⁵⁰-XG-NE_{TA} appears to be a promising dosage form to treat anterior and posterior inflammatory diseases, by improving the transcorneal permeation and corneal retention of this drug.

4. Conclusion

In this study, we demonstrated the feasibility to obtain thermoresponsive xyloglucan hydrogels containing triamcinolone acetonide-loaded nanoemulsions, as well as the ability of this system to deliver the drug into the corneal tissue. Both the sol-gel transition temperature and the time required for gelling were affected by the Deg⁵⁰-XG solution to NE_{TA} volume ratio, probably due a dilution effect provided upon NE_{TA} addition into the xyloglucan solution, which hampered the polysaccharide aggregation. The mucoadhesiveness of the Deg⁵⁰-XG hydrogel was also affected by addition of the TA-loaded nanoemulsion, which demonstrated to be higher when a Deg⁵⁰-XG to NE volume ratio of 1:0.75 was used.

However, an optimized ocular drug delivery system, in which the thermosensitive properties could be combined with a desirable mucoadhesiveness behavior, was obtained when a Deg⁵⁰-XG to NE volume ratio of 1:1 was employed. Besides, the transcorneal permeation rate and the corneal retention of the drug were significantly increased by the association of the TA-loaded NE and the Deg⁵⁰-XG hydrogel in the same formulation. It was observed that the polysaccharide enhances the drug permeability through the corneal tissue and provides a higher entrapment of the drug into the porcine cornea, producing a drug reservoir into the cornea, which could lead to a drug sustained release. Then, the use of xyloglucan hydrogels containing drug-loaded nanoemulsions may be considered an interesting strategy to deliver drugs as the triamcinolone acetonide for the treatment of inflammatory diseases affecting the anterior and posterior chamber of the eye.

Table 1. Transcorneal TA permeation parameters ($n = 6$).

Sample	$J_s \pm SD^*$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$k_p \pm SD^*$ ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)	$T_L \pm SD^*$ (h)	TA** retention $\pm SD^*$ (%)	Total Permeation amount after 6h \pm SD*(%)	HL $\pm SD^*$ (%)
NE _{TA}	0.11 ± 0.01^a	0.03 ± 0.00^a	0.11 ± 0.01^a	21.80 ± 1.06^a	18.54 ± 1.48^a	77.72 ± 1.61
Deg ⁵⁰ -XG-TA	0.16 ± 0.00^b	0.04 ± 0.00^b	0.12 ± 0.01^a	37.44 ± 2.55^b	27.03 ± 0.81^b	79.27 ± 0.41
Deg ⁵⁰ -XG-NE _{TA}	0.22 ± 0.01^c	0.06 ± 0.00^c	0.23 ± 0.01^b	56.92 ± 1.29^c	35.14 ± 1.46^c	79.54 ± 0.63

*SD is standard deviation

TA** is triamcinolone acetonide

^{a,b,c} means statistical difference by ANOVA followed by Tukey post-test ($\alpha = 0.05$).

Acknowledgement

The authors are grateful to Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France), and Institut Carnot Polynat (France) for financial support.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

REFERENCES

- [1] CONNINGHAM-JUNIOR, E.T.; WENDER, J.D. Practical approach to the use of corticosteroids in patients with uveitis, *Canadian Journal of Ophthalmology*, 45, 353-358 (2010).
- [2] GAUDANA, R.; ANANTHULA, H. K.; PARENKY, A.; MILTRA, A. K. Ocular drug delivery. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 12, n. 3, p. 348-360, set., 2010.
- [3] GUNDA, S.; HARIHARAN, S.; MANDAVA, N.; MITRA, A. K. **Barriers in ocular drug delivery**. In: TOMBRAN-TINK, J.; BARNSTABLE, C. J. Ocular transporters in ophthalmic diseases and drug delivery. New Jersey: Humana Press, 2008. 467 p.
- [4] RUPONEN, M.; URTTI, A. Undefined role of mucus as a barrier in ocular drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 96, n. 1, p. 442-446, out., 2015.
- [5] BARAR, J.; JAVADZADEH, A. R.; OMIDI, Y. Ocular novel drug delivery: impacts of membranes and barriers. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, n. 5, p. 567-581, maio, 2008.
- [6] MANNERMAA, E.; VELLONEN, K.-S.; URTTI, A. Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: Emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 11, p. 1136-1163, nov., 2006.
- [7] ANTON, N.; VANDAMME, T. F. The universality of low-energy nano-emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, n. 1-2, p. 142-147, jul., 2009.

- [8] GALLARATE, M.; CHIRIO, D.; BUSSANO, R.; PEIRA, E.; BATTAGLIA, L.; BARATTA, F.; TROTTA, M. Development of O/W nanoemulsions for ophthalmic administration of timolol, *Intern. J. Pharm.*, 440, 126-134 (2013).
- [9] TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, maio, 2004.
- [10] KIM, Y. C.; CHIANG, B.; WU, X.; PRAUSNITZ, M. R. Ocular delivery of macromolecules. **Journal of Controlled Release**, v. 190, n. 1, p. 172-181, set., 2014.
- [11] ANUMOLU, S.; SINGH, Y.; GAO, D.; STEIN, S.; SINKO, J. Design and evaluation of novel fast forming pilocarpine-loaded ocular hydrogel for sustained pharmacological response. **Journal of Controlled Release**, v. 137, n. 2, p. 152-159, jul., 2009.
- [12] PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 3, p. 27-46, jul., 2000.
- [13] YORK, W. S.; VAN HALBEEK, H.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by ¹H-n.m.r. spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry. **Carbohydrate Research**, 200(1), p. 9-31, 1990.
- [14] SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; NISHINARI, K. Tailoring of xyloglucan properties using an enzyme. **Food Hydrocolloids**, 12(1), p. 25-28, 1998.
- [15] SILVA, L. F. C.; LEMOS-SENNA, E.; HALILA, S.; BORSALI, R. Thermo-responsive xyloglucan hydrogel to ophthalmic triamcinolone acetonide delivery. **Submitted to Journal of Controlled Release**, 2016.
- [16] DI COLO, G.; ZAMBITO, Y.; ZAINO, C.; SANSÒ, M. Selected polysaccharides at comparison for their mucoadhesiveness and effect on precorneal residence of different drugs in the rabbit model. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, n. 8, p. 941-949, 2009.
- [17] DILBAGHI, N.; KAUR, H.; AHUJA, M.; KUMAR, S. Evaluation of tropicamide-loaded tamarind seed xyloglucan nanoaggregates for ophthalmic delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 286-291, abr., 2013.

- [18] SILVA, L. F. C.; LEMOS-SENNA, E. Development of triamcinolone acetonide-loaded nanoemulsion to ophthalmic drug delivery. **Latin American Journal of Pharmacy**, 2016.
- [19] BRUN-GRAEPI, A. K. A. S.; RICHARD, C.; BESSODES, M.; SCHERMAN, D.; NARITA, T.; DUCOURET, G.; MERTEN, O.-W. Study on the sol-gel transition of xyloglucan hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, 80(2), p; 555-562, 2010.
- [20] NISBET, D. R.; CROMPTON, K. E.; HAMILTON, S. D. ; SHIRAKAWA, S. ; PRANKERD, R. J.; FINKELSTEIN, D. I.; HORNE, M. K.; FORSYTHE, J. S. Morphology and gelation of thermosensitive xyloglucan hydrogels. **Biophysical Chemistry**, 121(1), p. 14-20, 2006.
- [21] PAULSSON, M.; HÄGERSTRÖM, H.; EDSMAN, K. Rheological studies of the gelation of deacetylated gellan gum (Gelrite®) in physiological conditions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 9(1), p. 99-105, 1999.
- [22] SRIAMORNSAK, P.; WATTANAKORN, N. Rheological synergy in aqueous mixtures of pectin and mucin. **Carbohydrate Polymers**, 74(3), p. 474-481, 2008.
- [23] ABREGO, G.; ALVARADO, H.; SOUTO, E. B.; GUEVARA, B.; BELLOWA, L. H.; PARRA, A.; CALPENA, A.; GARCIA, M. L. Biopharmaceutical profile of pranoprofen-loaded PLGA nanoparticles containing hydrogels for ocular administration. **Biopharmaceutics**, v. 95, part B, p. 261-270, set., 2015.
- [24] ARAÚJO, J.; GARCIA, M. L.; MALLANDRICH, M.; SOUTO, E. B.; CALPENA, A. C. Release profile and transscleral permeation of triamcinolone acetonide loaded nanostructured lipid barriers (TA-NLC): *in vitro* and *ex vivo* studies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 6, p. 1034-1041, ago., 2012.
- [25] PEScina, S.; GOVONI, P.; POTENZA, A.; PADULA, C.; SANTI, P.; NICOLI, S. Development of a convenient *ex vivo* model for the study of the transcorneal permeation of drugs: Histological and permeability evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 1, p. 63-71, jan., 2015.
- [26] KLANG, V.; VALENTA, C. Lecithin-based nanoemulsions. **Journal of Drug Delivery Science Technology**, v. 21, n. 1, p. 55-76, 2011.
- [27] MAZZARINO, L.; TRAVELET, C.; ORTEGA-MURILLO, S.; OTSUKA, I.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; LEMOS-SENNA, E.; BORSALI, R. Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 370, n. 1, p. 58-66, mar.; 20120.
- [28] SANTANDER-ORTEGA, M. J.; CSABA, N.; ALONSO, M. J.; ORTEGA-VINUESA, J. L.; BASTOS-GONZÁLEZ, D. Stability and physicochemical characteristics of PLGA, PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend

nanoparticles: A comparative study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 296, n. 1-3, p. 132-140, mar., 2007.

[29] KLANG, V.; MATSKO, N. B.; VALENTA, C.; HOFER, F. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, v. 43, n. 2-3, p. 85-103, fev., 2012.

[30] NOBBMANN, U.; MORFESIS, A. Light scattering and nanoparticles. **Materials Today**, v. 12, n. 5, p. 52-54, maio, 2009.

[31] TODARO, S.; CISPENZA, C.; SABATINO, M. A.; ORTORE, M. G.; PASSANTINO, R.; BIAGIO, P. L. S.; BULONE, D. Temperature-induced self-assembly of degalactosylated xyloglucan at low concentration. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, n. 53, n. 24, p. 1727-1735, dez., 2015.

[32] HÄGERSTRÖM, H.; PAULSSON, M.; EDSMAN, K. Evaluation of mucoadhesion for two polyelectrolyte gels in simulated physiological conditions using a rheological method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 301-309, jan., 2000.

[33] SERRA, L.; DOMÉNECH, J.; PEPPAS, N. A. Engineering design and molecular dynamics of mucoadhesive drug delivery systems as targeting agents. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 519-528, mar., 2009.

[34] HAO, J.; WANG, X.; BI, Y.; TENG, Y.; WANG, J.; LI, F.; LI, Q.; ZHANG, J.; GUO, F.; LIU, J. Fabrication of a composite system combining solid lipid nanoparticles and thermosensitive hydrogel for challenging ophthalmic drug delivery. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 114, n. 1, p. 111-120, fev., 2014.

[35] PARRA, A.; MALLANDRICH, M.; CLARES, B.; EGEA, M. A.; SPINA, M.; GARCÍA, M. L.; CALPENA, C. A. Design and elaboration of freeze-dried PLGA nanoparticles for the transcorneal permeation of carprofen: Ocular anti-inflammatory applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 935-943, dez., 2015.

[36] GHELARDI, E.; TAVANTI, A.; CELANDRONI, F.; LUPETTI, A.; BLANDIZZI, C.; BOLDRINI, E.; CAMPA, M.; SENESI, S. Effect of a novel mucoadhesive polysaccharide obtained from tamarind seeds on the intraocular penetration of gentamicin and ofloxacin in rabbits. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 831-834, nov., 2000.

[37] GHELARDI, E.; TAVANTI, A.; DAVINI, P.; CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; PARISIO, E.; BOLDRINI, E.; SENESI, S.; CAMPA, M. A mucoadhesive polymer extracted from tamarind seed improves the intraocular penetration and efficacy of rufloxacin in topical treatment of experimental bacterial keratitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3396-3401, set., 2004.

DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho foram desenvolvidos hidrogéis termosensíveis e mucoadesivos de xiloglucana contendo nanoemulsão para liberação ocular de triancinolona acetona visando o aumento do tempo de residência da formulação na superfície ocular, redução e dos efeitos pré-corneais, para conseqüentemente elevar a biodisponibilidade ocular do glicocorticoide visando o aprimoramento do potencial terapêutico no tratamento da uveíte. Para tanto foram desenvolvidas e caracterizadas nanoemulsões contendo triancinolona acetona, hidrogéis termosensíveis de xiloglucana através da degalactosilação parcial do polissacarídeo, avaliado o potencial de incorporação das nanoemulsões nos hidrogéis, seu potencial mucoadesivos e o perfil de permeação transcorneal da triancinolona acetona a partir do sistema proposto.

Nanoemulsões contendo triancinolona acetona (NE_{TA}) foram desenvolvidas através do método de emulsificação espontânea e foi avaliado a influência da variação: da razão volumétrica entre a fase orgânica e a fase aquosa (FO:FA); da massa de óleo utilizada; da massa de lecitina de soja; e da concentração de Poloxamer 188 na fase aquosa sobre as propriedades físico-químicas das nanoemulsões e do teor de triancinolona acetona nos nanocarreadores, quantificado a partir de metodologia previamente validada (Apêndice I).

Pôde-se observar que o aumento do volume da fase orgânica proporcionou uma leve redução do diâmetro das gotículas e uma proeminente redução do índice de polidispersão (PDI) quando a proporção de fase oleosa foi elevada até 1:3,3. No entanto, a adição de maiores volumes de etanol, até a proporção de 1:2,5 proporcionou o colapso do sistema nanoemulsionado, que rapidamente coalesceu, provavelmente devido à menor difusão do etanol na fase aquosa, favorecendo o processo de maturação de Ostwald (ANTON; VANDAMME, 2000; SABERI; FANG; MCCLEMENTS, 2013). O aumento da fase oleosa até proporção de FO:FA de 1:3,3 ainda foi capaz de proporcionar elevação do teor de triancinolona acetona nas nanoemulsões, provavelmente devido à maior solubilização do fármaco na fase oleosa. Neste estudo, as formulações preparadas com maiores concentrações de lecitina de soja apresentaram maiores teores de fármaco, possivelmente em razão

do aumento da solubilidade da triancinolona acetona na mistura do MCT com lecitina de soja (CHU et al., 2014; SAKEENA et al., 2011). Sendo assim, devido ao menor diâmetro das nanoemulsões, menor PDI e maior teor, a proporção de FO:FA 1:3,3 (v/v) foi selecionada para a avaliação do efeito da massa inicial de lipídeo sobre as propriedades das nanoemulsões.

Foi verificado que com o aumento da massa de lipídeo de 50 para 200 mg não houve alteração estatisticamente significativa ($p > 0,05$) no diâmetro e PDI das nanoemulsões. Em contrapartida, um aumento significativo pôde ser observado no teor e na eficiência de encapsulação, provavelmente relacionado a maior capacidade de solubilização do fármaco na porção lipídica. No entanto, quando as nanoemulsões foram preparadas com 300 mg de MCT houve um aumento significativo do diâmetro e do PDI dos carreadores, indicando que a melhor condição de preparo das nanoemulsões seria com a adição de 200 mg de MCT e proporção da FO:FA de 1:3,3.

Nanoemulsões preparadas nas condições otimizadas de proporção de FO:FA e de massa de MCT contendo 10 ou 20 mg de lecitina de soja, e 0,1 ou 0,25 % (m/V) de Poloxamer 188 na fase aquosa foram avaliadas quanto a estabilidade física frente ao armazenamento a 4 e 25 °C. Quando armazenadas a 4 °C, as nanoemulsões não demonstraram variação quanto ao diâmetro das gotículas, PDI, potencial zeta, teor e eficiência de encapsulação da triancinolona acetona.

No entanto, quando o ensaio fora conduzido a 25 °C, as nanoemulsões preparadas com 20 mg de lecitina de soja apresentaram um aumento do diâmetro das gotículas no 60º dia de armazenamento, enquanto aquelas preparadas com menor concentração do tensoativo hidrofóbico apresentaram pequena variação de tamanho. Este fator pode estar relacionado ao aumento da densidade das gotículas, que tende a elevar a probabilidade de cremagem e/ou coalescência das nanoemulsões. O aumento da densidade das gotículas tende a reduzir o movimento Browniano, e conseqüentemente facilitar a agregação de gotículas, com conseqüente formação de glóbulos maiores e mais densos até que haja ruptura do filme líquido, havendo separação de fases (MCCLEMENTS, 2011; TADROS et al., 2004; TAYLOR, 1998).

Todas as formulações apresentaram aumento no PDI e redução do potencial zeta quando armazenadas a 25 °C, indicando que a formação de um sistema mais

heterogêneo com menor repulsão eletrostática pode estar relacionada com o fenômeno de coalescência das nanoemulsões. A redução do potencial zeta pode estar relacionada a redução da razão de carga por área da gotícula, onde o aumento do diâmetro, com conseqüente elevação da área superficial dos carreadores, tende a reduzir a distribuição das cargas na superfície das gotículas (ARJMANDI et al., 2012; TANTRA; SCHULZE; QUINCEY, 2010).

Todas as formulações coalesceram após 90 dias de armazenamento a 25 °C, e o teor de triancinolona acetona nas nanoemulsões permaneceu inalterado durante o período do experimento, indicando estabilidade química do fármaco na condição avaliada, no entanto, redução da eficiência de encapsulação foi observada, indicando que durante o processo de coalescência o fármaco é parcialmente expulso do interior das nanoemulsões. É possível que esta redução de eficiência de encapsulação ocorra devido a presença do tensoativo Poloxamer 188 elevar a solubilidade do fármaco na porção aquosa.

O perfil de liberação da triancinolona acetona em meio lacrimal simulado a partir das nanoemulsões também foi verificado utilizando metodologia analítica validada conforme Apêndice I. Observou-se que o fármaco foi rapidamente liberado a partir de todas as formulações avaliadas, apresentando completa liberação após 2 horas de experimento. As amostras preparadas com maior concentração de lecitina de soja apresentaram maior eficiência de dissolução, provavelmente devido ao aumento da associação do fármaco na camada de fosfolípido. A acelerada liberação do fármaco pode ser interessante para a via de administração ocular, sobretudo em razão dos efeitos pré-corneais. Sendo assim, nanoemulsões estáveis a 4 °C foram preparadas com sucesso utilizando o método de emulsificação espontânea, e suas propriedades físico-químicas e de teor puderam ser otimizadas através da adequação da proporção da FO:FA e da massa de MCT utilizada no preparo do sistema coloidal.

Para o desenvolvimento dos hidrogéis termosensíveis de xilogucana fez-se necessário a modificação enzimática do polissacarídeo através da remoção parcial dos resíduos laterais de galactose, uma vez que a xilogucana não-modificada não apresenta propriedade termosensível e/ou de formação de géis. (SHIRAKAWA;

YAMATOYA; NISHINARI, 1998). Desta forma, primeiramente foi avaliada a cinética de remoção de galactose utilizando a enzima β -galactosilase (*Aspergillus. oryzae*), verificando rápida atividade da enzimática nas primeiras 12 horas de reação, alcançando 42 % de remoção de galactose. Posteriormente uma menor razão de remoção de galactose se estende até 32 horas, quando cerca de 50 % da galactose é removida. Observa-se que a enzima atua principalmente nos oligossacarídeos que apresentam duas moléculas de galactose laterais (XLLG), os convertendo diretamente a XXXG, sem alterar consideravelmente a proporção dos oligossacarídeos XLXG e XXLG. Este fenômeno pode estar relacionado à configuração enovelada dos octa- e heptassacarídeos, que dificulta o acesso da enzima aos resíduos de galactose (YAMANAKA et al., 1999).

Soluções aquosas de xiloglucana apresentando 50 % de grau de degalactosilação (Deg⁵⁰-XG) foram preparadas em diferentes concentrações visando a determinação das melhores propriedades reológicas e de liberação da triancinolona acetona, e verificou-se que com o aumento da concentração do polímero de 1,5 para 3,0 % (m/V) houve uma redução da temperatura de transição sol-gel de $36,4 \pm 0,7$ °C para $24,7 \pm 0,1$ °C (Tabela 1).

A elevação da concentração de Deg⁵⁰-XG possivelmente implica no aumento da probabilidade de interações entre as cadeias do polissacarídeo (MIYAZAKI et al., 1998; NISBET et al., 2006). A histerese existente entre os ciclos de aquecimento e resfriamento pode estar relacionada à agregação de cadeias rígidas de polímero e existência de agregados ou interações fracas entre as cadeias que apresentam cinética de associação e dissociação diferentes (BRUN-GRAEPPI et al., 2010; FANG; NISHINARI, 2004; LI et al., 2001). O aumento da concentração também proporcionou a redução do tempo necessário para gelificação quando a temperatura é mantida constante a 35 °C, sendo que as amostras preparadas em concentrações de 2,0 e 2,5 % apresentam transição do estado sol para o estado gel após 98 segundos, enquanto o aumento da concentração para 3,0 % (m/V) acelera a gelificação, que ocorre em 68 segundos.

Tabela 1 – Parâmetros reológicos para as diferentes concentrações de Deg⁵⁰-XG na temperatura de 35 °C, temperatura de transição sol-gel e tempo para transição a 35°C.

Concentração de Deg ⁵⁰ -XG (% m/V)	G' a 35 °C (Pa)	G'' a 35 °C (Pa)	tan δ	Temperatura de transição sol-gel (°C)	Tempo de transição sol-gel a 35 °C (s)
1,5	0,1544	0,3378	2,188	36,4 ± 0,7	N.O.*
2,0	38,77	1,449	0,03738	28,8 ± 0,3	98
2,5	56,87	2,648	0,04655	25,9 ± 0,4	98
3,0	204,8	5,538	0,02704	24,7 ± 0,1	68

*N.O. significa não observado.

A $\tan \delta$ é um indicador global da viscoelasticidade da amostra, sendo uma medida da razão entre a energia perdida e da energia armazenada em um ciclo oscilatório (Equação 1). Sendo assim, quando $\tan \delta > 1$, pode-se verificar um predomínio do caráter viscoso na formulação, e quando $\tan \delta < 1$, o sistema tende a assumir característica elástica (MADSEN; EBERTH; SMART, 1998; SRIAMOMSAK; WATTANAKORN, 2008). Os hidrogéis preparados na concentração de 3,0 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG apresentam valores de $\tan \delta$, a 35 °C, inferiores ao hidrogéis preparados nas concentrações de 2,5; 2,0 e 1,5 % (m/V) (Tabela 1) evidenciando seu caráter mais elástico que os demais hidrogéis na temperatura de 35 °C. A maior elasticidade pode estar relacionada ao maior número de interações intermoleculares de xiloglucana degalactosilada, conferindo maior rigidez ao hidrogel.

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (1)$$

onde G'' é módulo de perda e G' é o módulo de armazenamento

Adicionalmente, através do ensaio de liberação da triancinolona acetona (metodologia analítica validada de acordo com Apêndice I), pode-se verificar que o fármaco é completamente liberado após 6 horas, e que a eficiência de dissolução é dependente da concentração do polímero, onde o aumento da concentração implica no maior controle de liberação do corticosteroide. Através da avaliação do

mecanismo de liberação do fármaco, aplicando diferentes modelos matemáticos, observou-se indícios de que o aumento da concentração do polímero reduza a penetração de água no hidrogel, diminuindo a liberação dirigida pelo mecanismo de difusão, indicando que o menor relaxamento das cadeias do polissacarídeo tende a elevar o controle de liberação da triancinolona a partir dos hidrogéis de Deg⁵⁰-XG (SIEPMANN; PEPPAS, 2001).

Sendo assim, para os experimentos posteriores foi selecionada a solução preparada na concentração de 3,0 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG dada a menor temperatura de transição sol-gel, e principalmente devido ao menor tempo requerido para gelificação a 35 °C, e maior caráter elástico, culminando em um maior potencial de redução dos efeitos pré-corneais na remoção da forma farmacêutica da superfície ocular.

Diferentes proporções em volumes de solução 3,0 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG:Nanoemulsão foram avaliadas reologicamente, e verificou-se que há um aumento da temperatura de transição sol-gel a medida que nanoemulsão é adicionada à solução de polissacarídeo, sendo que na proporção de 1:1,50 (v/v) a temperatura de transição foi elevada a 32,8 °C, enquanto sem adição da nanoemulsão a transição ocorria a 24,7 °C . O efeito da diluição da solução polimérica devido à adição de diferentes volumes de nanoemulsão afetou também o tempo necessário para formação do hidrogel a 35 °C, sendo que as amostras preparadas na proporção de 1:1 e 1:1,25 transitaram do estado sol para o estado gel em aproximadamente 2 minutos, enquanto a amostra preparada na proporção 1:1,5 necessitou de aproximadamente de 4,5 minutos para gelificar.

Na sequência, a propriedade mucoadesivas dos sistemas propostos foi avaliada através da avaliação da sinergia reológica entre a mucina e as formulações. Sistemas mucoadesivos incorporados à suspensões de mucina possuem a capacidade de elevar a resistência à deformação quando comparando com a suspensão de mucina e com a sistema mucoadesivos, separadamente. Para tanto, propôs-se que este fenômeno, denominado sinergismo reológico, pode ser uma ferramenta importante para determinar a força da interação mucoadesivas (MADSEN; EBERTH; SMART, 1998). O sinergismo reológico foi evidenciado para diferentes materiais mucoadesivos, sobretudo, avaliando as alterações no módulo elástico (ou armazenamento) (G'), módulo viscoso (ou perda) (G''), e/ou na tangente

de perda ($\tan \delta$) dos sistemas, através da diferença entre a somatória dos parâmetros do polímero e da mucina, com o parâmetro obtido através da análise reológica da mistura entre polímero e mucina, nas mesmas concentrações (MADSEN; EBERTH; SMART, 1998; RILEY et al., 2001; SRIAMOMSAK; WATTANAKORN, 2008).

Neste trabalho fora avaliado, primeiramente o efeito da alteração do módulo elástico (G') como parâmetro de avaliação do potencial mucoadesivos do hidrogel de xiloglucana contendo nanoemulsões. Quando avaliado o efeito da adição de nanoemulsão na propriedade mucoadesiva, pode-se observar que a adição de nanoemulsões reduziu gradativamente a mucoadesão da solução de Deg⁵⁰-XG, avaliada a 10 °C, possivelmente devido ao efeito de diluição da solução polimérica. No entanto, quando a mucoadesão foi avaliada no estado gel, a 35 °C foi observada uma elevação da mucoadesão quando a nanoemulsão foi adicionada até a proporção solução 3,0 % (m/V) Deg⁵⁰-XG:Nanoemulsão de 1:0,75 (v/v), seguido de uma redução quando a proporção 1:1 (v/v) foi avaliada. No entanto, a proporção 1:1 apresentou propriedade mucoadesiva semelhante àquela observada nas soluções 3,0 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG na ausência de nanoemulsão. A subsequente adição de nanoemulsão em maiores proporções levou à redução da mucoadesão do sistema. Sendo assim, as amostras preparadas na proporção 1:1 (v/v) foram selecionadas para os ensaios de permeação transcorneal.

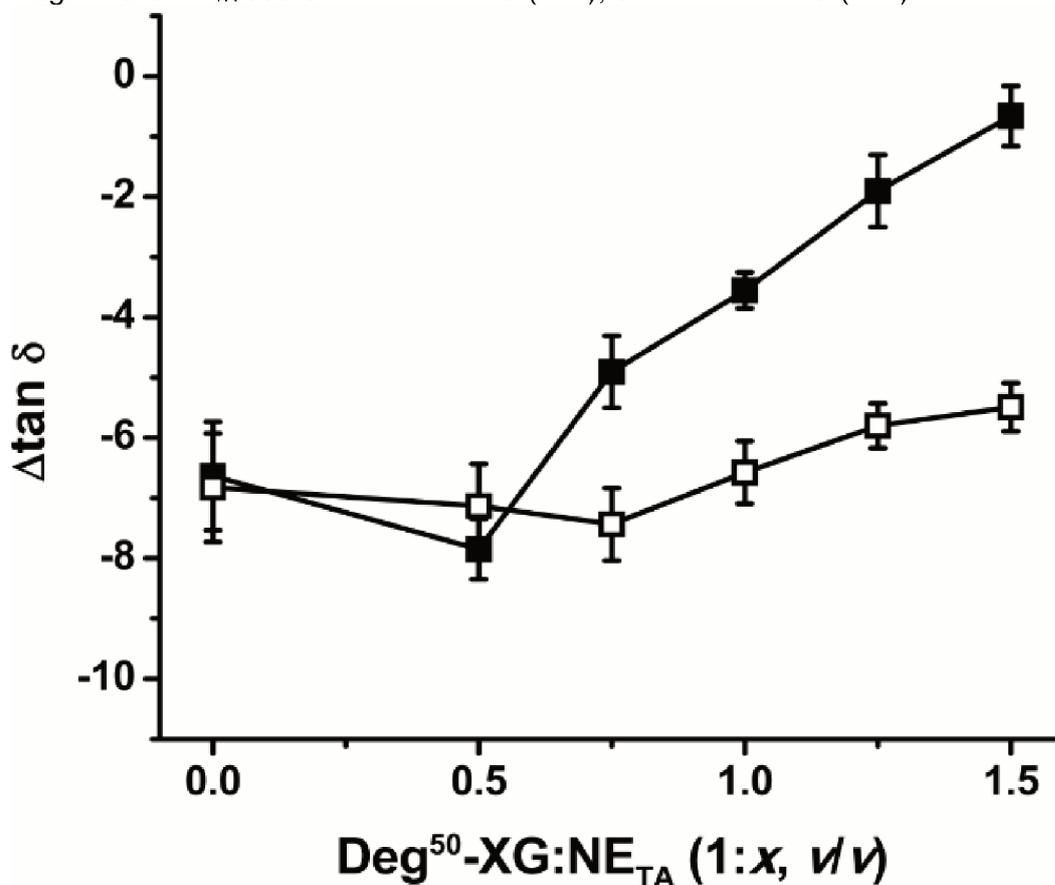
A natureza viscoelástica das formulações, da mucina e da mistura entre as formulações e mucina também pôde ser avaliada através da tangente de perda ($\tan \delta$). A fim de avaliar os efeitos da adição de diferentes volumes de nanoemulsão em uma solução 3,0 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG sobre a capacidade de interação com a mucina, a $\tan \delta$ foi utilizada como uma ferramenta de avaliação dos módulos elástico e viscoso, simultaneamente. A $\Delta \tan \delta$ foi calculada de acordo com a Equação 2, como a diferença entre a $\tan \delta$ obtida experimentalmente, na mistura da formulação com a mucina, com a somatória da $\tan \delta$ obtida, separadamente, para a formulação e para a mucina.

$$\Delta \tan \delta = \tan \delta_{f-m} - (\tan \delta_f + \tan \delta_m) \quad (2)$$

onde $\Delta \tan \delta$ é a tangente de perda relativa à interação, $\tan \delta_{f-m}$ é a tangente de perda obtida experimentalmente com a mistura entre formulação e mucina, $\tan \delta_f$ relativa a formulação isoladamente, e $\tan \delta_m$ à mucina.

Observa-se, na Figura 1, que independentemente do estado solução ou gel (10 ou 35 °C, respectivamente) as formulações apresetam valores de $\Delta \tan \delta < 0$, indicando que $\tan \delta_{f-m} < (\tan \delta_f + \tan \delta_m)$. A redução de $\tan \delta_{f-m}$ está relacionada à elevação de G' devido interação entre as cadeias de Deg⁵⁰-XG e mucina. Um aumento em G'' também pode ser observado na mistura da formulação com a mucina, no entanto este evento ocorre com menor magnitude.

Figura 1. Efeito da razão volumétrica (v/v) entre uma solução aquosa a 3.0% (m/V) de Deg⁵⁰-XG e NE_{TA} sobre $\Delta \tan \delta$ a 10 °C (—■—), e $\Delta \tan \delta$ a 35 °C (—□—).



Pode-se observar a medida que se aumenta o volume de nanoemulsão incorporado na solução de Deg⁵⁰-XG existe um aumento no valor de $\Delta \tan \delta$, sobretudo quando a formulação é avaliada a 10 °C. Este fenômeno está relacionado ao efeito diluição provocado pelo aumento da fração volumétrica das nanoemulsões, que eleva o módulo viscoso de forma mais acentuada que o módulo elástico, caracterizando uma redução da interação Deg⁵⁰-XG-mucina.

A 35 °C observa-se primeiramente uma redução de $\Delta \tan \delta$, alcançando o valor mínimo quando a proporção de Deg⁵⁰-XG:NE_{TA} de 1:0.75 (v/v) foi empregada, seguido de um leve aumento de $\Delta \tan \delta$ com a incorporação de maiores proporções de nanoemulsões. A fim de comparar as curvas de $\Delta \tan \delta$ a 10 e 35 °C foi realizada análise de regressão linear excluindo os valores de Deg⁵⁰-XG, evitando que se force a passagem pelo zero da curva, e pode-se obter para a temperatura de 10 °C uma equação da reta onde $y = 0,5412x - 0,8829$ ($r = 0,9922$); enquanto para a temperatura de 35 °C a equação da reta foi $y = 0,2236x - 1,0698$ ($r = 0,9862$). Através da correlação linear pode-se inferir que o aumento da fração volumétrica de nanoemulsão incorporada à solução de Deg⁵⁰-XG reduz a elasticidade do sistema no estado solução de forma mais acentuada que no estado hidrogel.

Os resultados observados através da avaliação de $\Delta G'_{\text{relativo}}$ e $\Delta \tan \delta$ corroboram evidenciando a existência de interação entre a xiloglucana e a mucina, e que esta interação é dependente do volume de nanoemulsão adicionado ao sistema Deg⁵⁰-XG:NE_{TA}. Para tanto, a proporção volumétrica de solução aquosa 3 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG:NE_{TA} de 1:1 (v/v) foi selecionada, uma vez que é o sistema que permite a incorporação da maior carga de nanoemulsão mantendo a temperatura de transição sol-gel próxima a 30 °C, inferior à temperatura da superfície ocular, mantendo tempo de gelificação a 35 °C próximo a 2 minutos, com propriedade mucoadesivas semelhante ao hidrogel avaliado na ausência de nanoemulsões.

Para avaliação das propriedades de permeação transcorneal da triancinolona acetona em modelo *in vitro* utilizando córnea suína foram comparados os perfis da nanoemulsão, dos hidrogel preparado com 3 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG, e o hidrogel contendo nanoemulsão na proporção volumétrica 1:1 (validação de metodologia analítica apresentada no Apêndice I). Observou-se a nanoemulsão proporcionou

uma menor taxa de permeação transcorneal do fármaco. Aparentemente, a xiloglucana aprimora o fluxo da triancinolona acetonida através da córnea, sendo que a constante de permeação (k_p) é aumentada quando os hidrogéis contendo nanoemulsão são avaliados, assim como o tempo de latência, provavelmente por causa da necessidade do fármaco em ser liberado a nanoemulsão e posteriormente atravessar a barreira promovida pela matriz polimérica até alcançar a córnea.

Sendo assim, os hidrogéis de Deg⁵⁰-XG contendo nanoemulsão na proporção 1:1 (v/v) podem atuar promovendo a permeação da triancinolona através da córnea ao passo que exercem promoção da retenção do fármaco no interior do tecido corneal, atuando como um reservatório para liberação controlada do fármaco para a câmara posterior. Desta forma, o sistema proposto permite a administração do fármaco de forma eficiente na câmara anterior do globo ocular, podendo ser utilizado no tratamento de doenças como a uveíte anterior, ao passo é promissor, também, para o tratamento da uveíte posterior. No entanto, ressalta-se a necessidade de estudos mais detalhados de permeação ocular do sistema proposto, bem como avaliação em modelo *in vivo* de uveíte para verificar o potencial terapêutico do sistema desenvolvido.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As nanoemulsões contendo triancinolona acetonida foram satisfatoriamente preparadas pelo método de emulsificação espontânea.
- O aumento do volume da fase oleosa, utilizando proporção volumétrica entre a fase oleosa e a fase aquosa (FO:FA) de 1:3,3, apresentou a tendência de reduzir o diâmetro das gotículas da nanoemulsão, ao passo que proporcionou a formação de uma sistema menos polidisperso, além de conferir maior teor de triancinolona acetonida às nanoemulsões.
- O aumento da massa de óleo utilizado no preparo das nanoemulsões apresentou a tendência de elevar o teor de fármaco nas nanoemulsões, e a eficiência de encapsulação, provavelmente pela melhor solubilização da triancinolona acetonida nas gotículas da nanoemulsão.
- A concentração de lecitina de soja e de Poloxamer 188 parece possuir pouca influência sobre as propriedades físico-químicas das nanoemulsões. Porém, nanoemulsões preparadas com 20 mg de lecitina de soja tendem a apresentar valores de teor e eficiência de encapsulação levemente maiores.
- As nanoemulsões permaneceram estáveis frente ao armazenamento a 4 °C por período igual a 150 dias, apresentando pouca ou nenhuma alteração das propriedades físico-química e de teor de fármaco.
- No entanto, as nanoemulsões apresentaram fenômeno de cremagem após 90 dias de armazenamento a 25 °C, indicando sua instabilidade frente à temperatura. As nanoemulsões preparadas com 20 mg de lecitina de soja apresentaram um aumento mais pronunciado do diâmetro das gotículas, enquanto o índice de polidispersão e o potencial zeta de todas as formulações foi elevado ao longo do período de armazenamento.
- Apesar da pouca variação do teor de triancinolona acetonida durante o período de armazenamento a 25 °C, pôde-se observar uma redução da eficiência de encapsulação a partir do 45° dia para as formulações preparadas com maiores concentrações de Poloxamer 188.
- As nanoemulsões apresentaram rápida liberação de triancinolona acetonida, com mais de 80 % do fármaco liberado nas primeiras 2 horas. O aumento da concentração de lecitina de soja na fase oleosa tende a elevar a eficiência de

dissolução das nanoemulsões, possivelmente pela presença de fármaco associado na camada de tensoativo hidrofóbico na superfície das gotículas.

- Neste sentido, a formulação NE II_{200/1:3.3} parece ser mais promissora, sobretudo por conciliar menor diâmetro das gotículas, baixo índice de polidispersão, potencial zeta adequado, e maiores índices de teor, eficiência de encapsulação, e eficiência de dissolução da triancinolona acetona.
- Utilizando a enzima β -galactosilase foi possível, em um período de 32 horas, remover aproximadamente 50 % dos resíduos de laterais de galactose presentes na xiloglucana, Deg⁵⁰-XG.
- Soluções aquosas de Deg⁵⁰-XG apresentaram temperatura de transição sol-gel inversamente proporcionais à concentração do polímero em solução, sendo reduzidas de $36,4 \pm 0,7$ °C para $24,7 \pm 0,1$ °C quando a concentração é elevada de 1,5 % para 3,0 % (m/V), respectivamente.
- Com a avaliação do mecanismo de liberação de triancinolona acetona a partir dos hidrogéis de Deg⁵⁰-XG em diferentes concentrações, pode-se verificar que com o aumento da concentração do polímero existe uma redução da difusão do fármaco a partir da matriz polimérica, e que a liberação do fármaco parece ser mediada pelo relaxamento das cadeias rígidas do polímero.
- O hidrogel termosensível preparado na concentração de 3,0 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG apresentou menor temperatura de transição sol-gel, formação de gel mais rápida em temperatura constante de 35 °C, maiores valores de módulo elástico, e maior capacidade de controle de liberação da triancinolona acetona.
- Para o preparo dos hidrogéis termosensíveis de xiloglucana contendo nanoemulsão foi utilizada a formulação NE II_{200/1:3.3}, incorporada em soluções 3,0 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG.
- A adição de volumes diferentes de nanoemulsão nas soluções de Deg⁵⁰-XG elevou a temperatura de transição sol-gel do sistema e o tempo requerido para formação do gel na temperatura de 35 °C. Sendo as amostras preparadas com a adição de nanoemulsões até proporções volumétricas de 1:1,25 de Solução 3,0 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG: Nanoemulsão apresentaram valores de temperatura de gelificação inferior a 35 °C e tempo de gelificação adequado para retenção da forma farmacêutica na superfície do olho.

- A adição de nanoemulsão às soluções de Deg⁵⁰-XG reduzem a mucoadesão no estado solução (10 °C). No entanto, quando a mucoadesão é avaliada no estado gel (35 °C), a interação entre Deg⁵⁰-XG e a mucina é elevada. Razões volumétricas de Solução 3,0 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG:Nanoemulsão superiores a 1:1 (v/v) induzem a redução da mucoadesão do gel, quando comparado com o hidrogel na ausência de nanoemulsão.

- Considerando as propriedades reológicas e o efeito sobre a mucoadesão da Deg⁵⁰-XG, a proporção da Solução 3,0 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG:Nanoemulsão 1:1 (v/v) foi selecionada como o melhor sistema para liberação de triancinolona acetona.

- Comparando as propriedades de permeação transcorneal da triancinolona acetona utilizando: (1) nanoemulsão, (2) hidrogel de Deg⁵⁰-XG, e (3) hidrogel de Deg⁵⁰-XG:Nanoemulsão 1:1 (v/v), observou-se que a Deg⁵⁰-XG é capaz de aprimorar o fluxo da triancinolona acetona através da córnea.

- A retenção da triancinolona acetona no interior do tecido corneal é aumentada significativamente ($p < 0,05$) pela presença da Deg⁵⁰-XG, e maximizada quando o hidrogel termosensível contendo nanoemulsão é utilizado.

A capacidade de reter triancinolona acetona no interior da córnea pode ser de grande importância, primeiramente por proporcionar elevação da concentração de triancinolona na córnea, podendo ser uma ferramenta interessante no tratamento de uveíte anterior. Adicionalmente, a retenção do fármaco na córnea pode proporcionar a permeação controlada da triancinolona acetona através do tecido, podendo ser uma estratégia vantajosa para o tratamento de uveíte posterior.

- As nanoemulsões contendo triancinolona acetona foram satisfatoriamente preparadas pelo método de emulsificação espontânea.

- O aumento do volume da fase oleosa, utilizando proporção volumétrica entre a fase oleosa e a fase aquosa (FO:FA) de 1:3,3, apresentou a tendência de reduzir o diâmetro das gotículas da nanoemulsão, ao passo que proporcionou a formação de um sistema menos polidisperso, além de conferir maior teor de triancinolona acetona às nanoemulsões.

- O aumento da massa de óleo utilizado no preparo das nanoemulsões apresentou a tendência de elevar o teor de fármaco nas nanoemulsões, e a eficiência de

encapsulação, provavelmente pela melhor solubilização da triancinolona acetona nas gotículas da nanoemulsão.

- A concentração de lecitina de soja e de Poloxamer 188 parece possuir pouca influência sobre as propriedades físico-químicas das nanoemulsões. Porém, nanoemulsões preparadas com 20 mg de lecitina de soja tendem a apresentar valores de teor e eficiência de encapsulação levemente maiores.
- As nanoemulsões permaneceram estáveis frente ao armazenamento a 4 °C por período igual a 150 dias, apresentando pouca ou nenhuma alteração das propriedades físico-química e de teor de fármaco.
- No entanto, as nanoemulsões apresentaram fenômeno de cremagem após 90 dias de armazenamento a 25 °C, indicando sua instabilidade frente à temperatura. As nanoemulsões preparadas com 20 mg de lecitina de soja apresentaram um aumento mais pronunciado do diâmetro das gotículas, enquanto o índice de polidispersão e o potencial zeta de todas as formulações foi elevado ao longo do período de armazenamento.
- Apesar da pouca variação do teor de triancinolona acetona durante o período de armazenamento a 25 °C, pôde-se observar uma redução da eficiência de encapsulação a partir do 45º dia para as formulações preparadas com maiores concentrações de Poloxamer 188.
- As nanoemulsões apresentaram rápida liberação de triancinolona acetona, com mais de 80 % do fármaco liberado nas primeiras 2 horas. O aumento da concentração de lecitina de soja na fase oleosa tende a elevar a eficiência de dissolução das nanoemulsões, possivelmente pela presença de fármaco associado na camada de tensoativo hidrofóbico na superfície das gotículas.
- Neste sentido, a formulação NE II_{200/1:3.3} parece ser mais promissora, sobretudo por conciliar menor diâmetro das gotículas, baixo índice de polidispersão, potencial zeta adequado, e maiores índices de teor, eficiência de encapsulação, e eficiência de dissolução da triancinolona acetona.
- Utilizando a enzima β -galactosilase foi possível, em um período de 32 horas, remover aproximadamente 50 % dos resíduos de laterais de galactose presentes na xiloglucana, Deg⁵⁰-XG.
- Soluções aquosas de Deg⁵⁰-XG apresentaram temperatura de transição sol-gel inversamente proporcionais à concentração do polímero em solução, sendo

reduzidas de $36,4 \pm 0,7$ °C para $24,7 \pm 0,1$ °C quando a concentração é elevada de 1,5 % para 3,0 % (m/V), respectivamente.

- Com a avaliação do mecanismo de liberação de triancinolona acetona a partir dos hidrogéis de Deg⁵⁰-XG em diferentes concentrações, pode-se verificar que com o aumento da concentração do polímero existe uma redução da difusão do fármaco a partir da matriz polimérica, e que a liberação do fármaco parece ser mediada pelo relaxamento das cadeias rígidas do polímero.
- O hidrogel termosensível preparado na concentração de 3,0 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG apresentou menor temperatura de transição sol-gel, formação de gel mais rápida em temperatura constante de 35 °C, maiores valores de módulo elástico, e maior capacidade de controle de liberação da triancinolona acetona.
- Para o preparo dos hidrogéis termosensíveis de xiloglucana contendo nanoemulsão foi utilizada a formulação NE II_{200/1:3.3}, incorporada em soluções 3,0 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG.
- A adição de volumes diferentes de nanoemulsão nas soluções de Deg⁵⁰-XG elevou a temperatura de transição sol-gel do sistema e o tempo requerido para formação do gel na temperatura de 35 °C. Sendo as amostras preparadas com a adição de nanoemulsões até proporções volumétricas de 1:1,25 de Solução 3,0 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG:Nanoemulsão apresentaram valores de temperatura de gelificação inferior a 35 °C e tempo de gelificação adequado para retenção da forma farmacêutica na superfície do olho.
- A adição de nanoemulsão às soluções de Deg⁵⁰-XG reduzem a mucoadesão no estado solução (10 °C). No entanto, quando a mucoadesão é avaliada no estado gel (35 °C), a interação entre Deg⁵⁰-XG e a mucina é elevada. Razões volumétricas de Solução 3,0 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG:Nanoemulsão superiores a 1:1 (v/v) induzem a redução da mucoadesão do gel, quando comparado com o hidrogel na ausência de nanoemulsão.
- Considerando as propriedades reológicas e o efeito sobre a mucoadesão da Deg⁵⁰-XG, a proporção da Solução 3,0 % (m/V) de Deg⁵⁰-XG:Nanoemulsão 1:1 (v/v) foi selecionada como o melhor sistema para liberação de triancinolona acetona.

- Comparando as propriedades de permeação transcorneal da triancinolona acetona utilizando: (1) nanoemulsão, (2) hidrogel de Deg⁵⁰-XG, e (3) hidrogel de Deg⁵⁰-XG:Nanoemulsão 1:1 (v/v), observou-se que a Deg⁵⁰-XG é capaz de aprimorar o fluxo da triancinolona acetona através da córnea.
- A retenção da triancinolona acetona no interior do tecido corneal é aumentada significativamente ($p < 0,05$) pela presença da Deg⁵⁰-XG, e maximizada quando o hidrogel termosensível contendo nanoemulsão é utilizado.
- A capacidade de reter triancinolona acetona no interior da córnea pode ser de grande importância, primeiramente por proporcionar elevação da concentração de triancinolona na córnea, podendo ser uma ferramenta interessante no tratamento de uveíte anterior. Adicionalmente, a retenção do fármaco na córnea pode proporcionar a permeação controlada da triancinolona acetona através do tecido, podendo ser uma estratégia vantajosa para o tratamento de uveíte posterior.

**APÊNDICE A – VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
QUANTIFICAÇÃO DE TRIANCINOLONA ACETONIDA**

Visando determinar quantitativamente a triancinolona acetona para os ensaio de teor de TA nas nanoemulsões, ensaio de dissolução da TA a partir das nanoemulsões e a partir dos hidrogéis termosensíveis de xiloglucana, ensaio de permeação transcorneal, e determinação do percentual de TA retido no interior do tecido corneal, validações do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas conforme descrito na RE nº 899/2003 (ANVISA, 2003) e no guia Q2(1R) (ICH, 2005), considerando os parâmetros de especificidade, linearidade, limites de quantificação e detecção, precisão, exatidão e robustez.

Devido diferença nas características analíticas, dois métodos foram validados para determinação da triancinolona acetona, sendo apresentados como Método I e Método II. O Método I visa quantificar a TA quando o solvente acetonitrila é empregado, ou seja, nos ensaios de teor de fármaco nas nanoemulsões e no percentual de triancinolona acetona retido no interior da córnea após ensaio de permeação transcorneal. Enquanto o Método II objetiva contemplar as concentrações e as condições encontradas nos ensaios de liberação *in vitro* da TA, bem como a permeação transcorneal do fármaco, utilizando como diluente o tampão lacrimal simulado, pH 7,4, contendo 0,5 % (m/V) de laurilsulfato de sódio.

1 MÉTODO I

1.1 METODOLOGIA

1.1.1 Condição cromatográfica

As análises foram realizadas utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência PerkinElmer Series 200, hifenizado com detector UV, utilizando comprimento de onda de 240 nm. Para a metodologia analítica, que contempla os ensaios de teor e retenção de triancinolona acetonida no interior do tecido corneal, as amostras foram injetadas a um volume de 10 µL, eluindo com fase móvel isocrática composta de acetonitrila:água (6:4, v/v), utilizando fluxo de 1,0 mL/min, através de uma coluna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) e de uma pré-coluna C18. Para todas as análises, acetonitrila foi utilizada como diluente.

1.1.2 Especificidade

Para determinação da especificidade foram avaliados: diluente; extrato da nanoemulsão branca, extrato de córnea suína, solução padrão de triancinolona acetonida, extrato da nanoemulsão contendo triancinolona acetonida, e extrato da córnea suína contendo triancinolona acetonida incorporada. Nenhum sinal cromatográfico com área de pico superior a 0,5 % a área do pico da triancinolona acetonida foi tolerado.

Para extração da triancinolona acetonida das nanoemulsões, uma alíquota de 1 mL dos carreadores foi adicionado 2 mL de acetonitrila, e a extração foi realizada por agitação magnética durante 30 minutos. Posteriormente as soluções foram filtradas em membrana de PVDF com tamanho de poro de 0,45 µm e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

Para extração do fármaco retido no tecido corneal, uma córnea foi rasurada, adicionada em 5 mL de acetonitrila e submetida a extração sob agitação magnética

durante 1 hora. Então as soluções foram filtradas em membrana de PVDF com tamanho de poro de 0,45 µm e analisadas.

1.1.3 Linearidade e Limites de quantificação e de detecção

Para avaliação da linearidade do método foram preparadas soluções, em triplicata, nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; e 15,0 µg/mL utilizando acetonitrila como diluente. As soluções foram injetadas conforme descrito anteriormente. A linearidade e a equação da reta foram determinadas através da análise de regressão linear. As análises de teste F e teste de Cochran foram realizadas para determinação da significância da regressão e da homocedasticidade dos resíduos, respectivamente. Os critérios de aceitação foram $r \geq 0,99$, e desvio padrão relativo entre os coeficientes linear e angular da equação da reta iguais ou inferiores a 20 % (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Utilizando as equações de reta calculadas através da regressão linear para cada uma das três curvas realizadas, foram calculados os limites de quantificação e detecção através das Equações 1 e 2, respectivamente.

$$LQ = \frac{10s_{CL}}{A_{CA}} \quad (1)$$

$$LD = \frac{3,3s_{CL}}{A_{CA}} \quad (2)$$

onde s_{CL} é o desvio padrão do coeficiente linear, e A_{CA} o coeficiente angular médio das curvas de calibração.

1.1.4 Precisão

A precisão foi avaliada quanto à repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada através do preparo de soluções obtidas com a extração da triancinolona acetona a partir da nanoemulsão e da córnea suína. Cada amostra

foi preparada em sextuplicata ($n = 6$). Para avaliação da precisão intermediária, três amostras de cada um dos testes foram analisadas em três dias distintos. O método foi considerado preciso quando o desvio padrão relativo (DPR %) for igual ou inferior a 5 % (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

1.1.5 Exatidão

Para realização do ensaio de exatidão, foi realizado o processo de extração utilizando nanoemulsão branca, e córnea suína fresca, às respectivas amostras foram adicionadas alíquotas de uma solução estoque 100 µg/mL de triancinolona acetonida em três níveis; baixo, culminando em uma concentração final de 2,5 µg/mL; médio, concentração final de 5,0 µg/mL; e alto com concentração final de 10,0 µg/mL. As soluções foram preparadas em triplicata e o resultado expresso como recuperação da triancinolona acetonida, devendo permanecer na faixa de 90 a 110 % (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

1.1.6 Robustez

Para o ensaio de robustez, três amostras preparadas conforme descrito no parâmetro de precisão, amostras de triancinolona acetonida extraída a partir de nanoemulsões e a partir da córnea suína, foram avaliadas em triplicata, com alterações dos parâmetros cromatográficos listados na Tabela 1. Para tanto, o desvio padrão relativo não deve ser superior a 5 % para ambas amostras (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 1 – Parâmetros cromatográficos avaliados para determinação da robustez do método.

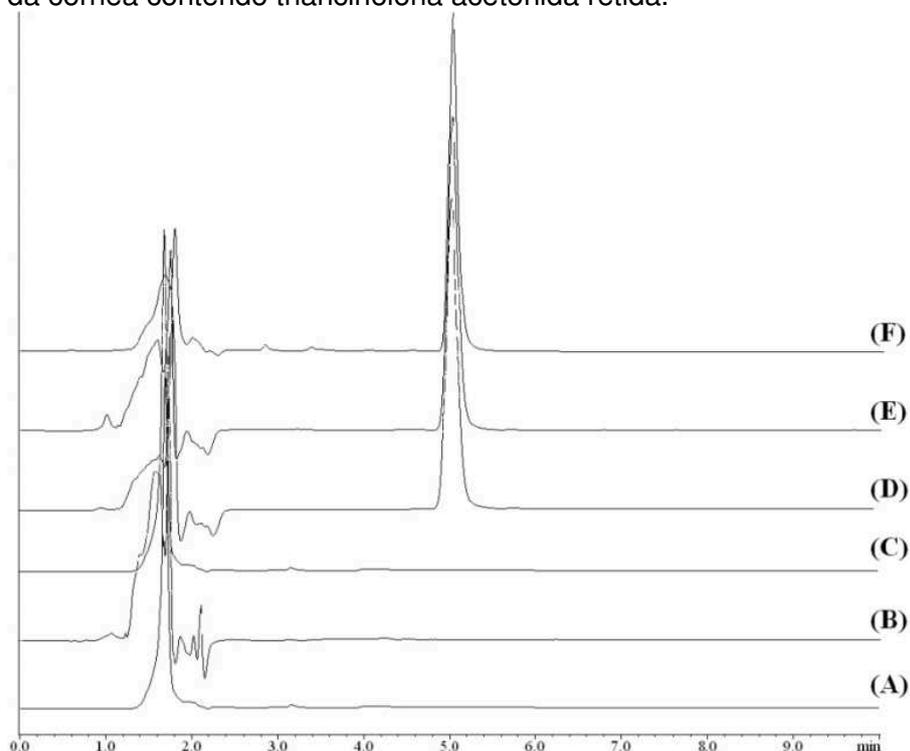
Parâmetro Avaliado	Nível
Composição da Fase Móvel	55:45 (v/v)
	60:40 (v/v)
	65:35 (v/v)
Fluxo da Fase Móvel	0,9 mL/min
	1,0 mL/min
	1,1 mL/min
Comprimento de Onda	230 nm
	240 nm
	250 nm

1.2 RESULTADOS

1.2.1 Especificidade

Para determinar a especificidade do método, os cromatogramas do diluente, extrato de nanoemulsão branca, extrato de córnea fresca, solução padrão de TA, extrato de nanoemulsão contendo fármaco e córnea contendo TA retida foram sobrepostos (Figura 1). Observa-se que o método é específico, uma vez que não há interferência próximo ao tempo de retenção da TA quando avaliadas as soluções na ausência do fármaco, sendo assim, os constituintes da formulação das nanoemulsões, bem como compostos que possam ser co-extraídos a partir da córnea suína não interferem na avaliação cromatográfica da TA nas condições avaliadas.

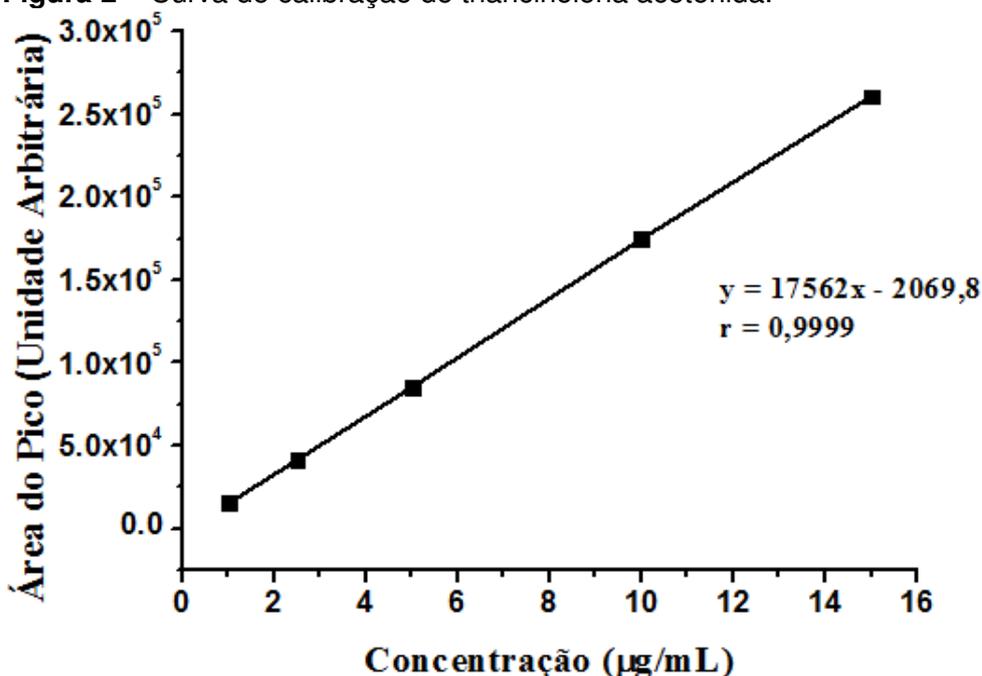
Figura 1 – Sobreposição dos cromatogramas das: (A) Diluente; (B) Extração da nanoemulsão branca; (C) Extração da córnea fresca; (D) Solução padrão de triancinolona acetona; (E) Extração da nanoemulsão contendo triancinolona acetona; e (F) Extração da córnea contendo triancinolona acetona retida.



1.2.2 Linearidade e limites de quantificação e de detecção

A Figura 2 apresenta a curva de calibração obtida para a triancinolona acetona, cuja equação da reta é $y = 17562x - 2069,8$. Pode-se observar que o intervalo entre as concentrações de 1,0 a 15,0 $\mu\text{g/mL}$ apresenta linearidade, uma vez que o valor do coeficiente de correlação (r) é superior a 0,99. Verificou-se, ainda, a significância da correlação, onde $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$ ($5398,15 > 3,136$), e que os resíduos se distribuem aleatoriamente, onde $C_{\text{calculado}} < C_{\text{crítico}}$ ($0,1985 < 0,6838$), garantindo homocedasticidade. Os limites de quantificação e de detecção também foram calculados, correspondendo a 0,20 e 0,06 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Figura 2 – Curva de calibração de triancinolona acetona.



1.2.3 Precisão

Nas Tabelas 2 e 3 pode-se observar que tanto as amostras de nanoemulsão quanto as amostras de triancinolona acetona extraída da córnea suína o método se mostrou preciso, apresentando desvio padrão relativo (DPR%) inferior a 5,0 % para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

Tabela 2 – Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade do método cromatográfico para determinação da triancinolona acetona.

Repetições	Nanoemulsão			Córnea suína		
	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média	DPR (%)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média	DPR (%)
1	1,37			1,54		
2	1,39			1,51		
3	1,34	1,37	1,26	1,55	1,54	1,32
4	1,36			1,53		
5	1,37			1,55		
6	1,38			1,57		

Tabela 3. Resultados obtidos na avaliação da precisão intermediária do método cromatográfico para determinação da triancinolona acetona.

Dia	Nanoemulsão		Córnea	
	Concentração (µg/mL)	DPR (%)	Concentração (µg/mL)	DPR (%)
1	1,36 ± 0,02	1,47	1,56 ± 0,02	1,29
2	1,35 ± 0,03	2,22	1,54 ± 0,01	0,65
3	1,37 ± 0,01	0,73	1,55 ± 0,03	1,94

1.2.4 Exatidão

A Tabela 4 apresenta os valores de recuperação da triancinolona acetona adicionada à amostra branca de nanoemulsão e à córnea suína fresca. Todos os valores permaneceram na faixa de 95 a 105%, evidenciando a exatidão do método.

Tabela 4 – Recuperação da triancinolona acetona após contaminação da amostra de branca de nanoemulsão e à amostra de córnea suína fresca.

	Concentração teórica de triancinolona acetona (µg/mL)	Concentração experimental de triancinolona acetona (µg/mL)	Recuperação Média (%)
Nanoemulsão	2,50	2,48	99,20
	5,00	5,01	100,20
	10,00	9,98	99,80
Córnea	2,50	2,51	100,40
	5,00	4,98	99,60
	10,00	10,01	100,10

1.2.5 Robustez

Para avaliação da robustez do método analítico três parâmetros de análise foram variados: proporção volumétrica entre os componentes da fase móvel, fluxo da fase móvel e comprimento de onda. Como observado na Tabela 5, verifica-se que o método de analítico é robusto para quantificação do teor de triancinolona acetona nas nanoemulsões e do teor de fármaco retido na córnea, apresentando DPR inferior a 5%.

Tabela 5 – Resultados obtidos na avaliação da robustez do método de quantificação da triancinolona acetona por HPLC.

Variação	Nanoemulsão		Córnea		
	Concentração (µg/mL) ^a	DPR (%)	Concentração (µg/mL) ^a	DPR (%)	
Composição da Fase Móvel (v/v)	55:45	1,33	1,51	1,58	1,19
	60:40	1,37	1,26	1,54	1,32
	65:35	1,36	1,44	1,50	1,77
Fluxo da Fase Móvel (mL/min.)	0,9	1,36	1,51	1,53	1,38
	1,0	1,37	1,26	1,54	1,32
	1,1	1,35	1,33	1,54	1,21
Comprimento de onda (nm)	230	1,32	1,63	1,49	1,57
	240	1,37	1,26	1,54	1,32
	250	1,35	1,81	1,61	1,44

1.3 CONCLUSÕES

A partir do exposto acima, verifica-se que o método proposto por cromatografia líquida de alta eficiência foi validado, demonstrando-se específico, linear, preciso, exato e robusto, se mostrando adequado para quantificar a triancinolona acetona contida no interior da córnea suína ou da nanoemulsão.

2 MÉTODO II

2.1 METODOLOGIA

2.1.1 Condição cromatográfica

As análises foram realizadas utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência PerkinElmer Series 200, com coluna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) acoplada a uma pré-coluna C18. A fase móvel foi composta de uma mistura de acetonitrila:água (6:4, v/v), de forma isocrática, com fluxo de 1,0 mL/min e detector UV com comprimento de onda de 240 nm. As amostras foram injetadas com volumes de 20 µL e uma solução 0,5 % (m/V) de laurilsulfato de sódio em tampão lacrimal simulado, pH 7,4 foi utilizada como diluente.

2.1.2 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da injeção do diluente, extrato da córnea suína no diluente, solução padrão de triancinolona acetonida em diluente (padrão para ensaio de dissolução), solução padrão de triancinolona acetonida preparada no diluente contendo extrato da córnea suína (padrão para ensaio de permeação transcorneal), solução amostra do meio de liberação das nanoemulsões, e solução de triancinolona acetonida permeada através da córnea suína utilizando amostra de Deg⁵⁰-XG:NETA. Nenhum sinal cromatográfico com área de pico superior a 0,5 % a área do pico da triancinolona acetonida é tolerado.

Para preparo do extrato de córnea suína em diluente, a córnea suína foi rasurada e adicionada a 5 mL de solução 0,5 % (m/V) de laurilsulfato de sódio em solução lacrimal simulada pH 7,4, e a extração realizada com auxílio de sonda ultrassônica UP 200 S utilizando amplitude de 60 % durante 3 minutos sob banho de gelo. Posteriormente as soluções foram filtradas em membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,45 µm e analisadas cromatograficamente.

2.1.3 Linearidade e limites de quantificação e de detecção

Para determinação da linearidade foram preparadas soluções, em triplicata, nas concentrações de 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; e 1,00 µg/mL em solução 0,5 % (m/V) de laurilsulfato de sódio em solução lacrimal simulada pH 7,4. As soluções foram injetadas conforme descrito anteriormente e análise de regressão linear foi realizada para determinar a linearidade da resposta área do pico em função da concentração de triancinolona acetona nas soluções. As análises de teste F e teste de Cochran foram realizadas para determinação da significância da regressão e da homocedasticidade dos resíduos, respectivamente.

Utilizando as equações de reta calculadas através da regressão linear para cada uma das três curvas realizadas, foram determinados os limites de quantificação e detecção conforme descrito anteriormente (Equações 1 e 2).

2.1.4 Precisão

A precisão foi avaliada quanto à repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada através do preparo de soluções obtidas com a solução de triancinolona acetona liberada a partir do fármaco livre e do fármaco permeado a partir da amostra de Deg⁵⁰-XG:NE_{TA} em sextuplicata ($n = 6$). Para avaliação da precisão intermediária, três amostras de cada um dos testes foram analisadas em três dias distintos (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

2.1.5 Exatidão

Para realização do ensaio de exatidão, o meio de dissolução e o meio receptor do ensaio de permeação transcorneal foram contaminados triancinolona acetona de modo a obter soluções nas concentrações de 0,25; 0,50; e 0,75 µg/mL, conferindo os níveis baixo, médio e alto, respectivamente. As soluções foram preparadas em triplicata e o resultado expresso como recuperação da triancinolona acetona, devendo permanecer na faixa de 90 a 110 % para que o método seja considerado exato (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

2.1.6 Robustez

Para o ensaio de robustez, três amostras preparadas conforme descrito no parâmetro de precisão, foram avaliadas em triplicata. Três parâmetros cromatográficos foram alterados em três níveis (Tabela 6), e o método considerado robusto quando o desvio padrão relativo fora inferior a 5 % para ambas as amostras (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 6 – Parâmetros cromatográficos avaliados para determinação da robustez do método.

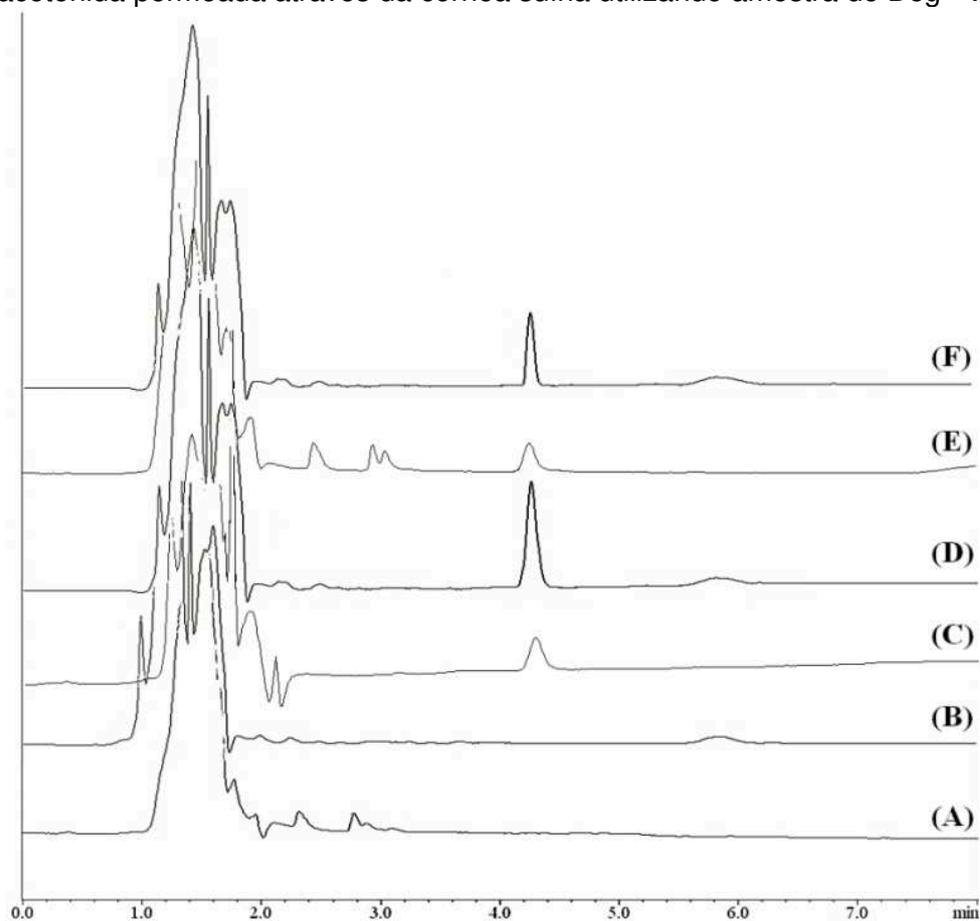
Parâmetro Avaliado	Nível
Composição da Fase Móvel	55:45 (v/v)
	60:40 (v/v)
	65:35 (v/v)
Fluxo da Fase Móvel	0,9 mL/min
	1,0 mL/min
	1,1 mL/min
Comprimento de Onda	230 nm
	240 nm
	250 nm

2.2 RESULTADOS

2.2.1 Especificidade

A Figura 3 apresenta a sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir da análise do diluente, extrato da córnea suína no diluente, solução padrão de triancinolona acetona em diluente, solução padrão de triancinolona acetona preparada no diluente contendo extrato da córnea suína, solução amostra do meio de liberação das nanoemulsões, e solução de triancinolona acetona permeada através da córnea suína utilizando amostra de Deg⁵⁰-XG:NE_{TA}. Observa-se que o método é específico, uma vez que não há interferência próximo ao tempo de retenção do fármaco quando avaliadas as soluções na ausência do fármaco. Logo, o método se apresenta específico para a quantificação de TA.

Figura 3 – Sobreposição dos cromatogramas das: (A) Diluente; (B) Extrato da córnea suína no diluente; (C) Solução padrão de triancinolona acetona em diluente; (D) Solução padrão de triancinolona acetona preparada no diluente contendo extrato da córnea suína; (E) Solução amostra do meio de liberação das nanoemulsões; e (F) Solução de triancinolona acetona permeada através da córnea suína utilizando amostra de Deg⁵⁰-XG:NE_{TA}.

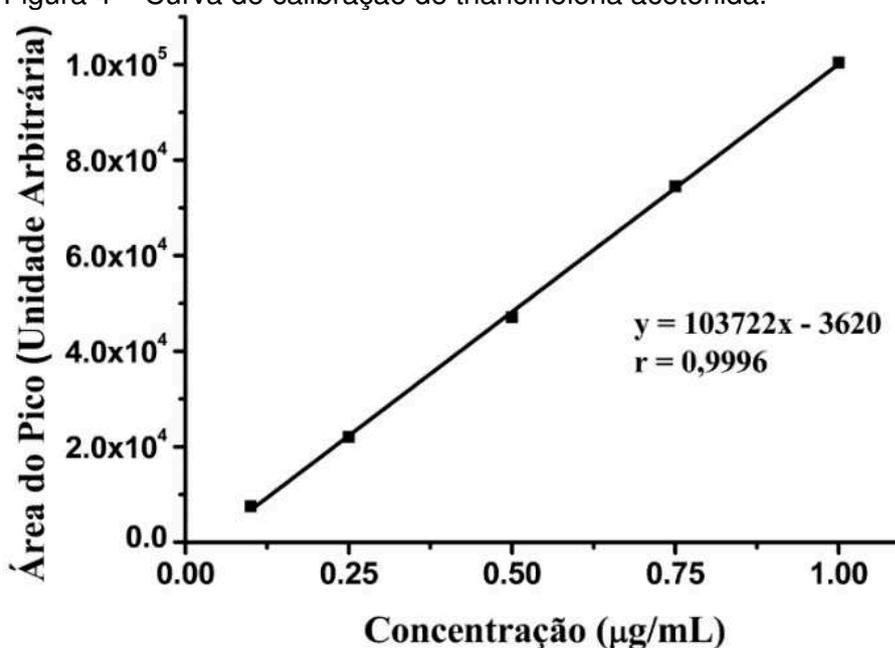


2.2.2 Linearidade e limites de quantificação e de detecção

A Figura 4 apresenta a curva de calibração obtida para a triancinolona acetona, pode-se observar que o intervalo entre as concentrações de 0,10 a 1,00 $\mu\text{g/mL}$ apresenta linearidade, uma vez que o valor do coeficiente de correlação (r) é superior a 0,99, e com equação da reta $y = 103722x - 3620$. Verificou-se, ainda, a significância da correlação, onde $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$ ($11282,28 > 3,136$), e que os resíduos se distribuem aleatoriamente, onde $C_{\text{calculado}} < C_{\text{crítico}}$ ($0,6317 < 0,6838$), garantindo homocedasticidade. Os limites de quantificação e de detecção também foram calculados, correspondendo a 0,07 e 0,02 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Logo verifica-se que o método apresenta-se linear para o intervalo analisado, e com

limites de quantificação adequados para determinar TA durante os ensaios de liberação *in vitro* e de permeação transcorneal.

Figura 4 – Curva de calibração de triancinolona acetona.



2.2.3 Precisão

Nas Tabelas 7 e 8 observa-se que o método cromatográfico apresentou desvio padrão relativo inferior a 5,0 % para os ensaios de precisão intermediária e repetibilidade quando as amostras de solução de triancinolona acetona em meio de dissolução e daquela permeada a partir dos hidrogéis termosensíveis contendo nanoemulsão foram analisadas. Logo o método pode ser considerado preciso para quantificação do fármaco nos ensaios de liberação *in vitro* e permeação transcorneal.

2.2.4 Exatidão

A Tabela 9 apresenta os valores de recuperação da triancinolona acetona adicionada ao meio de dissolução e ao meio acceptor do ensaio de permeação

transcorneal. Todos os valores permaneceram na faixa de 90 a 110 %, evidenciando a exatidão do método para determinação da concentração de TA no intervalo avaliado.

Tabela 7 – Resultados obtidos na avaliação da precisão intermediária do método cromatográfico para determinação da triancinolona acetônida.

Dia	Dissolução		Permeação Transcorneal	
	Concentração (µg/mL)	DPR (%)	Concentração (µg/mL)	DPR (%)
1	0,10 ± 0,01		0,10 ± 0,01	
2	0,10 ± 0,01	3,93	0,10 ± 0,01	4,66
3	0,10 ± 0,01		0,10 ± 0,02	

Tabela 8 – Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade do método cromatográfico para determinação da triancinolona acetônida.

Repetições	Dissolução			Permeação Transcorneal		
	Concentração (µg/mL)	Média	DPR (%)	Concentração (µg/mL)	Média	DPR (%)
1	0,10			0,09		
2	0,10			0,10		
3	0,10	0,10	4,02	0,10	0,10	4,16
4	0,10			0,10		
5	0,11			0,10		
6	0,10			0,10		

2.2.5 Robustez

Para avaliação da robustez do método analítico três parâmetros de análise foram variados: proporção volumétrica entre os componentes da fase móvel, fluxo da fase móvel e comprimento de onda. Como observado na Tabela 10, verifica-se que o método de analítico se apresenta robusto para quantificação de triancinolona acetônida nos meios de dissolução e acceptor para o ensaio de permeação transcorneal, apresentando valores de DPR% inferiores a 5,0 %.

2.3 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos a partir dos parâmetros de validação avaliados, verifica-se que o método desenvolvido é específico, linear, preciso, exato

e robusto, se mostrando adequado para quantificar a triancinolona acetona nos ensaios de perfil de dissolução e de permeação transcorneal.

Tabela 9 – Recuperação da triancinolona acetona após contaminação da amostra de branca de nanoemulsão e à amostra de córnea suína fresca.

	Concentração teórica de triancinolona acetona ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental de triancinolona acetona ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação Média (%)
Meio de dissolução	0,25	0,25	99,56
	0,50	0,50	100,60
	0,75	0,75	99,60
Meio acceptor do ensaio de permeação	0,25	0,25	98,80
	0,50	0,50	99,34
	0,75	0,75	100,04

Tabela 10. Resultados obtidos na avaliação da robustez do método de quantificação da triancinolona acetona por HPLC.

Varição		Dissolução		Permeação Transcorneal	
		Concentração ($\mu\text{g/mL}$)^a	DPR (%)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)^a	DPR (%)
Composição da Fase Móvel (v/v)	55:45	0,10	4,16	0,10	4,98
	60:40	0,10	3,93	0,10	4,66
	65:35	0,10	4,15	0,10	4,34
Fluxo da Fase Móvel (mL/min.)	0,9	0,10	4,14	0,10	4,88
	1,0	0,10	3,93	0,10	4,66
	1,1	0,10	4,07	0,10	4,93
Comprimento de onda (nm)	230	0,10	4,34	0,10	3,37
	240	0,10	3,93	0,10	4,66
	250	0,10	3,23	0,10	4,76

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABAD, S.; SÈVE, P.; DHOTE, R.; BRÈZIN, A.-P. Uvéites et médecine interne : stratégies diagnostiques et thérapeutique. **La Revue de Médecine Interne**, v. 30, n. 6, p. 492-500, jun., 2009.

AHMED, I.; GOKHALE, R. D.; SHAH, M. V.; PATTON, T. F. Physicochemical determinants of drug diffusion across the conjunctiva, sclera, and cornea. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 76, n. 8, p. 583-586, ago., 1987.

ALMEIDA, H.; AMARAL, M. H.; LOBÃO, O.; SILVA, A. C.; LOBOA, J. M. Applications of polymeric and lipid nanoparticles in ophthalmic pharmaceutical formulations: presente and future considerations. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 278-293, jul., 2014.

ANDREWS, G. P.; LAVERLY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505-518, mar., 2009.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. The universality of low-energy nano-emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, n. 1-2, p. 142-147, jul., 2009.

ANUMOLU, S.; SINGH, Y.; GAO, D.; STEIN, S.; SINKO, J. Design and evaluation of novel fast forming pilocarpine-loaded ocular hydrogel for sustained pharmacological response. **Journal of Controlled Release**, v. 137, n. 2, p. 152-159, jul., 2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RE nº 899**, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

ARAÚJO, J.; GARCÍA, M. L.; MALLANDRICH, M.; SOUTO, E. B.; CALPENA, A. C. Release profile and transscleral permeation of triamcinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers (TA-NLC): *in vitro* and *ex vivo* studies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 6, p. 1034-1041, ago., 2012.

ARGENTI, D.; JENSEN, B. K.; HENSEL, R.; BORDEAUX, K.; SCHLEIMER, R.; BICKEL, C.; HEALD, D. A mass balance study to evaluate the biotransformation and excretion of [¹⁴C]-triamcinolone acetonide following oral administration. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 40, n. 7, p. 770-780, jul., 2000.

ARJMANDI, N.; van ROY, W.; LAGAET, L.; BORGHS, G. Measuring the electric charge and zeta potential of nanometer-sized objects using pyramidal-shaped nanopores. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 20, p. 8490-8496, ago., 2012.

AVACHAT, A. M.; GUJAR, K. N.; WAGH, K. V. Development and evaluation of tamarind seed xyloglucan-based mucoadhesive buccal films of rizatriptan benzoate. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 537-542, jan., 2013.

BAIG, M. S.; AHAD, A.; ASLAM, M.; IMAM, S. S.; AQIL, M., ALI, A. Application of Box-Behnken design for preparation of levofloxacin-loaded stearic acid solid lipid nanoparticles for ocular delivery: Optimization, *in vitro* release, ocular tolerance and antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, n. 1, p. 258-270, abr., 2016.

BAJPAI, A. K.; SHUKLA, S. K.; BHANU, S.; KANKANE, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 11, p. 1088-1118, nov., 2008.

BARAR, J.; JAVADZADEH, A. R.; OMIDI, Y. Ocular novel drug delivery: impacts of membranes and barriers. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, n. 5, p. 567-581, maio, 2008.

BAWA, P.; PILLAV, V.; CHOONARA, Y. E.; DU TOIT, L. C. Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery. **Biomedical Materials**, v. 4, n. 2, p. 1-15, abr., 2009.

BECKERIDGE, M. S.; DOS SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1-2, p. 141-156, jan., 2000.

Behl, C. R.; Block, L. H.; Borke, M. L. Aqueous solubility of ¹⁴C-triamcinolone acetate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, n. 3, p. 429-430, março, 1976.

BEILIN, M.; BAR-ILAN, A.; AMSELEM, S. Ocular retention time of submicron emulsion (SME) and the miotic response to pilocarpine delivery in SME. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, p. S166, 1995 *apud* TAMILVANAN, S.; BENITA, S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 357-368, set., 2004.

BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Thiomers: A new generation of mucoadhesive polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1569-1582, nov., 2005.

BRUN-GRAEPI, A. K. A. S.; RICHARD, C.; BESSODES, M.; SCHERMAN, D.; NARITA, T.; DUCOURET, G.; MERTEN, O.-W. Study on the sol-gel transition of xyloglucan hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 2, p. 555-562, abr., 2010.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, p. 530-536, maio, 1996.

CAMILO, E. N. R.; MOURA, G. L.; ARANTES, T. E. F. Clinical and epidemiological characteristics of patients with uveitis in an emergency eye care center in Brazil. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 77, n. 1, p. 30-33, jan./fev., 2014.

CAÑADAS, C.; ALVARADO, H.; CALPENA, A. C.; SILVA, A. M.; SOUTO, E. B.; GARCÍA, M. L.; ABREGO, G. *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* characterization of PLGA nanoparticles loading pranoprofen for ocular administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, n. 2, p. 719-727, set., 2016.

CHANG, J. H.-M.; WAKEFIELD, D. Uveitis: a global perspective. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 10, n. 4, p. 263-280, jul., 2002;

CHANG, Y.-C.; WU, W.-C. Elevation of intraocular pressure after intravitreal injection of triamcinolone acetonide in taiwanese patients. **The Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 24, n. 2, p. 72-77, fev., 2008.

CHAO, C. C.; BUTALA, S. M.; HERP, A. Studies on the isolation and composition of human ocular mucin. **Experimental Eye Research**, v. 47, n. 2, p. 185-196, ago., 1988.

CHEN, M.; LI, X.; LIU, J.; HAN, Y.; CHENG, L. Safety and pharmacodynamics of suprachoroidal injection of triamcinolone acetonide as a controlled ocular drug release model. **Journal of Controlled Release**, v. 203, n. 1, p. 109-117, abr., 2015.

CHOLKAR, K.; PATEL, S. P.; VAFLAPUDI, A. D.; MITRA, A. K. Novel strategies for anterior segment ocular drug delivery. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 2, p. 106-123, mar., 2013.

CHU, J.; CHENG, Y.-L.; RAO, A. V.; NOURAEI, M.; ZARATE-MUÑOZ, S.; ACOSTA, E. J. Lecithin-linker formulations for self-emulsifying delivery of nutraceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, n. 1-2, p. 91-102, ago., 2014.

COMMODARO, A. G.; BUENO, V.; BERFORT JUNIOR, R.; RIZZO, L. V. Autoimmune uveitis: The associated proinflammatory molecules and the search for immunoregulation. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 4, p. 205-209, fev., 2011.

CUNNINGHAM JUNIOR, E. T.; WENDER, J. D. Practical approach to the use of corticosteroids in patients with uveitis. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 45, n. 4, p. 352-358, jul., 2010.

DESCHENES, J.; MURRAY, P. I.; RAO, N. A.; NUSSENBLATT, R. B.; INTERNATIONAL UVEITIS STUDY GROUP. International Uveitis Study Group (IUSG): clinical classification of uveitis. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 16, n. 1-2, p. 1-2, jan.-fev., 2008.

DIAMANTAS, M. A. P.; LOWDER, C.; MUCCIOLI, C. Uveítes anteriores associadas a doenças sistêmicas. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, n. 2, p. 235-238, jan., 2003.

DILBAGHI, N.; KAUR, H.; AHUJA, M.; KUMAR, S. Evaluation of tropicamide-loaded tamarind seed xyloglucan nanoaggregates for ophthalmic delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 286-291, abr., 2013.

DIVSALAR, A.; SABOURY, A. A.; NABIUNI, M.; ZARE, Z.; KEFAYATI, M. E.; SEYEDARABI, A. Characterization and side effect analysis of a newly designed nanoemulsion targeting human serum albumin for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n. 98, v. 1, p. 80-84, abr., 2012.

DRUGBANK: Drug & Drug Target Database. <https://www.drugbank.ca/salts/DBSALT000860> acessado em 17 de dezembro de 2016.

DUNN, J. P. Uveitis. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 42, n. 3, p. 305-323, set., 2015.

FANG, Y.; NISHINARI, K. Gelation behavior of schizophyllan-sorbitol aqueous solutions. **Biopolymers**, 73, n. 1, p. 44-60, jan., 2004.

FERNANDEZ, D. G.; NASCIMENTO, H.; NASCIMENTO, C.; MUCCIOLI, C.; BELFORT-JUNIOR, R. Uveitis in São Paulo, Brazil: 1053 new patients in 15 months. **Ocular Immunology and Inflammation**, publicação online, fev., 2016.

FORGIARINI, A.; ESQUENA, J.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C. Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. **Langmuir**, v. 17, n. 7, p. 2076-2083, jan., 2001.

FOSTER, C. S.; KOTHARI, S.; ANESI, S. D.; VITALE, A. T.; CHU, D.; METZINGER, J. L.; CERÓN, O. The ocular immunology and Uveitis Foundation preferred practice patterns of uveitis management. **Survey of Ophthalmology**, *in press*,

de FREITAS, R. A.; BUSATO, A. P.; MITCHELL, D. A.; SILVEIRA, J. L. M. Degalactosylation of xyloglucan: Effect on aggregation and conformation, as determined by time dependente static light scattering, HPSEC-MALLS and viscosimetry. **Carbohudrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1636-1642, fev., 2011.

de FREITAS, R. A.; SPIER, V. C.; SIERAKOWSKI, M. R. NICOLAI, T.; BENYAHIA, L.; CHASSENIEUX, C. Transient and quasi-permanent networks in xyloglucan solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, n. 1, p. 216-223, set., 2015.

FRY, S. C.; YORK, W. S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; HAYASHI, T.; JOSELEAU, J.-P.; KATO, Y.; LORENCES, E. P.; MACLACHLAN, G. A.; MCNEIL, M.; MORT, H. U.; REID, J. S. G.; SEITZ, H. U.; SELVENDRAN, R. R.; VORAGEN, A. G. J.; WHITE, A. R. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. **Physiologia Plantarum**, v. 89, n. 1, p. 1-3, set., 1993.

GAUDANA, R.; ANANTHULA, H. K.; PARENKY, A.; MILTRA, A. K. Ocular drug delivery. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 12, n. 3, p. 348-360, set., 2010.

GAWLITZA, K.; GEORGIEVA, R.; TAVRAZ, T.; KELLER, J.; VON KLITZING, R. Immobilization of water-soluble HRP within poly-*N*-isopropylacrylamide microgel particles for use in organic media. **Langmuir**, v. 29, n. 51, p. 16002-16009, dez., 2013.

GIPSON, I. K.; ARGÜESO, P. Role of mucins in the function of the corneal and conjunctival epithelia. **International Reviews of Cytology**, v. 231, n. 1, p. 1-49, fev., 2003.

GÖNÜLLÜ, Ü.; ÜNER, M.; YENER, G.; KARAMAN, E. F.; AYDOĞMUS, Z. Formulation and characterization of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers and nanoemulsion of lornoxicam for transdermal delivery. **Acta Pharmaceutica**, v. 65, n. 1, p. 1-13, mar., 2015.

GOUVEIA, E. B.; YAMAMOTO, J. H.; ABDALLA, M.; HIRATA, C. E.; KUBO, P.; OLIVALVES, E. Causas das uveítes em serviço terciário em São Paulo, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 67, n. 1, p. 139-145, jan./fev., 2004.

GRITZ, D. C.; WONG, I. G. Incidence and prevalence of uveitis in northern California: The northern California epidemiology of uveitis study. **Ophthalmology**, v. 111, n. 3, p. 491-500, mar., 2004.

GUNDA, S.; HARIHARAN, S.; MANDAVA, N.; MITRA, A. K. **Barriers in ocular drug delivery**. In: TOMBRAN-TINK, J.; BARNSTABLE, C. J. Ocular transporters in ophthalmic diseases and drug delivery. New Jersey: Humana Press, 2008. 467 p.

HAN, L. H.; LAI, J. H.; YU, S.; YANG, F. Dynamic tissue engineering scaffolds with stimuli-responsive macroporosity formation. **Biomaterials**, v. 34, n. 17, p. 4251-4258, jun., 2013.

HARDING, S. E. Trends in muco-adhesive analysis. **Food Science & Technology**, v. 17, n. 5, p. 255-262, maio, 2006.

HELGESON, M. E. Colloidal behavior of nanoemulsions: Interactions, structure, and rheology. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 25, n. 1, p. 39-50, out., 2016.

HORVÁT, G.; GYARMATI, B.; BERKÓ, S.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P.; SZILÁGYI, B. Á.; SZILÁGUI, A.; SOÓS, J.; SANDRI, G.; BONFERONI, M. C.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; CAMELLA, C.; CSÁNYI, E.; BUDAI-SZÜCS, M. Thiolated poly(aspartic acid) as potential *in situ* gelling, ocular mucoadhesive drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 1, p. 1-11, jan., 2015.

HOU, D.; HU, S.; HUANG, Y.; GUI, R.; ZHANG, L.; TAO, Q.; ZHANG, C.; TIAN, S.; KOMARNENI, S.; PING, Q. Preparation and *in vitro* study of lipid nanoparticles

encapsulating drug loaded montmorillonite for ocular delivery. **Applied Clay Science**, v. 119, part 2, p. 277-283, jan., 2016.

HUANG, Y.; LEOBANDUNG, W.; FOSS, A.; PEPPAS, N. A. Molecular aspects of muco- and bioadhesion: Tethered structures and site-specific surfaces. **Journal of Controlled Release**, v. 65, n. 1-2, p. 63-71, mar., 2000.

ICH, Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedure: text and methodology Q2(R1) (2005).

IMAIOS. **E-Anatomy**. Montpellier. França. Disponível em: <<https://www.imaios.com/br/e-Anatomy/Cabeca-e-Pescoco/Olho-Illustracoes?structureID=7761&frame=15#>>. Acesso em: 09 de novembro de 2015.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123-127, abr., 2015.

JERMAK, C. M.; DELLACROCE, J. T.; HEFFEZ, J.; PEYMAN, G. A. Triamcinolone acetonide in ocular therapeutics. **Survey of Ophthalmology**, v. 52, v. 5, p. 503-522, set.-out., 2007.

JONAS, J. B.; DEGENRING, R. F.; KREISSIG, I.; AKKOYUN, I.; KAMPPETER, B. A. Intraocular pressure elevation after intravitreal triamcinolone acetonide injection. **Ophthalmology**, v. 112, n. 4, p. 593-598, abr., 2005.

KARLA, P. K.; EARLA, R.; BODDU, S. H.; JOHNSTON, T. P.; PAL, D.; MITRA, A. Molecular expression and functional evidence of a drug efflux pump (BCRP) in human corneal epithelial cells. **Current Eye Research**, v. 34, n. 1, p. 1-9, jan., 2009.

KARLA, P. K.; PAL, D.; QUINN, T.; MITRA, A. Molecular evidence and functional expression of a novel drug efflux pump (ABCC2) in human corneal epithelium and rabbit cornea and its role in ocular drug efflux. **International Journal of Pharmacy**, v. 336, n. 1, p. 12-21, maio, 2007.

KAWASAKI, N.; OHKURA, R.; MIYAZAKI, S.; UNO, Y.; SUGIMOTO, S.; ATTWOOD, D. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 181, n. 2, p. 227-234, abr., 1999.

KHOUNVILAY, K.; SITTIKIJYOTHIN, W. Rheological behaviour of tamarind seed gum in aqueous solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 2, p. 334-338, mar., 2012.

KIM, Y. C.; CHIANG, B.; WU, X.; PRAUSNITZ, M. R. Ocular delivery of macromolecules. **Journal of Controlled Release**, v. 190, n. 1, p. 172-181, set., 2014.

KLOUDA, L.; MIKOS, A. G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 1, p. 34-45, jan., 2008.

KOPEČEK, J. Hydrogel biomaterials: A smart future?. **Biomaterials**, v. 28, n. 34, p. 5185-92, dez., 2007.

LEE, J. W.; PARK, J. H.; ROBINSON, J. R. Bioadhesive-based dosage forms: The next generation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 7, p. 850-866, jul., 2000.

LEUNG, S.-H. S. Polymer structure features contributing to mucoadhesion. II. **Journal of Controlled Release**, v. 12, n. 3, p. 187-194, maio, 1990.

LI, L.; THANGAMATHESVARAN, P. M.; YUE, C. Y.; TAM, K. C.; HU, X.; LAM, Y. C. Gel network structure of methylcellulose in water. **Langmuir**, 17(26), p. 8062-68, 2001.

LUCYSZYN, N.; LUBAMBO, A. F.; MATOS, K. F.; MARVILLA, I.; SOUZA, C. F.; SIERAKOWSKI, M.-R. Specific modification of xyloglucan from *Hymenaea courbaril* seeds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 20, n. 2, p. 552-558, mar., 2009.

LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1595-1639, nov., 2005.

MADSEN, F.; EBERTH, K.; SMART, J. D. A rheological assessment of the nature of interactions between mucoadhesive polymers and a homogenized mucus gel. **Biomaterials**, v. 19, n. 11-12, p. 1093-1092, jun., 1998.

MAHAJAN, H.; TYAGI, V. K.; PATIL, R. R.; DUSUNGE, S. B. Thiolated xyloglucan: Synthesis, characterization and evaluation as mucoadhesive *in situ* gelling agent. **Carbohydrate Polymer**, v. 91, n. 2, p. 618-625, jan., 2013.

MANNERMAA, E.; VELLONEN, K.-S.; URTTI, A. Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: Emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 11, p. 1136-1163, nov., 2006.

MASON, T. G.; WILKING, J. N.; MELESON, K.; CHANG, C. B.; GRAVES, S. M. Nanoemulsions: formulation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, n. 41, p. R635-R666, set., 2006.

MATANOVIČ, M. R.; KRISTL, J.; GRABNAR, P. A. Thermoresponsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 472, n. 1-2, p. 262-275, set., 2014.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions - fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 1, p. 2297-2316, jun., 2011.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285-330, mar., 2011.

MIYAZAKI, S.; ENDO, K.; KAWASAKI, N.; KUBO, W.; WATANABE, H.; ATTWOOD, D. Oral sustained delivery of paracetamol from *in situ* gelling xyloglucan formulations. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 20, n. 2, p. 113-1139, fev., 2003.

MIYAZAKI, S.; KAWASAKI, N.; ENDO, K.; ATTWOOD, D. Oral sustained delivery of theophylline from thermally reversible xyloglucan gels in rabbits. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, n. 9, p. 1185-1191, set., 2001.

MIYAZAKI, S.; KAWASAKI, N.; KUBO, W.; ENDO, K.; ATTWOOD, D. Comparison of *in situ* gelling formulations for the oral delivery of cimetidine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 220, n. 1-2, p. 161-168, jun., 2001.

MIYAZAKI, S.; SUISHA, F.; KAWASAKI, N.; SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; ATTWOOD, D. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicle for rectal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 56, n. 1-3, p. 75-83, dez., 1998.

MIYAZAKI, S.; SUZUKI, S.; KAWASAKI, N.; ENDO, K.; TAKAHASHI, A.; ATTWOOD, D. *In situ* gelling xyloglucan formulations for sustained release ocular delivery of pilocarpine hydrochloride. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 229, n. 102, p. 29-36, out., 2001.

MOORTHY, R. S.; VALLURI, S.; JAMPOL, L. M. Drug-induced uveitis. **Survey of Ophthalmology**, v. 42, n. 6, p. 557-570, maio-jun., 1998.

NISBET, D. R.; CROMPTON, K. E.; HAMILTON, S. D.; SHIRAKAWA, S.; PRANKERD, R. J.; FINKELSTEIN, D. I.; HORNE, M. K.; FORSYTHE, J. S. Morphology and gelation of thermosensitive xyloglucan hydrogels. **Biophysical Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 14-20, abr., 2006.

NISHINARI, K.; TAKEMASA, M.; YAMATOYA, K.; SHIRAKAWA, M. **Xyloglucan**. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Handbook of hydrocolloids. 2. Ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited., 2009, 982p.

PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 3, p. 27-46, jul., 2000.

di PIETRO, A.; DAYAN, G.; CONSEIL, G.; STEINFELS, E.; KRELL, T.; TROMPIER, D.; BAUBICHON-CORTAY, H.; JAULT, J.-M. P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 8, p. 925-939, ago., 1999.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2004, 920p.

RILEY, R. G.; SMART, J. D.; TSIBOUKLIS, J.; DETTMAR, P. W.; HAMPSON, F.; DAVIS, J. A.; KELLY, G.; WILBER, W. R. An investigation of mucus/polymer rheological synergism using synthesized and characterized poly(acrylic acid)s. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 217, n. 1-2, p. 87-100, abr., 2001.

RUEL-GARIÉPY, E.; LEROUX, J.-C. *In situ* forming hydrogels – review of temperature-sensitive systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 409-426, set., 2004.

RUPONEN, M.; URTTI, A. Undefined role of mucus as a barrier in ocular drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 96, n. 1, p. 442-446, out., 2015.

SAARI, K. M.; PÄIVÖNSALO-HIETANEN, T.; VAAHTORANTA-LEHTONEN, H.; TOUMINEN, J.; SILLANPÄÄ, M. Epidemiology of endogenous uveitis in south-western Finland. **Acta Ophthalmologica**, v. 73, n. 4, p. 345-349, ago., 1995.

SABERI, A. H.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions : Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 391, n. 1, p. 95-102, fev., 2013.

SADURNÍ, N.; SOLANS, C.; AZEMAR, N.; GARCÍA-CELMA, M. J. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Science**, n. 26, n. 5, p. 438-445, set., 2005.

SAKEENA, M. H. F.; ELRASHID, S. M.; MUNAVVAR, A. S.; AZMIN, M. N. Effects of oil and drug concentrations on droplets size of palm oil esters (POEs) nanoemulsion. **Journal of Oleo Science**, v. 60, n. 4, p. 155-158, 2011.

SASAKI, H.; KARASAWA, K.; HIRONAKA, K.; TAHARA, K.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI, H. Retinal drug delivery using eyedrop preparations of poly-L-lysine-modified liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 3, p. 364-369, abr., 2013.

SCHOENWALD, R. D.; WARD, R. L. Relationship between steroid permeability across excised rabbit cornea and octanol-water partition coefficients. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 6, p. 786-788, jun., 1978.

SERRA, L.; DOMÉNECH, J.; PEPPAS, N. A. Engineering design and molecular dynamics of mucoadhesive drug delivery systems as targeting agents. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 519-528, mar., 2009.

SHEN, L.; YOU, Y.; SUN, S.; CHEN, Y.; QU, J.; CHENG, L. Intraocular and systemic pharmacokinetics of triamcinolone acetonida after a single 40-mg posterior subtenon application. **Ophthalmology**, v. 117, n. 12, p. 2365-2371, dez., 2010.

SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; NISHINARI, K. Tailoring of xyloglucan properties using an enzyme. **Food Hydrocolloids**, v. 12, n. 1, p. 25-28, jan., 1998.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, 48(2-3), 139-57, 2001.

SIMS, I. M.; GANE, A. M.; DUNSTAN, D.; ALLAN, G. C.; BOGER, D. V.; MELTON, L. D.; BACIC, A. Rheological properties of xyloglucan from different plant species. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, n. 1, p. 61-69, set., 1998.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1556-1568, nov., 2005.

de SMET, M. D.; TAYLOR, S. R. J. ; BODAGHI, B. ; MISEROCCHI, E.; MURRAY, P. I.; PLEYER, U.; ZIERHUT, M.; BARISANI-ASENBAUER, T.; LEHOANG, P.; LIGHTMAN, S. Understanding uveitis: The impact of research on visual outcomes. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 30, n. 6, p. 452-470, nov., 2011.

SRIAMOMSAK, P.; WATTANAKORN, N. Rheological synergy in aqueous mixtures of pectin and mucin. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 474-481, nov., 2008.

STUPP, T.; DE FREITAS, R. A.; SIERAKOWSKI, M. R.; DESCHAMPS, F. C.; WISNIEWSKI JR., A.; BIAVATTI, M. W. Characterization and potential uses of *Copaifera langsdorfii* seeds and seed oil. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2659-2663, maio, 2008.

SUISSA, F.; KAWASAKI, N.; MIYAZAKI, S.; SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; SASAKI, M.; ATTWOOD, D. Xyloglucan gels as sustained release vehicles for the intraperitoneal administration of mitomycin C. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 172, n. 1-2, p. 27-32, out., 1998.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, maio, 2004.

TAKAHASI, A.; SUZUKI, S.; NAWASAKI, N.; KUBO, W.; MIYAZAKI, S.; LOEBENBERG, R.; BACHYNSKY, J.; ATTWOOD, D. Percutaneous absorption of non-steroidal anti-inflammatory drugs from *in situ* gelling xyloglucan formulations in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 246, n. 1-2, p. 179-186, out., 2002.

TAMILVANAN, S.; BENITA, S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 357-368, set., 2004.

TANTRA, R.; SCHULZE, P.; QUINCEY, P. Effecto of nanoparticle concentration on zeta-potential measurement results and reproducibility. **Particuology**, v. 8, n. 3, p. 279-285, jun., 2010.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 75, n. 2, p. 107-163, abr., 1998.

TEIXEIRA, L. P.; ABRAHÃO, M. M.; DÁLIA, E. R. C.; CAMPOS, L. M.; NASSARELLA-JÚNIOR, J. J.; DA FONSECA, V. C. Estudo da prevalência das uveítes em hospital oftalmológico terciário em Tereseina, Piauí, Brasil. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 75, n. 3, p. 174-180, maio/jun., 2016.

THE STANDARDIZATION OF UVEITIS NOMENCLATURE (SUN) WORKING GROUP. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the first international workshop. **American Journal of Ophthalmology**, v. 140, n. 3, p. 509-516, set., 2005.

TODARO, S.; CISPENZA, C.; SABATINO, M. A.; ORTORE, M. G.; PASSANTINO, R.; BIAGIO, P. L. S.; BULONE, D. Temperature-induced self-assembly of degalactosylated xyloglucan at low concentration. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, *in press*.

TUOMIVAARA, S. T.; YAOI, L.; O'NEILL, M. A.; YORK, W. S. Generation and structural validation of a library of diverse xyloglucan-derived oligosaccharides, including an update on xyloglucan nomenclature. **Carbohydrate Research**, v. 402, n. 1, p. 56-66, jan., 2015.

VENKATA, R. G.; MADHAVI, S.; RAJESH, P. Ocular drug delivery: an update review. **International Journal of Pharmacy and Biological Science**, v. 1, n. 4, p. 437-446, out.-dez., 2011.

YAMAGUCHI, M.; YASUEDA, S.-I.; ISOWAKI, A.; YAMAMOTO, M.; KIMURA, M.; INADA, K.; OHTORI, A. Formulation of an ophthalmic lipid emulsion containing an anti-inflammatory steroidal drug, difluprednate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, n. 1-2, p. 121-128, set., 2005.

YAMAMOTO, Y.; KOMATSU, T.; KOURA, Y.; NISHINO, K.; FUKUSHIMA, A.; UENO, H. Intraocular pressure elevation after intravitreal or posterior sub-tenon triamcinolone acetate injection. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 43, n. 1, p. 42-47, fev., 2008.

YAMANAKA, S.; MIMURA, M.; URAKAWA, H.; KAJIWARA, K.; SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K. Conformation of tamarind seed xyloglucan oligomers. **Sen'i Gakkaishi**, 55(12), 590-6, 1999.

YING, L.; TAHARA, K.; TAKEUCHI, H. Drug delivery to the ocular posterior segment using lipid emulsion via eye drop administration: Effect of emulsion formulation and surface modification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 2, p. 329-335, set., 2013.

YUGUCJI, Y.; FUJIWARA, T.; MIWA, H.; SHIRAKAWA, M.; YAJIMA, H. Color formation and gelation of xyloglucan upon addition of iodine solutions. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 26, n. 16, p. 1315-1319, ago., 2005.

WALKER, R. M.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Physical and oxidative stability of fish oil nanoemulsions produced by spontaneous emulsification: Effect of surfactant concentration and particle size. **Journal of Food Engineering**, v. 164, n. 1, p. 10-20, nov., 2015.

WARD, M. A.; GEORGIU, T. K. Thermoresponsive polymers for biomedical applications. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1215-1242, set., 2011.

WIEN TJES, R. H. M.; DUIT S, M. H. G.; JONGSCHAA P, R. J. J.; MELLEMA, J. Linear rheology of guar gum solutions. **Macromolecules**, v. 33, n. 26, p. 9594-9605, dez., 2000.

WILLERMAIN, F.; ROSENBAUM, J.; BODAGHI, B.; ROSENZWEIG, H.L.; CHILDERS, S.; BEHREND, T.; WILDNER, G.; DICK, A. D. Interplay between innate and adaptive immunity in the development of non-infectious uveitis. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 31, n. 2, p. 182-194, nov., 2012.