

Luisa Cangussú Domingos

**DETERMINAÇÃO DE GATIFLOXACINO, MOXIFLOXACINO E  
BESIFLOXACINO POR LC-MS/MS NA CÓRNEA E HUMOR AQUOSO DE  
CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre na área de concentração de Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientador: Benito Soto-Blanco  
Co-orientador: Fernando Antônio Bretas Viana  
Co-orientadora: Marília Martins Melo

**Belo Horizonte**  
**Escola de Veterinária – UFMG**  
**2016**



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**LUISA CANGUSSÚ DOMINGOS**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

Aprovada em 28 de Janeiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Benito Soto Blanco  
Presidente - Orientador



Prof. Gustavo de Oliveira Fulgêncio  
Instituto Qualitas de Pós-graduação



Profª. Patrícia Maria Coletto Freitas  
Escola de Veterinária - UFMG



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida e tudo que ela me proporciona.

À minha família pelo incentivo constante e por todo amor e apoio incondicional.

Ao professor Benito por toda paciência e dedicação, ajudando em todas as dificuldades que surgiram.

Ao professor Fernando Bretas por ser o meu grande incentivador e me ensinar a paixão pela oftalmologia veterinária.

À professora Kelly Keller e Marília Martins, por toda ajuda e disponibilidade em todos os momentos.

À Carol Freitas, pelo companheirismo, amizade, ajuda e incentivo.

À todos do Laboratório de Toxicologia Veterinária pelo convívio e ajuda. Em especial agradeço à Lilian Gonçalves, Heloísa Pedroza e Marina Ferreira pela amizade e por tornarem o dia-a-dia mais alegre e descontraído.

À todos do Laboratório de Patologia Veterinária pela ajuda com o processamento das amostras e leitura das lâminas.

À todos os funcionários do Centro de Controle de Zoonoses do bairro São Bernardo de Belo Horizonte, pela possibilidade do desenvolvimento do projeto e por todo auxílio.

À Escola de Veterinária da UFMG e todos os professores, onde eu me formei e tenho um grande carinho.

Ao Hospital de Veterinária da UFMG e todos os funcionários, agradeço pela oportunidade de aprendizado constante.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
3.1. ANATOMO-FISIOLOGIA OCULAR.....	16
3.1.1. Túnica fibrosa.....	16
3.1.1.1. Esclera.....	16
3.1.1.2. Córnea.....	17
3.1.2. Aparelho Lacrimal.....	18
3.1.3. Fisiologia do humor aquoso.....	19
3.2. MECANISMOS DE PROTEÇÃO DO OLHO.....	19
3.2.1. Pálpebras.....	19
3.2.2. Córnea.....	20
3.2.3. Filme lacrimal.....	20
3.2.4. Barreiras oculares.....	20
3.2.4.1. Barreira hematoaquosa.....	21
3.2.4.2. Barreira hematorretiniana.....	21
3.3. FARMACOCINÉTICA DA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA POR MEIO DA VIA OCULAR.....	21
3.4. FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA OCULARES.....	23
3.4.1. Quinolonas.....	23
3.4.1.1. GA e MO.....	23
3.4.1.2. BE.....	24
3.4.2. Concentração inibitória mínima.....	25
3.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPETROMETRIA DE MASSAS.....	26
3.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
4.1. LOCAL.....	28
4.2. SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS.....	28
4.3. ESPECIFICAÇÃO DOS GRUPOS.....	28
4.4. ADMINISTRAÇÃO DO FÁRMACO / EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	29
4.5. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	29
4.5.1. HA.....	29
4.5.2. Córnea.....	30
4.5.3. Bulbo ocular.....	30
4.6. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	30
4.7. ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	30
4.7.1. Estudos dos métodos de extração.....	30
4.7.2. Preparo das amostras.....	33
4.8. PREPARO DOS PADRÕES ANALÍTICOS.....	33
4.9. PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA VALIDAÇÃO DA TÉCNICA.....	33
4.9.1. Estudo da seletividade.....	33

---

---

4.9.2.	Determinação da linearidade das curvas analíticas.....	33
4.9.3.	Determinação do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	33
4.9.4.	Exatidão.....	33
4.9.5.	Precisão.....	34
4.9.6.	Condições cromatográficas e eletrônicas.....	34
4.10.	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....	34
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
5.1.	HISTOLOGIA.....	35
5.2.	ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	37
5.3.	VALIDAÇÃO DA TÉCNICA.....	39
5.3.1.	Seletividade.....	40
5.3.2.	Linearidade.....	41
5.3.3.	Limite de detecção e quantificação.....	43
5.3.4.	Exatidão.....	43
5.3.5.	Precisão.....	45
5.4.	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS.....	46
5.4.1.	Córnea.....	58
5.4.2.	Humor aquoso.....	60
5.4.3.	Relação humor aquoso/córnea.....	60
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
6.1.	HISTOLOGIA.....	61
6.2.	ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	62
6.3.	VALIDAÇÃO DA TÉCNICA ANALÍTICA.....	62
6.4.	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS.....	63
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>74</b>

---

---

### Lista de Figuras

---

Figura 1.	Estrutura anatômica do bulbo ocular de cão.	16
Figura 2.	Estrutura química, A - Moxifloxacino; B – Gatifloxacino.	24
Figura 3.	Estrutura química do besifloxacino.	24
Figura 4.	Esquema representativo, da diluição da gota do fármaco, na solução de cloreto de sódio a 0,9% e nos quatro meios de solução. A - metanol; B - metanol/água; C - acetonitrila; D - acetonitrila/água.	31
Figura 5.	Esquema representativo, apenas para gatifloxacino, dos testes de extração na córnea realizado com os quatro meios de solução. A - metanol; B - metanol/água; C - acetonitrila; D - acetonitrila/água.	32
Figura 6.	Fotomicrografia da conjuntiva bulbar de cão portador de leishmaniose. Observar infiltrado inflamatório histiocitário multifocal a coalescente moderado (seta preta). A – HE (50x); B – HE (200x).	35
Figura 7.	Fotomicrografia do corpo ciliar de cão portador de leishmaniose. Observar infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário multifocal a coalescente moderado (seta preta). A – HE (50x); B – (200x).	36
Figura 8.	Fotomicrografia da esclera de cão portador de leishmaniose. Observar infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário multifocal a coalescente moderado (seta preta). A – HE (50x); B – HE (200x).	36
Figura 9.	Fotomicrografia da retina de cão portador de leishmaniose. Observar degeneração cística periférica da camada nuclear interna (seta preta). A – HE (50x); B – HE (200x).	37
Figura 10.	Cromatograma da mistura das amostras dos três analitos, representadas nos picos 5 (Gatifloxacino), 6 (Moxifloxacino) e 8 (Besifloxacino).	37
Figura 11.	A - Cromatograma da amostra da gota de moxifloxacino diluído em metanol/água (pico5); B - Cromatograma da extração do moxifloxacino no humor aquoso, diluído em acetonitrila/água (pico 5).	38
Figura 12.	A - Cromatograma da amostra da gota de moxifloxacino diluído em metanol/água (pico5); B - Cromatograma da extração do moxifloxacino na córnea, diluído em metanol/água (pico 5).	39

Figura 13.	Cromatograma padrão dos analitos. A - Gatifloxacino; B - Moxifloxacino; C - Besifloxacino.	40
Figura 14.	A - Cromatograma da mistura da solução padrão dos três analitos; B - Cromatograma da extração na córnea sem nenhum analito.	40
Figura 15.	A - Cromatograma da mistura da solução padrão dos três analitos; B - Cromatograma da extração no humor aquoso sem nenhum analito.	41
Figura 16.	Linearidade da curva das matrizes, córnea e humor aquoso, fortificadas nas concentrações de 0,42 a 16,66 µg/mL de gatifloxacino.	41
Figura 17.	Linearidade da curva nas matrizes, córnea e humor aquoso, fortificadas nas concentrações de 0,42 a 16,66 µg/mL de moxifloxacino.	42
Figura 18.	Linearidade da curva das matrizes, córnea e humor aquoso, fortificadas nas concentrações de 0,42 a 16,66 µg/mL de besifloxacino.	42
Figura 19.	Cromatograma do gatifloxacino na córnea.	47
Figura 20.	Cromatograma do gatifloxacino no humo aquoso.	48
Figura 21.	Cromatograma do moxifloxacino na córnea.	51
Figura 22.	Cromatograma do moxifloxacino no humor aquoso.	53
Figura 23.	Cromatograma do besifloxacino na córnea.	55
Figura 24.	Cromatograma do besifloxacino no humor aquoso.	56

---

#### Lista de Tabelas

Tabela 1.	Equações de regressão linear e coeficiente de determinação das curvas analíticas para cada analito adicionado às matrizes, córnea e humor aquoso.	43
Tabela 2.	Limites de detecção e de quantificação do método.	43
Tabela 3.	Recuperações médias de cada analito em cada matriz, nas diferentes concentrações.	44

Tabela 4.	Recuperações médias obtidas por cada analito em cada matriz.	44
Tabela 5.	Repetitividade expressa pelo coeficiente de variação de cada analito nas diferentes concentrações.	45
Tabela 6.	Reprodutibilidade expressa pelo coeficiente de variação de cada analito nas diferentes concentrações.	46
Tabela 7.	Valores em $\mu\text{g/g}$ de gatifloxacino na córnea no tempo de 10 minutos.	47
Tabela 8.	Valores em $\mu\text{g/g}$ de gatifloxacino na córnea no tempo de uma hora.	48
Tabela 9.	Valores em $\mu\text{g/mL}$ de gatifloxacino no humor aquoso no tempo de 10 minutos.	49
Tabela 10.	Valores em $\mu\text{g/mL}$ de gatifloxacino no humor aquoso no tempo de uma hora.	50
Tabela 11.	Valores em $\mu\text{g/g}$ de moxifloxacino na córnea no tempo de 10 minutos.	51
Tabela 12.	Valores em $\mu\text{g/g}$ de moxifloxacino na córnea no tempo de uma hora.	52
Tabela 13.	Valores em $\mu\text{g/mL}$ de moxifloxacino no humor aquoso no tempo de 10 minutos.	53
Tabela 14.	Valores em $\mu\text{g/mL}$ de moxifloxacino no humor aquoso no tempo de uma hora.	54
Tabela 15.	Valores em $\mu\text{g/g}$ de besifloxacino na córnea no tempo de 10 minutos.	55
Tabela 16.	Valores em $\mu\text{g/g}$ de besifloxacino na córnea no tempo de uma hora.	56
Tabela 17.	Valores em $\mu\text{g/mL}$ de besifloxacino no humor aquoso no tempo de 10 minutos.	57
Tabela 18.	Valores em $\mu\text{g/mL}$ de besifloxacino no humor aquoso no tempo de uma hora.	58
Tabela 19.	Concentrações (em $\mu\text{g/g}$ de córnea) de gatifloxacino, moxifloxacino e besifloxacino na córnea de cães após 10 minutos e uma hora após a administração. Estão apresentadas as médias seguidas pelo respectivo desvio-padrão.	59

Tabela 20.	Concentrações totais dos fármacos na córnea em relação à quantidade de fármaco administrado (em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de fármaco administrado) de gatifloxacino, moxifloxacino e besifloxacino em cães após 10 minutos e uma hora após a administração. Estão apresentadas as médias seguidas pelo respectivo desvio-padrão.	59
Tabela 21.	Concentrações (em $\mu\text{g}/\text{mL}$ de humor aquoso) de gatifloxacino, moxifloxacino e besifloxacino no humor aquoso de cães após 10 minutos e uma hora após a administração. Estão apresentadas as médias seguidas pelo respectivo desvio-padrão.	60
Tabela 22.	Relação entre as concentrações no humor aquoso e na córnea (em $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) de gatifloxacino, moxifloxacino e besifloxacino em cães após 10 minutos e uma hora após a administração. Estão apresentadas as médias seguidas pelo respectivo desvio-padrão.	61

---

#### Lista de Quadros

Quadro 1.	Concentração mínima inibitória, expressa em $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para o gatifloxacino, moxifloxacino e besifloxacino aos microrganismos oculares mais frequentes.	26
Quadro 2.	Grupos experimentais formados no presente estudo.	29

---

---

**Lista de Abreviaturas**

---

BHA	Barreira hematoaquosa
BHR	Barreira hematorretiniana
BE	Besifloxacino
BO	Bulbo ocular
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coefficiente de variação
EV-UFMG	Escola de Veterinária da UFMG
GA	Gatifloxacino
HA	Humor aquoso
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MO	Moxifloxacino
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

---

## RESUMO

As fluorquinolonas de quarta geração, representadas pelo gatifloxacino (GA), moxifloxacino (MO) e besifloxacino (BE), são uma das classes de medicamentos oftálmicos mais utilizados. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo validar uma nova técnica analítica para quantificação simultânea de GA, MO e BE com o uso da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) na córnea e humor aquoso (HA), e identificar e quantificar estes fármacos nos tempos de 10 minutos e uma hora após a instilação de uma gota nos olhos de cães. Foram utilizados 22 cães machos, com idade aproximada entre um e sete anos, destinados à eutanásia por serem portadores de Leishmaniose Visceral Canina (LVC), sem lesões observadas ao exame oftalmológico. Inicialmente, foi feita avaliação por meio da histologia para verificar se os bulbos oculares (BO) dos cães utilizados apresentavam lesões microscópicas. Dentre os 22 cães selecionados, constatou-se que em apenas 15,9% dos BO apresentavam lesões inflamatórias e dois animais apresentavam degeneração retiniana, alteração relacionada com a idade avançada do animal, sendo retirados do estudo. A validação da técnica analítica foi determinada por meio de etapas que determinaram a seletividade, sensibilidade e reprodutibilidade do método, sendo ele eficaz para a quantificação simultânea destes fármacos. Em relação à concentração, na córnea no tempo de 10 minutos, foram obtidos, na média, os seguintes resultados: MO (18,6 µg/g) seguida do BE (6,01 µg/g) e do GA (4,35 µg/g). No tempo de uma hora a ordem dos fármacos se manteve, sendo: MO (11,7 µg/g), BE (5,51 µg/g) e GA (2,36 µg/g). No HA no tempo de 10 minutos foram obtidos os seguintes resultados: BE (1,70 µg/mL), seguida do MO (1,62 µg/mL) e GA (0,06 µg/mL). No tempo de uma hora a ordem dos fármacos se manteve, sendo o BE (1,71 µg/mL), o MO (1,68 µg/mL) e o GA (0,10 µg/mL). Assim, foi verificado que, nos dois tempos de mensuração analisados, o MO foi o fármaco que obteve maior concentração na córnea, enquanto que no HA foi o BE.

Palavras-chave: cão, terapêutica ocular, fluorquinolonas, cromatografia líquida associada à espectrometria de massas, oftalmologia veterinária.

## ABSTRACT

*The fourth-generation of fluoroquinolones, represented by gatifloxacin (GA), moxifloxacin (MO) and besifloxacin (BE) are one of the most widely used ophthalmic drug classes. Thus, this study aimed to validate a new analytical technique for simultaneous quantification of GA, MO and BE with the use of liquid chromatography tandem/mass spectrometry (LC-MS/MS) in the cornea and aqueous humor (AH) and identify and quantitate these drugs in 10 minutes time and one hour after instillation of ophthalmic suspension. Twenty two male dogs are used, with an approximate age between one to seven years-old, these dogs were destined to euthanasia to be carriers of canine visceral leishmaniasis without lesions observed at the ophthalmic examination. Initially, it was made avaluation by histology to certify if the eyeball of used dogs had microscopic lesions. Among the 22 selected dogs, it was found that only 15,9% of the eyeball had inflammatory lesions and two animals had retinal degeneration, changes related to the advanced age of, because of that, these animals was withdrawn from the study. The validation of the analytical technique was determined by means of steps that determine the selectivity, sensitivity and reprocibility of the method, it's effective for simultaneous quantification of these drugs. Regarding the concentration of the cornea within 10 minutes of time was obtained, on average, the followings results: MO (18,6 µg/g) followed BE (6,01 µg/g) and GA (4,35 µg/g). At the time of one hour the order of drugs remained, as follow: MO (11,7 µg/g), BE (5,51 µg/g) and GA (2,36 µg/g). In the AH time of 10 minutes, the following results were obtained: BE (1,70 µg/mL), followed MO (1,62 µg/mL) and GA (0,06 µg/mL). At the time of one hour the order of drugs remained, and BE (1,71 µg/mL), MO (1,68 µg/mL) and GA (0,10 µg/mL). Thus, it was found that in both measurement time analyzed, the MO was the drug which obtained the highest concentration in the cornea, while the AH is the BE.*

*Keywords: dog, ocular therapy, fluoroquinolone, liquid chromatography tandem/mass spectrometry, veterinary ophthalmology.*

## 1. INTRODUÇÃO

As fluorquinolonas de quarta geração são popularmente comercializadas em apresentação tópica com ação terapêutica para as afecções oculares, devendo estar presentes em concentrações adequadas no tecido alvo (Górniak, 2011; Chung et al., 2013). A penetração intraocular do fármaco é dificultada por meio dos diversos mecanismos de defesa que protegem o olho, sendo os mais importantes, a córnea com permeabilidades diferentes e os mecanismos de drenagem da lágrima (Gum e MacKay, 2013; Samuelson, 2013; Nautscher et al., 2015).

Os antimicrobianos possuem sua ação terapêutica dependente da concentração do fármaco no local de ação. Os fármacos que apresentarem maior capacidade de penetração intraocular e permanência em níveis adequados no local em que estão os microrganismos, são considerados mais efetivos (Maggs, 2008a; Chung et al., 2013).

As soluções oftálmicas de gatifloxacino (GA) e moxifloxacino (MO) apresentam estruturas químicas semelhante (McGee et al., 2005), sendo que o besifloxacino (BE), fluorquinolona mais recente e com uso exclusivo na oftalmologia, se difere dos demais fármacos principalmente pela adição à sua composição de um polímero mucoadesivo (Deschênes e Blondeau, 2015; Xiao-Fei et al., 2016).

A técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) tem sido utilizada em diversas áreas de estudo. Sua alta sensibilidade permite a detecção e quantificação de substâncias presentes em baixas concentrações (Demoliner, 2008; Amparo, 2013).

Na medicina veterinária, a técnica LC-MS/MS pode ser utilizada com o intuito de realizar estudos farmacocinéticos, determinar o limite da presença de resíduos inapropriados em produtos de origem animal (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010; Goulart, 2012) e determinar substâncias que possuem princípios tóxicos (Goulart, 2012).

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivos:

- desenvolver e validar um método analítico de detecção e quantificação simultânea do gatifloxacino, moxifloxacino e besifloxacino por meio da técnica de LC-MS/MS na córnea e humor aquoso de cães;
- quantificar as concentrações do GA, MO e BE na córnea e humor aquoso de cães, aos 10 minutos e uma hora após a instilação de uma gota na superfície ocular, utilizando a técnica desenvolvida de LC-MS/MS.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. ANATOMO-FISIOLOGIA OCULAR

O olho é um órgão sensorial da visão e seu funcionamento engloba um fenômeno complexo em que a luz emitida pelos objetos o penetra e tem a capacidade de originar sinais elétricos que vão até o sistema nervoso central (Miller, 2008a; Samuelson, 2013).

O bulbo ocular (BO) é composto por três camadas básicas. A camada mais externa é a túnica fibrosa, que se divide em esclera e córnea, responsáveis por darem forma e proteção ao olho. A camada intermediária é a túnica vascular, constituída pela coróide, corpo ciliar e íris, que fornecem nutrientes aos demais tecidos oculares e determinam o tamanho da pupila. A camada mais interna é a túnica nervosa, que inclui a retina e o nervo óptico, que transformam o estímulo visual em impulsos nervosos (Dyce et al., 2008; Samuelson, 2013) (Figura 1).

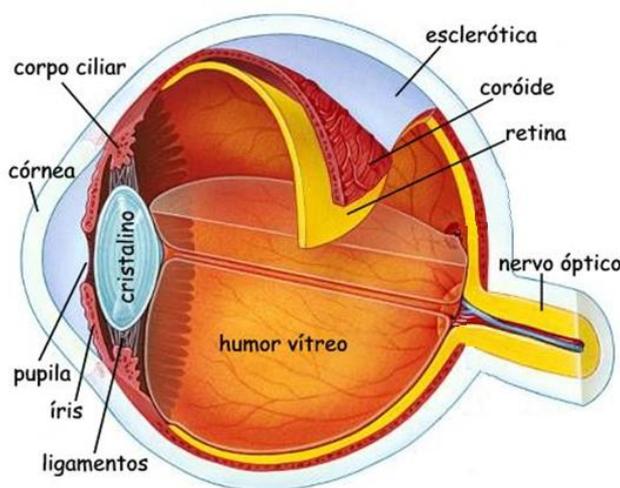


Figura 1. Estrutura anatômica do bulbo ocular de cão.  
Adaptado de <http://www.gruporetina.org.br/olho.htm>

##### 3.1.1. Túnica fibrosa

###### 3.1.1.1. Esclera

A esclera representa a maior parte da túnica fibrosa, ela envolve todo o BO desde o limbo, que é a região de transição da córnea para a esclera. Divide-se em três camadas: episclera, própria esclera e supracoróide da esclera (Slatter e Dietrich, 2007; Samuelson, 2013).

A episclera é constituída por uma camada fina de colágeno e é altamente vascular, sendo mais desenvolvida na região do limbo e nos locais de inserção dos músculos extra-oculares, onde se liga superficialmente com a cápsula de Tenon (Slatter e Dietrich, 2007; Samuelson, 2013). A própria esclera perde a estrutura celular organizada da córnea, suas fibras

de colágeno possuem diferentes diâmetros e direção, apresentando-se irregular e com denso tecido conectivo (Slatter e Dietrich, 2007; Samuelson, 2013). A supracoróide possui conexão com o sistema venoso coroidal apresentando tamanho e profundidade variáveis (Samuelson, 2013).

A esclera contém fibras elásticas que estão entrelaçadas com as fibras de colágeno, como os melanócitos e fibrócitos (Dyce et al., 2008; Samuelson, 2013). Em diferentes partes do BO, estas fibras se diferem no diâmetro, no formato e na orientação, o que confere à esclera a característica de não ser transparente (Maggs, 2008c). A cor da esclera depende da espessura do estroma e da quantidade de gordura presente na parte externa. A espessura da esclera é muito variável entre as espécies e nas diferentes regiões do BO. A área mais delgada é próxima ao equador e nos locais de inserção muscular, com aproximadamente 0,3 mm, e a área mais espessa é na região do plexo intraescleral, próximo ao disco óptico que é muito desenvolvido, tendo aproximadamente 0,55 mm (Slatter e Dietrich, 2007; Samuelson, 2013). Quando se compara com a córnea, a esclera é mais hidratada e possui vasos sanguíneos. Esta estrutura fibrosa propicia proteção, resistência ao BO e suporta a pressão intraocular (Maggs, 2008c; Samuelson, 2013).

### 3.1.1.2. Córnea

A córnea possui uma organização estrutural que confere a ela a característica de ser transparente e fornecer proteção mecânica (Nautscher et al., 2015). É composta por quatro camadas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (Maggs, 2008c; Dyce et al., 2010; Samuelson, 2013; Nautscher et al., 2015), e está presente em um quinto da túnica fibrosa (Samuelson, 2013).

O epitélio está presente em toda a superfície corneana. É composto por uma camada simples de células basais colunares, duas ou três camadas de células poliedrais, e duas ou três camadas de células escamosas não queratinizadas (Samuelson, 2013).

O estroma compreende 90% da espessura da córnea. É composto por fibras de colágeno, posicionadas em lamelas transversais presentes em todo o diâmetro da córnea, queratócitos, fibrócitos e substância fundamental. Suas camadas são extremamente organizadas em feixes paralelos o que confere à córnea sua transparência (Slatter e Dietrich, 2007; Samuelson, 2013).

A membrana de Descemet é homogênea e acelular, composta por finas fibras de colágeno (Maggs, 2008c; Samuelson, 2013). Ela forma uma membrana interna protetora da córnea situada entre o estroma e o endotélio. Durante a vida, a membrana de Descemet é secretada pelas células do endotélio (Slatter e Dietrich, 2007; Nautscher et al., 2015), o que faz com que ela fique mais espessa com o passar da idade do animal. Sua característica elástica protege o conteúdo intraocular, porém em situações de buftalmia ou perfuração ocular, por exemplo, ela pode se romper (Nautscher et al., 2015).

O endotélio é composto por uma camada de células achatadas que reveste a córnea internamente (Samuelson, 2013). Com o avançar da idade, há uma diminuição do número de células endoteliais (Slatter e Dietrich, 2007).

A córnea é intensamente inervada e transparente. A transparência da córnea esta relacionada diretamente pelo fato dela ser avascular, os seus nervos não possuem mielina e realizar constantemente o bombeamento de líquidos. A nutrição corneana ocorre pela passagem de nutrientes provenientes do humor aquoso (HA) e da lágrima (Slatter e Dietrich, 2007; Maggs, 2008c; Dyce et al., 2010; Samuelson, 2013). A córnea é considerada um tecido desidratado,

tendo em torno de 75 a 85% de água. Essa desidratação advém da constante ação do endotélio que através da bomba Na/K ATPase, retira íons do estroma para o HA. A circulação da água, neste transporte de energia dependente, garante uma relativa desidratação do estroma (Maggs, 2008c; Samuelson, 2013).

A córnea protege o olho de traumas externos e devido à sua curvatura e transparência, possui uma adequada superfície de refração óptica (Maggs, 2008c; Nautscher et al., 2015). Seu formato elíptico, apresenta o diâmetro horizontal maior do que o vertical (Maggs, 2008c; Samuelson, 2013). Nos cães a córnea possui a espessura de 0,45 a 0,55 mm na região central e de 0,50 a 0,65 mm na periferia (Samuelson, 2013). Em cães mais velhos a espessura corneana pode ser 0,9 mm devido à afunção das células endoteliais (Slatter e Dietrich, 2007).

### 3.1.2. Aparelho Lacrimal

O aparelho lacrimal é constituído pelas glândulas lacrimal, nictitante e outras acessórias, associadas a um sistema de ductos que drenam a lágrima até a cavidade nasal (Dyce et al., 2010). A lágrima tem importante função de manter a higidez ocular (Samuelson, 2013; Park et al., 2015), por meio da lubrificação, nutrição corneana e ação antibacteriana (Hartley et al., 2006).

A lágrima é composta por três camadas: lipídica, aquosa e mucosa (Davidson e Kuonen, 2004; Hartley et al., 2006; Miller, 2008b; Broadwater et al., 2010; Gum e MacKay, 2013; Samuelson, 2013).

A camada lipídica é a mais externa, compreende em torno de 0,1 µm de espessura. É secretado um material oleoso e fosfolípide, polares e não polares, pelas células sebáceas da glândula de Zeis e de Meibômio (Davidson e Kuonen, 2004; Miller, 2008b; Gum e MacKay, 2013; Samuelson, 2013). Sua função é reduzir a evaporação da lágrima e formar uma barreira na margem palpebral evitando o escoamento da lágrima pela face (Hartley et al., 2006; Miller, 2008b; Gum e MacKay, 2013; Samuelson, 2013).

A camada aquosa é secretada pelas células da glândula lacrimal (61%), da terceira pálpebra (35%) (Broadwater et al., 2010; Gum e MacKay, 2013; Samuelson, 2013; Park et al., 2015) e acessórias de Kraus e Wolfring (3%) (Slatter e Dietrich, 2007; Gum e MacKay, 2013; Samuelson, 2013). É composta basicamente por água (98%) e sólidos (2%), predominantemente proteínas, sendo esta a camada mais espessa, em torno de 7 µm (Miller, 2008b; Gum e MacKay, 2013). Suas funções são captar oxigênio para manter o metabolismo corneano, encaminhar material estranho e bactérias para o saco conjuntival, suprir a camada corneana com nutrientes (glicose, oxigênio, aminoácidos, vitamina A, fatores de crescimento e anticorpos), e agir como substância antibacteriana (imunoglobulinas, lactoferrina e lisozimas) (Davidson e Kuonen, 2004; Slatter e Dietrich, 2007; Miller, 2008b).

A camada mucosa é a mais interna, possui espessura de 0,02 a 0,05 µm e consiste de glicoproteínas hidratadas secretadas pelas células caliciformes da conjuntiva (Miller, 2008b; Gum e MacKay, 2013; Samuelson, 2013). Sua função é aderir à superfície corneana lipofílica, preenchendo as irregularidades, e proporcionar uma superfície hidrofílica para aderir à camada aquosa, e assim, distribuí-la uniformemente (Davidson e Kuonen, 2004; Gionfriddo, 2007; Slatter e Dietrich, 2007; Miller, 2008b; Broadwater et al., 2010; Gum e MacKay, 2013; Samuelson, 2013).

O sistema nasolacrimal tem origem nos pontos lacrimais superior e inferior, presentes na conjuntiva palpebral aproximadamente 3 a 5 mm do canto medial do olho. Nos cães, estes

pontos que se assemelham a uma fenda (Gionfriddo, 2007), constituem a abertura dos canalículos lacrimais, que irão se unir em uma dilatação variável, que é o saco lacrimal (Gionfriddo, 2007; Miller, 2008b; Samuelson, 2013). Este saco se esvazia no ducto nasolacrimal que possui abertura no assoalho da cavidade nasal e continua como um ducto até abrir aproximadamente 1 cm da abertura da narina dos cães (Gionfriddo, 2007; Samuelson, 2013).

Aproximadamente 25% da lágrima é perdida pela evaporação, e os demais 75% são perdidos pelo sistema nasolacrimal (Gionfriddo, 2007; Miller, 2008b; Samuelson, 2013). O excesso é conduzido ao saco lacrimal pela gravidade e movimentos das pálpebras. Os pontos lacrimais estão localizados na superfície conjuntival interior e são cercados pelo músculo orbicular ocular que age em sincronia com o movimento de piscar, criando um ambiente de pressão negativa, capaz de agir como uma bomba nas aberturas dos pontos lacrimais superior e inferior, removendo o excesso de filme lacrimal (Miller, 2008b; Samuelson, 2013). Nos intervalos entre os movimentos de piscar, o saco lacrimal é esvaziado, com o escoamento da lágrima pelo ducto nasolacrimal (Maggs, 2008b).

### 3.1.3. Fisiologia do humor aquoso

O HA é um fluido transparente, semelhante ao ultrafiltrado do plasma, oferece suprimento nutricional para estruturas avasculares, como a córnea e o cristalino, remove os produtos excretórios do metabolismo, transportam neurotransmissores e tem importante papel fisiológico para estabilizar o funcionamento normal do olho. Sua dinâmica contínua de produção e drenagem mantém a pressão intraocular constante (Miller, 2008c; Goel et al., 2010; Gum e MacKay, 2013; Davis et al., 2015).

A formação do HA ocorre no corpo ciliar, mais especificamente na *pars plicata*, local onde há os processos ciliares. Após a produção, ele primeiramente preenche a câmara posterior, em seguida, passa pelo orifício pupilar e preenche a câmara anterior, para então ser drenado pela via convencional, ângulo trabecular, e pela via não convencional, via uveoescleral (Miller, 2008c; Davis et al., 2015). Nos cães a drenagem pela via não convencional representa um taxa de 25% do total (Miller, 2008c).

Há três mecanismos de produção do HA: difusão, ultrafiltração e transporte ativo (Goel et al., 2010; Gum e MacKay, 2013; Davis et al., 2015). A difusão dos solutos ocorre quando eles estão abaixo da concentração do gradiente ou então de uma área de maior concentração para uma área de menor concentração. A ultrafiltração ocorre pela passagem do fluxo de água e substâncias dissolvidas pelo endotélio dos capilares fenestrados para o estroma ciliar devido ao gradiente osmótico e pressão hidrostática. O transporte ativo ocorre pelo epitélio ciliar não pigmentado e requer energia para secretar material contra a concentração do gradiente. Este último mecanismo é o mais importante na formação do HA, responsável por aproximadamente 80 a 90% da produção total (Goel et al., 2010; Gum e MacKay, 2013).

## 3.2. MECANISMOS DE PROTEÇÃO DO OLHO

### 3.2.1. Pálpebras

As pálpebras possuem a importante função de proteger superfície do olho, principalmente a córnea e conjuntiva (Davidson e Kuonen, 2004; Maggs, 2008b; Gum e

MacKay, 2013). O movimento de piscar mantém a espessura fisiológica da lágrima, reduz a evaporação da mesma, auxilia na sua distribuição e ao mesmo tempo a encaminha para o sistema nasolacrimal, auxiliando a eliminar pequenas partículas da superfície corneana e conjuntival (Basher, 2007; Maggs, 2008b; Gum e MacKay, 2013).

A terceira pálpebra ou membrana nictitante possui movimento passivo ou ativo, auxilia na proteção da córnea e conjuntiva e distribui o filme lacrimal (Gum e MacKay, 2013). Os cães possuem cílios apenas na pálpebra superior e possuem uma frequência de 3 a 5 piscadas por minuto. Em cães que estão contidos, é normal ter 10 a 20 piscadas por minuto (Gum e MacKay, 2013).

### 3.2.2. Córnea

A córnea é altamente inervada por nervos sensoriais, por meio de ramificações do nervo trigêmeo. A sensibilidade é maior na região periférica em comparação com a região central, estando diretamente ligada com a proteção ocular (Slatter e Dietrich, 2007; Gum e MacKay, 2013). Quando a córnea sofre alguma injúria ou trauma, há um aumento do número de piscadas, retração do BO e prolapso da membrana nictitante como reflexos de sensibilidade que protegem a córnea (Gum e MacKay, 2013).

### 3.2.3. Filme lacrimal

A lágrima é constantemente produzida, drenada e evaporada. Ele remove corpo estranho da córnea e conjuntiva, lubrificando as pálpebras e estas estruturas. Provém nutrientes para a córnea avascular, tem ação antibacteriana, defendendo a superfície ocular de patógenos e propicia uma superfície óptica uniforme (Davidson e Kuonen, 2004; Hartley et al., 2006; Gum e MacKay, 2013). A lágrima é acumulada ao longo da margem palpebral e, pelo ato de piscar, quando o olho abre, este excesso é forçado a mover medialmente em direção aos pontos lacrimais (Gionfriddo, 2007; Gum e MacKay, 2013). A taxa de renovação da lágrima é de aproximadamente 16% por minuto, portanto é esperado que todo o medicamento desapareça depois de 10 minutos da aplicação (McGee et al., 2005).

A lágrima contém substâncias antimicrobianas específicas e inespecíficas, sendo as lisozimas, secretadas pela glândula lacrimal, a primeira opção na linha de defesa contra patógenos oculares. Dentre as imunoglobulinas, a imunoglobulina A é a mais abundante, e é responsável por proteger o olho de infecção viral, colonização bacteriana e infestação parasitária (Davidson e Kuonen, 2004).

### 3.2.4. Barreiras oculares

A barreira sanguínea ocular contém junções no epitélio e endotélio que previnem quase todo o movimento de proteínas e são efetivos contra moléculas de baixo peso molecular. Dentre as barreiras oculares, há duas mais importantes, a barreira hematoaquosa (BHA) e a barreira hematorretiniana (BHR) (Singh et al., 2011; Gum e MacKay, 2013). Entre o HA e o humor vítreo não existe nenhuma barreira, desta forma, há difusão de solutos entre estas duas estruturas e entre a úvea anterior e a esclera (Gum e MacKay, 2013).

#### 3.2.4.1. Barreira hematoaquosa

A BHA, localizada na parte anterior do olho, é formada por células endoteliais dos vasos sanguíneos da íris, o qual possui junções ciliares e células não pigmentadas do epitélio ciliar (Singh et al., 2011). Sua função é controlar o fluxo de substâncias dentro da câmara posterior (Gum e MacKay, 2013), sendo importante para manter a transparência corneana e o equilíbrio dos fluidos oculares (Singh et al., 2011).

A BHA permite a passagem de substâncias do HA para os tecidos adjacentes e também para a corrente sanguínea. Os vasos sanguíneos do corpo ciliar são fenestrados, permitindo a passagem de grande parte do plasma e proteínas, para o corpo ciliar (Singh et al., 2011; Gum e MacKay, 2013).

Esta barreira não é tão efetiva quanto a BHR, devido ao fato de permitir a passagem de proteínas para o HA através do processo de pinocitose e também por orifícios presentes no resto da úvea anterior (Gum e MacKay, 2013).

#### 3.2.4.2. Barreira hematorretiniana

Situada na parte posterior do olho, a BHR é formada por células endoteliais não fenestradas do capilar, que impede o contato da retina com moléculas da circulação sanguínea (Singh et al., 2011; Gum e MacKay, 2013).

Esta barreira permite a passagem de todas as substâncias de baixo peso molecular e proteínas (Gum e MacKay, 2013). Já as células do epitélio pigmentar da retina, possuem junções justapostas impedindo o contato de moléculas da coróide com a retina (Singh et al., 2011; Gum e MacKay, 2013). O fluxo de substâncias permitido pela BHR é importante para manter o equilíbrio retiniano (Gum e MacKay, 2013).

A região mais permeável desta barreira está próxima à cabeça do nervo óptico, que permite a passagem de substâncias da coróide (Gum e MacKay, 2013).

### 3.3. FARMACOCINÉTICA DA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA POR MEIO DA VIA OCULAR

Na terapia ocular a escolha do medicamento é baseada na farmacodinâmica, propriedades farmacocinéticas e na frequência de aplicações (Regnier, 2013). Dentre as possíveis formas de administração de medicamento ocular, a via tópica, por meio de colírios, é a mais utilizada, devido ao fato de ter aplicação fácil não invasiva, a dose poder ser facilmente ajustada e interferir menos com a reparação corneana (Maggs, 2008a; Cholkar et al., 2013). Por este motivo, as soluções oftálmicas tópicas são altamente utilizadas no tratamento de doenças oculares (Maggs, 2008a).

O olho é um órgão que possui várias barreiras naturais e mecanismos que o protegem, restringindo a penetração intraocular do fármaco. O colírio instilado pode adentrar a córnea, esclera e conjuntiva, ir para a circulação sistêmica ou ser drenado pelo sistema nasolacrimal (Maggs, 2008a; Regnier, 2013; Chen, 2015).

As soluções oftálmicas apresentam baixa viscosidade, tonicidade de 300 mOsm/Kg, mesma tonicidade da lágrima e pH entre 4,5 e 9,0, com o intuito da instilação ser confortável e não estimular o lacrimejamento e piscadas (Regnier, 2013).

A lágrima é o primeiro obstáculo quando se administra a gota do colírio. Imediatamente há diluição do mesmo sob a superfície ocular e consequente aumento do volume e capacidade de armazenamento (Singh et al., 2011; Cholkar et al., 2013; Chen, 2015). O volume normal da lágrima presente no olho é aproximadamente 7,0 a 10 $\mu$ L, o volume da gota do fármaco instilado é em média 40 $\mu$ L, e a capacidade de armazenamento da fissura palpebral é de 25 a 30 $\mu$ L (Regnier, 2013). Portanto, apenas a gota do fármaco já excede o volume, de maneira que grande parte seja drenada rapidamente pelo sistema nasolacrimal ou fique em contato com a pálpebra inferior (Regnier, 2013; Chen, 2015). Estima-se que parte da gota administrada na superfície ocular é drenada nos primeiros 15 a 30 segundos após instilação (McGee et al., 2005; Chen, 2015). Isto faz com que o fármaco tenha um baixo contato com a superfície ocular, por um pequeno intervalo de tempo (Chen, 2015).

Após a passagem pelo filme lacrimal pré-corneano, o fármaco pode penetrar a córnea, a conjuntiva ou a esclera. A córnea proporciona moderada resistência, devido ao fato do contato próximo das células basais com os complexos juncionais. Desta forma, o fármaco penetra pela esclera apenas quando esta tem perda da integridade ou quando há uma concentração alta e contínua do fármaco na superfície ocular (Gum e MacKay, 2013).

A córnea é a principal porta de entrada do fármaco (Singh et al., 2011; Regnier, 2013), a penetração ocorre por meio da via transcelular, através das células, ou via paracelular, entre as células. O epitélio corneano é lipofílico, sendo uma grande barreira para as substâncias hidrofílicas. Por outro lado, o estroma, cuja composição é aproximadamente 78% de água, forma uma barreira para as substâncias hidrofóbicas, enquanto o endotélio, constituído por uma camada celular, não oferece muita resistência, apesar de ser lipofílico. Portanto, para uma boa penetração, é ideal que o fármaco tenha uma solubilidade bifásica (Gaudana et al., 2010; Gum e MacKay, 2013; Regnier, 2013). A penetração pela via conjuntival e esclerótica ocorre em menor porcentagem (Regnier, 2013), sendo a conjuntiva, a principal via de absorção de macromoléculas hidrofóbicas, seguida da esclera que possui metade da sua permeabilidade (Singh et al., 2011).

Assim que o fármaco penetra na córnea, ele chega ao HA e é distribuído para a íris, corpo ciliar, cristalino e vítreo, sendo o pico de concentração no HA entre 0,5 e 3 horas após a instilação da gota (Regnier, 2013). O tamanho da molécula, a concentração, o pH e a formulação do medicamento são características capazes de reduzir a superfície de tensão e afetar diretamente na penetração corneana (Gum e MacKay, 2013).

A absorção de fármacos pela conjuntiva é considerada não produtiva quando se compara com a absorção corneana, devido ao fato da conjuntiva possuir capilares sanguíneos conjuntivais e linfáticos, o que direciona o fármaco para a circulação sistêmica, reduzindo assim a biodisponibilidade ocular (Gaudana et al., 2010).

A absorção sistêmica do fármaco também ocorre quando parte da gota aplicada na superfície ocular é drenada pelo sistema nasolacrimal, sendo então absorvida pela mucosa da nasofaringe ou então pela passagem do fármaco pelos vasos sanguíneos fenestrados da conjuntiva e da esclera (Regnier, 2013).

De uma maneira geral, menos de 5% da dose aplicada penetra os tecidos oculares (Gaudana et al., 2010). De acordo com Regnier (2013), entre 1 e 10% do fármaco instilado é capaz de penetrar.

A drenagem do fármaco é diretamente influenciada pelo volume da gota instilada e frequência de piscadas. Uma vez que o fármaco penetrou o olho, a principal rota de drenagem é o fluxo do HA, podendo ser também drenado por vias paralelas como a via hematorretiniana, ser metabolizada ou se ligar a outros tecidos (Regnier, 2013).

### 3.4. FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA OCULARES

#### 3.4.1. Quinolonas

As quinolonas são quimioterápicos antibacterianos com ampla utilização na medicina veterinária (Górniak, 2011). Existem poucas especialidades farmacêuticas para uso oftalmológico em medicina veterinária, sendo que a maioria das prescrições utiliza aquelas para uso humano (Weiner e Gilgert, 2010).

O ácido nalidíxico foi a primeira quinolona produzida, o que ocorreu em 1962 (Yagci et al., 2007). Juntamente com outras, receberam o nome de quinolonas de primeira geração. Com o avançar dos estudos, os pesquisadores adicionaram à estrutura da quinolona um anel de flúor e a partir de então, as demais quinolonas produzidas foram nomeadas fluorquinolonas. Assim, foram formados os grupos conhecidos como segunda geração, representada pelo ciprofloxacino e ofloxacino. Os da terceira geração estão representados pelo levofloxacino. E a quarta geração, representada pelo gatifloxacino, moxifloxacino (Yağci et al., 2007; Górniak, 2011; Viana et al., 2011; Clode, 2013) e besifloxacino (Plumb, 2011; Clode, 2013).

As fluorquinolonas são capazes de penetrar na córnea e atingir o HA após a instilação. Elas inibem a DNA-girase (topoisomerase II) e topoisomerase IV, enzimas responsáveis por manter a superhélice da molécula de DNA durante a replicação bacteriana (Maggs, 2008a; Plumb, 2011; Wong et al., 2012).

As fluorquinolonas apresentam grande potencial na prática da oftalmologia, sendo utilizadas em diversas afecções oculares, como uveíte e úlcera de córnea (Maggs, 2008a; Sosa et al., 2008; Wong et al., 2012; Clode, 2013). O espectro de atividade varia dentre as fluorquinolonas, sendo que as de quarta geração possuem maior eficácia contra Gram-positivos, devido ao fato de inibirem mais a topoisomerase II. A ocorrência da resistência à esta geração de antibióticos é mais difícil devido ao fato de ser necessário que ocorra uma mutação nas duas topoisomerasas (Clode, 2013). Elas possuem excelentes propriedades que favorecem a penetração, incluindo o baixo peso molecular, propriedades lipofílicas, permitindo penetração epitelial e endotelial e baixa ligação com proteínas (Yu-Speight et al., 2005).

##### 3.4.1.1. GA e MO

Em 2003, a *Food and Drug Administration* aprovou o uso das soluções oftálmicas tópicas GA a 0,3% e MO a 0,5%. Desde então, estes fármacos são usados com frequência contra patógenos oculares (McGee et al., 2005; Stern et al., 2006). Estes dois fármacos possuem estruturas químicas semelhante às demais fluorquinolonas (Stern et al., 2006) (Figura 2).

A solução oftálmica de GA a 0,3% é iso-osmótica, como preservativo contém cloreto de benzalcônio 0,005%, ácido etilenodiamino-acético e cloreto de sódio, possui aproximadamente pH 6,0. A solução oftálmica de MO a 0,5% é iso-osmótica, contém ácido bórico, cloreto de

sódio e aproximadamente pH 6,8. Por ser auto-preservada, esta solução não possui conservante (McGee et al., 2005).

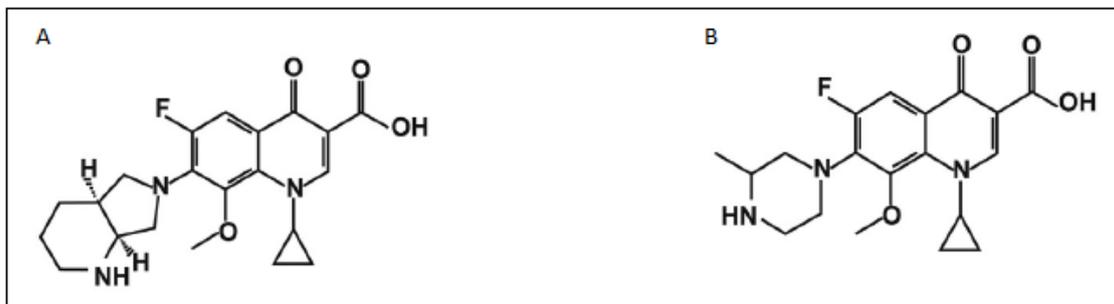


Figura 2. Estrutura química, A – Moxifloxacino; B – Gatifloxacino (Dechênes e Blondeau, 2015).

#### 3.4.1.2. BE

Em maio de 2009, a *Food and Drug Administration* aprovou o uso da solução oftálmica tópica BE a 0,6%, sendo o primeiro e único fármaco desenvolvido exclusivamente para uso oftálmico (Sanders et al., 2011; Brito e Cordeiro, 2013; Deschênes e Blondeau, 2015). Sendo assim, é a única fluorquinolona que não é utilizada sistemicamente, portanto, teoricamente, reduz o risco de desenvolver resistência ao antibiótico (Xiao-Fei et al., 2016). No Brasil, em 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o uso do BE (Brito e Cordeiro, 2013).

Diferentemente das demais fluorquinolonas, o BE possui estrutura química e biológica diferente (Comstock et al., 2010; Deschênes e Blondeau, 2015) pelo fato de possuir um anel de 3-amino-hexahidro 1H-azepina na posição C7 e um cloro na posição C8 (Deschênes e Blondeau, 2015) (Figura 3).

A solução oftálmica de BE a 0,6% contém como preservativo cloreto de benzalcônio 0,01% (Comstock et al., 2010). Sua formulação possui um polímero mucoadesivo (DuraSite®) com propriedades viscoelásticas, capaz de interferir diretamente no sistema de distribuição de fármacos, fazendo com que ele permaneça mais tempo aderido à superfície ocular (Comstock et al., 2010; Chung et al., 2013; Deschênes e Blondeau, 2015).

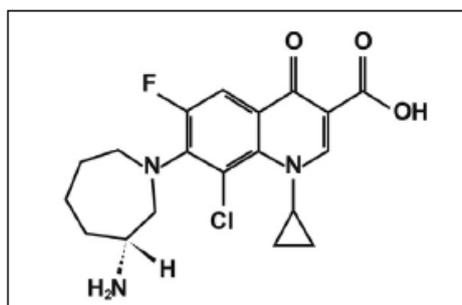


Figura 3. Estrutura química do besifloxacino (Dechênes e Blondeau, 2015).

### 3.4.2. Concentração inibitória mínima

A superfície ocular possui uma microbiota própria que age em conjunto com os fatores humorais com o intuito de manter a saúde ocular e inibir o desenvolvimento e estabelecimento de microrganismos patogênicos. A lágrima possui ação antibacteriana importante na primeira linha de defesa, devido ao fato de remover as impurezas presentes na superfície ocular e impedir a adesão desses microrganismos (Subtil, 2010; Gum e MacKay, 2013).

Um trabalho realizado por Santos et al. (2009) foi determinada a microbiota conjuntival presente em cães hígidos e com afecção ocular. Nos cães hígidos, a bactéria predominante foi *Bacillus* spp., enquanto nos animais com afecções, foi *Staphylococcus intermedius*. Subtil (2010) desenvolveu um estudo retrospectivo de bacteriologia ocular em cães em que determinou maior prevalência de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus canis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Junior et al. (2012) realizaram um trabalho que determinou a etiologia bacteriana presente nos acometimentos oculares e concluíram que a maioria do crescimento bacteriano correspondia a Gram positivos, sendo a bactéria mais predominante o *S. aureus*, seguida do *S. intermedius*. Já Oria et al. (2013), em um estudo avaliando a microbiota presente em cães clinicamente normais e com ceratoconjuntivite seca, determinaram as mesmas bactérias, porém em ordem de prevalência alternada.

Diante do exposto, faz-se necessário um diagnóstico e tratamento adequado da afecção ocular. As bactérias patogênicas possuem uma susceptibilidade variável aos antimicrobianos, sendo importante para o clínico, fazer a escolha mais apropriada do medicamento (Subtil, 2010; Silva, 2012). Para que o medicamento seja eficaz, é essencial que o mesmo chegue ao local de ação com concentrações favoráveis, ou seja, concentrações acima do valor da concentração inibitória mínima (CIM), para que o fármaco seja capaz de inibir adequadamente o crescimento bacteriano. Cada microrganismo possui uma CIM pré-estabelecida (Quadro 1).

Quadro 1. Concentração inibitória mínima, expressa em µg/mL, para o gatifloxacino, moxifloxacino e besifloxacino aos microrganismos oculares mais frequentes.

<b>Microrganismos</b>	<b>Gatifloxacino</b>	<b>Moxifloxacino</b>	<b>Besifloxacino</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,03 - 0,12	0,015 - 0,12	0,015 - 0,06
<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	0,09	0,05	0,5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,12 - 0,5	0,06 - 0,25	0,03 - 0,12
<i>Enterococci species</i>	0,38	0,19	-
<i>Bacillus species</i>	0,09	0,09	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,5 - 2,0	1,0 - 8,0	1,0 - 4,0
<i>Haemophilus influenzae</i>	0,004 - 0,03	0,008 - 0,03	0,015 - 0,06

Adaptado de Mather et al. (2002), CLSI (2012) e Deschênes e Bloudeau (2015).

### 3.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A técnica de cromatografia é uma ferramenta analítica de separação para identificação dos compostos químicos. A LC-MS/MS consiste em uma separação de alta eficiência dos constituintes da amostra, permitindo determinar multianalitos em matriz complexa com excelente seletividade e sensibilidade, e fornece informação estrutural e da massa molar dos analitos (Chlaradla et al., 2008; Demoliner, 2008; Rodrigues, 2011; Amparo, 2013).

A espectrometria de massas é composta por um sistema de injeção da amostra, uma fonte de ionização, analisador de massa, detector de massa e por último um sistema de software para aquisição das amostras (Demoliner, 2008).

Os aparelhos de cromatografia podem utilizar um ou mais analisadores de massa com a intenção de detectar compostos presentes em baixas concentrações em matrizes muito complexas (Demoliner, 2008), ou quando há a necessidade de separar um grande número de analitos (Amparo, 2013). Após esta detecção, um sistema de software mostra o resultado por meio de um cromatograma contendo a relação dos íons em razão da massa e carga (Chlaradla et al., 2008).

### 3.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A validação do método analítico, garante por meio de estudos experimentais e fornecimento de evidências objetivas, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas. Assegurando assim a confiabilidade e reprodutibilidade da metodologia utilizada em um novo método analítico. Na validação da técnica os parâmetros analíticos normalmente determinados são: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e precisão (ANVISA, 2003; Ribani et al., 2004; Demoliner, 2008; INMETRO, 2010; Amparo, 2013).

Seletividade é a capacidade do método de identificar o analito de interesse mesmo na presença de possíveis interferentes, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003).

A linearidade é a habilidade do método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em uma dada faixa de aplicação. Ela é dada como uma expressão matemática utilizada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2010).

A equação da reta é:

$$y = ax + b$$

Onde:  $y$  = resposta medida (área do pico);  $x$  = concentração;  $a$  = interseção como eixo  $y$ , quando  $x = 0$ ;  $b$  = inclinação da curva analítica (sensibilidade).

O LD corresponde à menor concentração detectada do analito, não sendo necessariamente, quantificada. É definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito seja maior que zero. O LQ corresponde à menor concentração quantificada do analito (INMETRO, 2010).

A exatidão expressa a concordância entre o resultado de um método em estudo em relação ao valor verdadeiro. É determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, a partir de três concentrações (alta, média e baixa) com, no mínimo, duplicata de cada concentração (INMETRO, 2010).

A precisão avalia a dispersão de resultados independentes, repetidos de uma mesma amostra. É determinada por meio da repetitividade e da reprodutibilidade, que normalmente são dependentes da concentração do analito e devem ser determinadas para um diferente número de concentrações. A repetitividade determina a característica da dispersão dos resultados de medições sucessivas de um mesmo método, sob as mesmas condições, em várias concentrações na faixa de trabalho. A reprodutibilidade determina o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra analisada em dias, analista ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2003).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi realizado após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o protocolo de submissão nº 266/2014 (Anexo 1), do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG (EV-UFMG) e pelo Comitê de Ética do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Belo Horizonte (Anexo 2).

### 4.1. LOCAL

Este experimento foi realizado no CCZ da unidade São Bernardo, em Belo Horizonte, Minas Gerais. As amostras de córnea e HA foram processadas no Laboratório de Toxicologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da EV-UFMG e analisadas no Centro de Excelência em Monitoramento de Multirresíduos da EV-UFMG, os BO foram processados e analisados no Laboratório de Patologia na EV-UFMG.

### 4.2. SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados 22 cães machos, escolhidos sem distinção de raça e peso e com idade aproximada entre um e sete anos. Todos os cães eram portadores de leishmaniose visceral canina (LVC), diagnosticada por meio do teste de triagem imunocromatográfico DPP® e o teste ELISA como confirmatório, sendo este o motivo pelo qual foi realizada a eutanásia dos animais. Os cães, previamente selecionados, foram submetidos ao exame oftalmológico para avaliar a saúde ocular. Com o auxílio da lanterna *Mini Maglite*® foi realizada a ectoscopia, o oftalmoscópio direto *Heine*® Beta 200S auxiliou na avaliação das estruturas oculares por meio de ajustes de diferentes dioptrias e o biomicroscópio de lâmpada de fenda portátil *Alltion*® (Wuzhou), permitiu uma avaliação ocular mais minuciosa. Estes aparelhos permitiram avaliar a integridade da córnea e dos tecidos oculares externos. Os animais portadores de alterações oculares clinicamente diagnosticáveis não foram incluídos no estudo.

### 4.3. ESPECIFICAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após a avaliação e seleção dos animais eles foram distribuídos em seis grupos aleatoriamente. Nos três primeiros grupos (G1, G2 e G3) foram avaliadas, durante dez minutos, as penetrações dos colírios quimioterápicos GA a 0,3% (*Zymar*® - Allergan Produtos Farmacêuticos, São Paulo, Brasil), MO a 0,5% (*Vigamox*® - Alcon Laboratórios do Brasil, São Paulo, Brasil) e BE a 0,6% (*Besivance*® - Bausch & Lomb Incorporated, Flórida, EUA), respectivamente. Nos demais grupos (G4, G5 e G6) foram avaliadas as penetrações dos colírios quimioterápicos durante uma hora, seguindo a mesma sequência anterior dos fármacos (Quadro 2).

Quadro 2. Grupos experimentais formados no presente estudo.

10 MINUTOS		
Grupos	Número de olhos	Colírio antibiótico
G1	8	GA
G2	8	MO
G3	8	BE
1 HORA		
Grupos	Número de olhos	Colírio antibiótico
G4	7	GA
G5	7	MO
G6	6	BE

#### 4.4. ADMINISTRAÇÃO DO FÁRMACO E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Os animais receberam uma gota do colírio quimioterápico no olho direito e esquerdo, referente ao grupo em que estavam. O volume da gota correspondente ao GA é 45 µL, ao MO é 38 µL e ao BE é 32 µL. A gota do colírio foi administrada na parte superior lateral do BO, e neste momento de manipulação do animal, foi tentado minimizar ao máximo seu estresse, com o intuito de não aumentar o número de piscadas.

Após o tempo de espera para a penetração do colírio antibiótico referente a cada grupo, os animais foram submetidos ao procedimento da eutanásia realizada por meio da administração intramuscular de xilazina (6,0 mg/kg), seguida da obtenção do acesso venoso e administração de tiopental (25 mg/kg) e sulfato de magnésio (em quantidade crescente até a parada cardíaca). A eutanásia foi realizada pelos médicos veterinários do CCZ de acordo com as exigências do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

#### 4.5. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Após a eutanásia, foi extraído o BO, por meio da cantotomia lateral, e posterior dissecação dos tecidos perioculares em direção ao nervo óptico e secção do mesmo. O BO foi removido e retirado o excesso da conjuntiva presente.

##### 4.5.1. HA

A amostra de HA foi coletada das câmaras anterior e posterior na quantidade mínima de 500 µL, utilizando agulha de insulina 12,7 mm x 0,33 mm, que penetrou na córnea, na região da

câmara anterior, próxima ao limbo e paralela à íris. As amostras foram acondicionadas em tubos para microcentrífuga de 1,5 mL, devidamente identificados em relação ao material armazenado, fármaco utilizado e o tempo de penetração. Após cada coleta as amostras foram armazenadas em freezer *Revco*® na temperatura de -80°C até o momento de serem processadas (item 4.7.2).

#### 4.5.2. Córnea

A córnea foi retirada do BO com o auxílio do bisturi de cabo número 3, com lâmina número 15 e pinça de córnea, retirando todo fragmento circular, em sentido horário. As amostras foram acondicionadas em tubos para microcentrífuga de 2,0 mL, devidamente identificados em relação ao material armazenado, fármaco utilizado e o tempo de penetração. Após cada coleta as amostras foram armazenadas em freezer *Revco*® na temperatura de -80°C até o momento de serem processadas (item 4.7.2).

#### 4.5.3. Bulbo ocular

Após a retirada do HA e da córnea, o BO de cada animal foi imerso imediatamente no fixador solução de Davidson, constituído por ácido acético glacial (100 mL), formalina tamponada 10% (200 mL), álcool 95% (300 mL) e água destilada (300 mL) (Latendresse et al., 2002). Os BO foram armazenados em frascos, do tipo coletor de urina e fezes, devidamente identificados, em relação a cada olho (direito ou esquerdo), ao fármaco utilizado e ao tempo de penetração.

Após 24 horas de permanência no fixador, o BO foi seccionado com o auxílio da lâmina de micrótomo com um corte único transversal, preservando ao máximo a integridade do cristalino e do nervo óptico. Posteriormente, permaneceu por mais 12 horas imerso na mesma solução para, em seguida, ser transferido para o álcool 70%, ficando neste meio até o momento do processamento histológico (item 4.6).

### 4.6. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

O BO foi identificado e envolvido por uma gaze, para iniciar o processo de desidratação, permanecendo uma hora em cada solução crescente de álcool. Na sequência ocorreu a diafanização em xilol no tempo médio de 50 minutos, para então, ser embebido na parafina, seguida do emblocamento. Os cortes histológicos foram realizados com espessura de 4 µm, fixados em lâmina de vidro, corados com a coloração hematoxilina e eosina e montados com lamínula utilizando o bálsamo do Canadá. As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio óptico de luz do Laboratório de Patologia na EV-UFMG.

### 4.7. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DAS AMOSTRAS

#### 4.7.1. Estudos dos métodos de extração

Foram realizados testes de extração, na córnea e HA, dos três analitos em estudo, com o intuito de desenvolver um método simultâneo de detecção do GA, MO e BE por LC-MS/MS.

Para isto, foi utilizado o aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do Laboratório de Toxicologia na EV-UFGM.

Foi utilizado o CLAE *Severn Analytical*, modelo SA6410B® acoplado ao detector ultravioleta visível (UV/Vis SA6510), configurado com comprimento de onda igual 278 nm e taxa de fluxo de 1,0 mL/minuto. Foi empregada a coluna cromatográfica *Shim-pack CLC-ODS(M)® C18*, com dimensões de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro, constituído por partículas de 5 µm de tamanho. A fase móvel foi constituída de 300 mL de água destilada, 0,1 g de ácido tricloroacético e 150 mL de acetonitrila, segundo técnica proposta por Cavazos-Rocha et al. (2014).

Primeiramente, para a extração do analito e reconhecimento no CLAE, uma gota de cada colírio foi diluída em 250 µL de solução de cloreto de sódio 0,9%. Foram testados, separadamente, quatro solventes, com o volume de 250 µL, constituído de metanol, metanol/água (4:1, v/v), acetonitrila, e por último, acetonitrila/água (4:1, v/v), como demonstra na figura abaixo, representando apenas o GA (Figura 4).

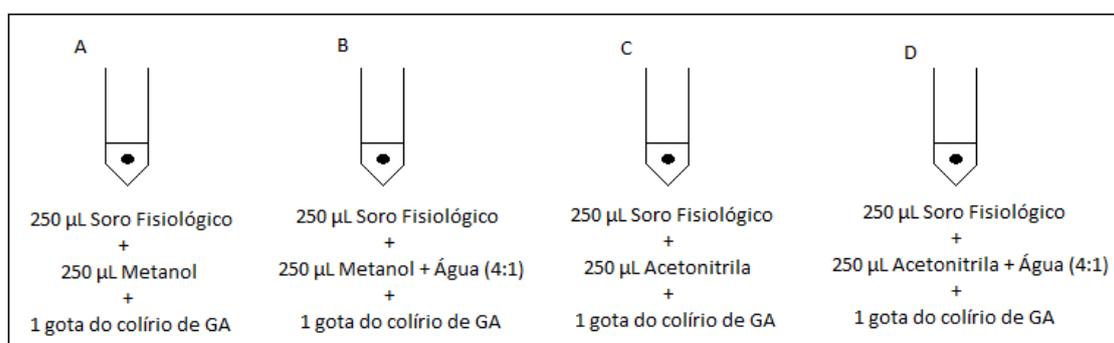


Figura 4. Esquema representativo da diluição da gota do fármaco, na solução de cloreto de sódio a 0,9% e nos quatro meios de solução. A – metanol; B – metanol/água; C – acetonitrila; D – acetonitrila/água.

Estas amostras foram analisadas separadamente no CLAE, obtendo adequada curva de resposta. Em seguida, foi feita uma mistura das amostras dos três analitos, que foram diluídos em metanol, com a finalidade de realizar a leitura simultânea.

Posteriormente, foram utilizadas amostras em branco de córnea e HA com o objetivo de testar os métodos de extração e observar qual solvente apresentaria maior recuperação do analito e boa precipitação de partículas.

Para a extração do analito no HA, foram utilizadas amostras em branco, que foram processadas de acordo com o item 4.7.2. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foi transferido para um tubo de 10 mL, acrescido de 1 mL de cada um dos quatro meios de solução com 1 mL do reagente colorimétrico pela técnica do biureto. Desta forma, a amostra que apresentou menor intensidade de cor no sobrenadante foi a que obteve melhor precipitação de proteínas. Apenas o solvente que apresentou melhor resultado foi utilizado no CLAE. Em cada tubo para microcentrifuga foi colocado 5 µL do colírio, acrescido com 1.000 µL do solvente e 500 µL de HA, as amostras foram processadas (item 4.7.2) e realizada a leitura no CLAE.

Sob a superfície de cada córnea isolada, foram adicionados 5 µL do colírio dos três fármacos e por último, 5 µL de solução de cloreto de sódio a 0,9%. Após uma hora, as córneas foram parcialmente seccionadas e colocadas nos tubos para microcentrifuga de 2,0 mL

separadamente. Foram adicionados os quatro solventes utilizados anteriormente, como demonstrado no esquema abaixo, representando apenas o GA (Figura 5). Em seguida foi feito o processamento destas amostras (item 4.7.2).

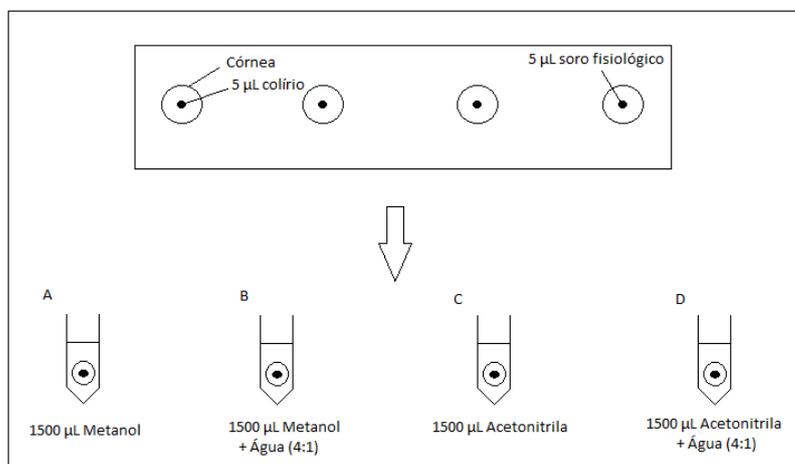


Figura 5. Esquema representativo, apenas para gatifloxacino, dos testes de extração na córnea realizado com os quatro meios de solução. A – metanol; B – metanol/água; C – acetonitrila; D – acetonitrila/água.

#### 4.7.2. Preparo das amostras

O HA foi descongelado em temperatura ambiente e 500 µL foram transferidos para outro tubo para microcentrífuga de 2,0 mL, devidamente identificado. Em seguida, foi adicionado 1 mL da mistura de acetonitrila com água (4:1, v/v), e posteriormente, a amostra foi para o vórtex *Fisatom* modelo 772, durante 10 segundos, e depois, na micro centrífuga refrigerada NT 805, durante 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa CHROMAFIL® O-20/15 MS (PTFE) 15 mm/0,20 µm e transferido para tubo *vial Waters* 12x32 mm com tampa pré-fendida para, então, ser analisado por meio da técnica LC-MS/MS.

A córnea foi descongelada em temperatura ambiente e pesada em balança analítica *Shimadzu* AUY 220. Em seguida, foi parcialmente seccionada em fragmentos e transferida para outro tubo para microcentrífuga de 2,0 mL, devidamente identificado. Posteriormente, foi acrescentado 1.500 µL da mistura metanol com água (4:1, v/v). A amostra foi mantida no sonicador *Saunders Medical SoniClean 2*, durante 25 minutos, em seguida, no vórtex *Fisatom* modelo 772, por 10 segundos, e por último, na micro centrífuga refrigerada NT 805, durante 10 minutos. A amostra foi filtrada em filtro de seringa CHROMAFIL® O-20/15 MS (PTFE) 15 mm x 0,20 µm e transferida para tubo *vial Waters* 12x32 mm com tampa pré-fendida para, então, ser analisado por meio da técnica LC-MS/MS.

## 4.8. PREPARO DOS PADRÕES ANALÍTICOS

Foram utilizados os padrões de referência para os três fármacos, todos apresentando grau de pureza superior à 98%: Sesquihidratado de Gatifloxacino (FLUKA®, código 32345-50MG); Hidroclorido de Moxifloxacino (FLUKA®, código Y0000703); e Cloridrato de Besifloxacino (SANTA CRUZ®, código SANT-396189).

Os padrões analíticos foram ressuspensos e soluções estoque foram preparadas na concentração de 1.000 µg/mL constituída de metanol/água (4:1, v/v) e armazenadas a -20°C. As soluções de trabalho foram estabelecidas por meio da combinação dos padrões dos três analitos, acrescido do diluente constituído de metanol/água (4:1, v/v), nas diferentes concentrações de 16,66; 8,33; 3,33; 1,67; 0,83 e 0,42 µg/mL armazenada a -20°C.

## 4.9. PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA VALIDAÇÃO DA TÉCNICA

### 4.9.1. Estudo da seletividade

Para a avaliação da seletividade, os cromatogramas gerados a partir das análises de amostras brancas foram comparados com os cromatogramas obtidos nas análises da solução padrão dos fármacos, com o intuito de verificar a ocorrência de compostos interferentes eluindo nos tempos de retenção dos analitos de interesse.

### 4.9.2. Determinação da linearidade das curvas analíticas

Para a determinação da linearidade foram construídas curvas de calibração do analito em solução, nas concentrações de 16,66; 8,33; 3,33; 1,67; 0,83 e 0,42 µg/mL em triplicata. Em seguida, foi construído um gráfico relacionando a área do pico *versus* concentração e, por regressão linear, foram determinados a equação da curva analítica, o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) e coeficiente de correlação (r).

### 4.9.3. Determinação do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD foi determinado por meio do método visual em que realizou a adição de várias concentrações conhecidas do analito de modo a distinguir o sinal do ruído pela visualização da menor concentração visível de forma confiável, sendo a relação sinal/ruído de 3/1, enquanto para o LQ, foi utilizado como parâmetro a relação sinal/ruído de 10/1 (INMETRO, 2011).

### 4.9.4. Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio da realização de ensaios de recuperação nas amostras. Amostras brancas foram fortificadas nas concentrações baixa (3,33 µg/mL), média (8,33 µg/mL) e alta (16,66 µg/mL) e a recuperação foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Os valores obtidos foram comparados com os estabelecidos pelo CODEX (2009) para a aceitabilidade dos resultados.

#### 4.9.5. Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio de estudos de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial. Para a avaliação de repetitividade foram realizadas análises sucessivas da mesma amostra, em curtos intervalos de tempo e efetuadas sob as mesmas condições (equipamentos e analista). Amostras de córnea e HA foram adicionadas de solução padrão dos fármacos para realização de nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa (3,33 µg/mL), média (8,33 µg/mL) e alta (16,66 µg/mL) com três réplicas cada (ANVISA, 2003; ICH, 2005). No estudo da reprodutibilidade intralaboratorial, foram realizadas as mesmas análises, variando, porém, os dias de análise, totalizando 18 determinações.

Os coeficientes de variação (CV) foram avaliados de acordo com parâmetros estabelecidos pela EC (2002) e CODEX (2009).

#### 4.9.6. Condições cromatográficas e eletrônicas

As amostras foram analisadas no sistema de cromatografia líquida de ultra performance Acquity® UPLC acoplado a um espectrômetro de massas híbrido Xevo® G2-S QToF (Waters, Milford, MA, USA). A separação cromatográfica foi realizada por meio de uma coluna Acquity® UPLC BEH C18 2,1 x 100 mm x 1,7 µm a 45°C e amostra em 15°C. O volume injetado foi de 10 µL e a fase móvel constituída do eluente A (água com 0,1% de ácido fórmico) e eluente B (metanol com 0,1% de ácido fórmico) em um fluxo de 0,5 mL/min. A eluição foi realizada em modo gradiente de acordo com os seguintes intervalos: 0 – 3,0 min, 75 – 50% A; 3,0 – 3,2 min, 50 – 5% A; 3,2 – 3,4 min, 5% A; 3,4 – 3,5 min, 5 – 75% A; 3,5 – 4,0 min, 75% A, resultando em uma corrida analítica total de 4 minutos.

As análises de massas foram obtidas por meio de ionização por *electrospray* em modo positivo (ESI+), voltagem do capilar de 3,0 kV, temperatura do gás de dessolvatação de 150°C e temperatura da fonte de 80°C. O fluxo do gás de dessolvatação é 600 L/hora de nitrogênio. A aquisição dos dados foi pelo método MS<sup>E</sup> em modo positivo, alternando alta e baixa energia na câmara de colisão. Foi monitorado o tempo de retenção para cada analito, sendo ± 1,42 minutos para o GA, ± 1,80 minutos para o MO e ± 2,92 minutos para o BE. Foi monitorada a relação massa e carga para o íon precursor, sendo 376 para o GA, 402 para o MO e 394 para o BE, e transições, sendo 358 e 261 para o GA, 384 e 364 para o MO e 356 e 279 para o BE. Na função de alta energia foi feita uma rampa de energia de colisão de 25 a 45 V. O *software* MassLynx 4.1 foi utilizado como instrumento de controle para detectar e integrar os picos.

#### 4.10. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

As médias e os desvios-padrão foram calculados utilizando todas as amostras analisadas, mesmo aquelas com concentrações indetectáveis. Para os compostos que não foram detectados (abaixo do LD), a concentração utilizada para análise estatística foi metade do LD. Para os compostos que foram detectados (acima da LD), mas não foram quantificados (abaixo

do LQ), a concentração utilizada para análise estatística foi a média entre o LD e o LQ (Pacífico da Silva et al., 2015). A análise estatística das variáveis quantitativas, com o intuito de comparar o mesmo fármaco nos diferentes tempos (10 minutos e uma hora), foi realizada por meio do teste Mann-Whitney, e com o intuito de comparar o mesmo tempo entre os fármacos (GA, MO e BE), a análise estatística foi realizada por meio do teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls (Sampaio, 2015).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. HISTOLOGIA

Como ferramenta para analisar os olhos, a histologia foi realizada em um total de 44 olhos. Apenas três (6,81%) apresentavam infiltrado inflamatório histiocitário multifocal a coalescente moderado, na conjuntiva bulbar (Figura 6). Em outros três olhos (6,81%) houveram a presença de infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário difuso moderado em todo o corpo ciliar (Figura 7). Em um olho (2,27%) observou-se infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário multifocal a coalescente moderado na região da esclera (Figura 8). Em quatro olhos (9,09%), correspondente a dois animais, observou-se degeneração cística periférica da camada nuclear interna (Figura 9).

Desta forma, 25% dos olhos analisados apresentaram alguma alteração histopatológica, sendo que apenas 15,1% apresentaram lesões inflamatórias, nas demais lâminas não foram observadas alterações nos tecidos oculares.

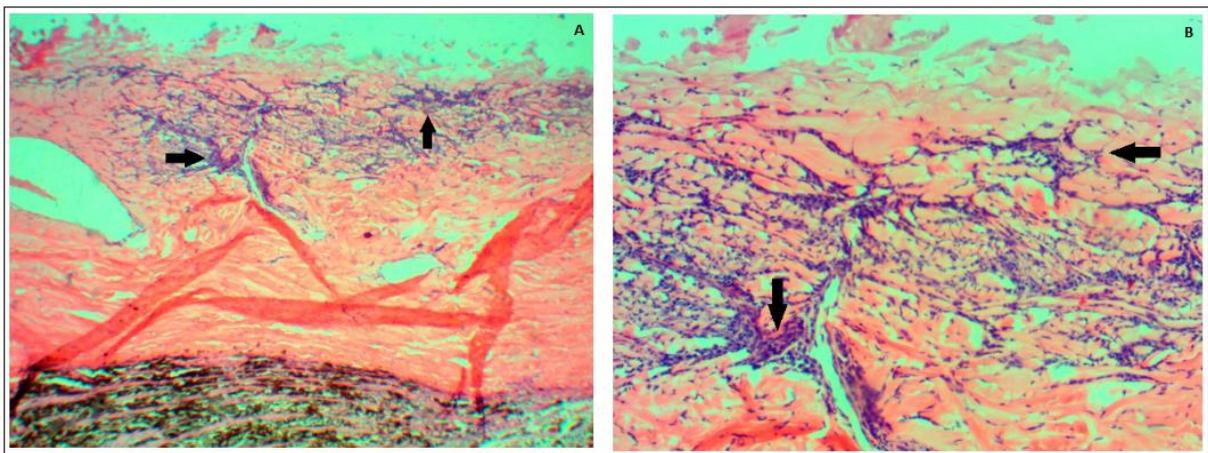


Figura 6. Fotomicrografia da conjuntiva bulbar de cão portador de leishmaniose. Observar infiltrado inflamatório histiocitário multifocal a coalescente moderado (seta preta). A – HE (50x); B – HE (200x).

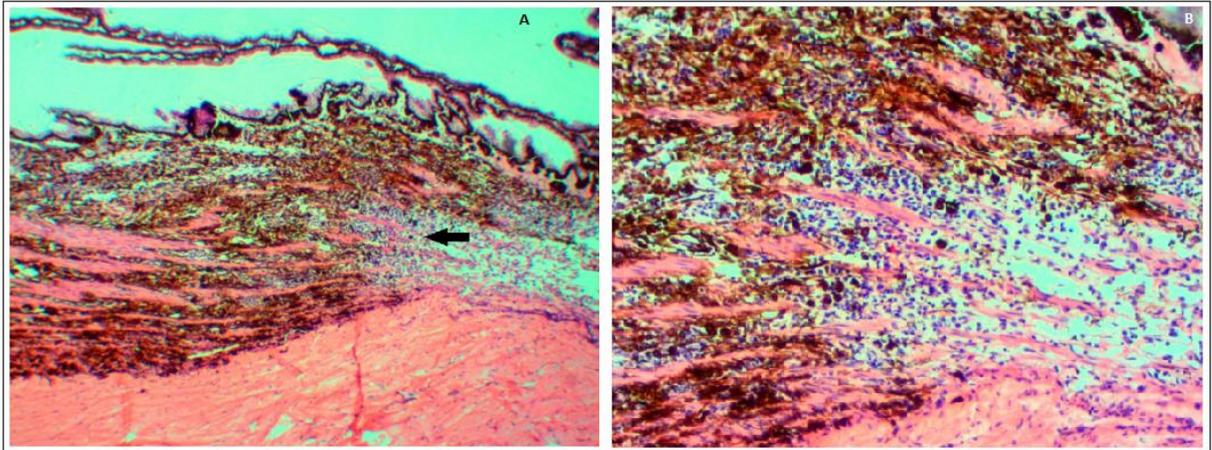


Figura 7. Fotomicrografia do corpo ciliar de cão portador de leishmaniose. Observar infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário multifocal a coalescente moderado (seta preta). A – HE (50x); B – HE (200x).

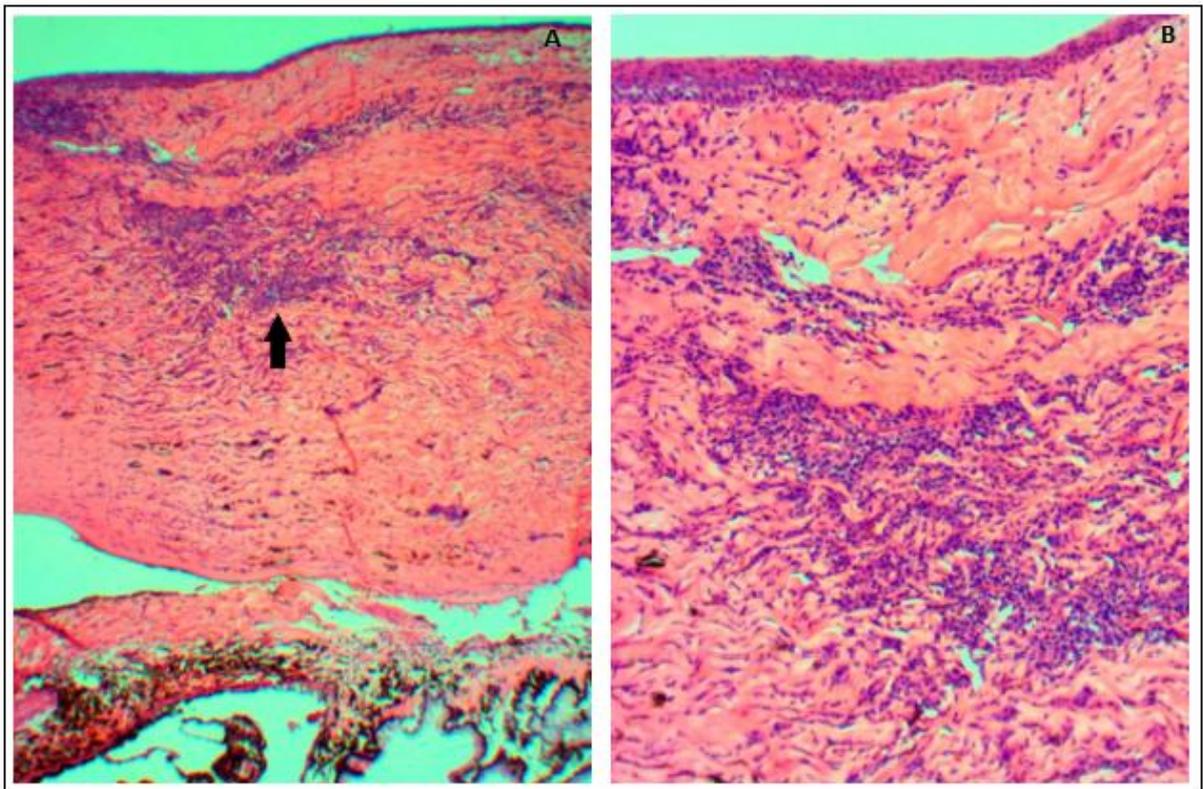


Figura 8. Fotomicrografia da esclera de cão portador de leishmaniose. Observar infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário multifocal a coalescente moderado (seta preta). A – HE (50x); B – HE (200x).

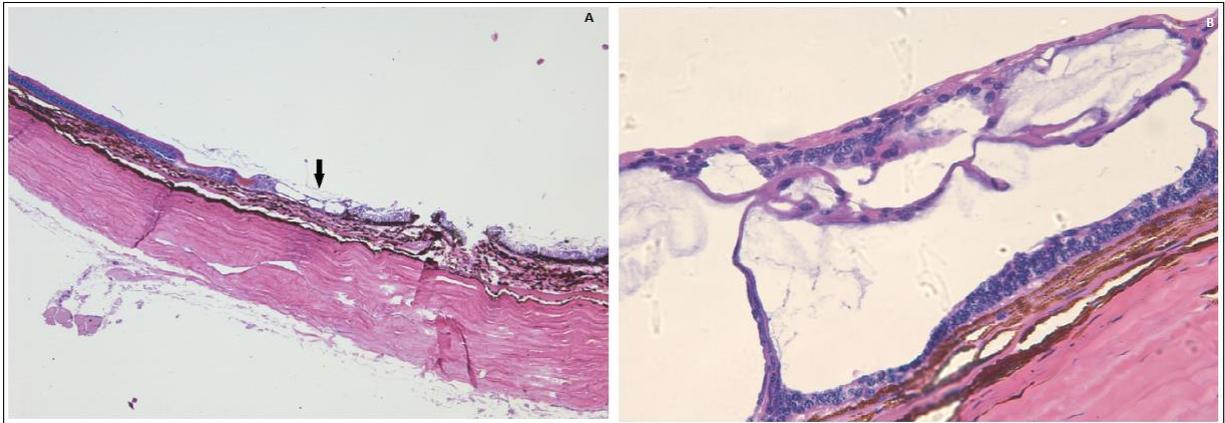


Figura 9. Fotomicrografia da retina de cão portador de leishmaniose. Observar degeneração cística periférica da camada nuclear interna (seta preta). A – HE (50x); B – HE (200x).

## 5.2. ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Com o intuito de realizar uma leitura simultânea dos três analitos de interesse no CLAE-UV, foi feita uma mistura das amostras com uma gota de cada colírio diluída no metanol, obtendo o seguinte cromatograma (Figura 10).

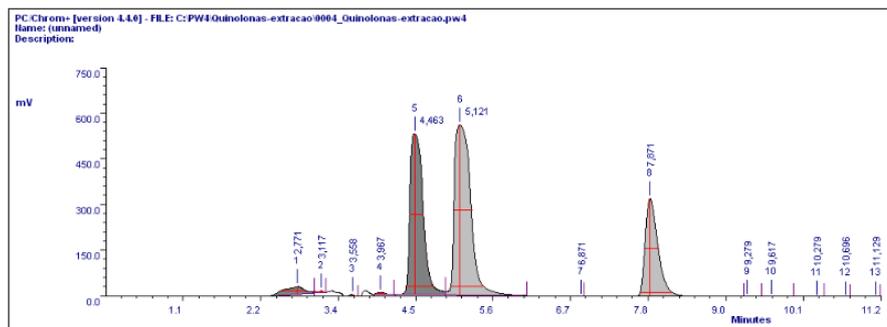


Figura 10. Cromatograma da mistura das amostras dos três analitos, representadas nos picos 5 (Gatifloxacino), 6 (Moxifloxacino) e 8 (Besifloxacino).

Nos testes de extração do analito realizado com o HA, o solvente de acetonitrila/água (4:1, v/v) foi que o apresentou melhor precipitação de proteínas e bom nível de recuperação do analito, observado por meio dos valores comparados da área e altura da gota do colírio e desta amostra (Figura11).

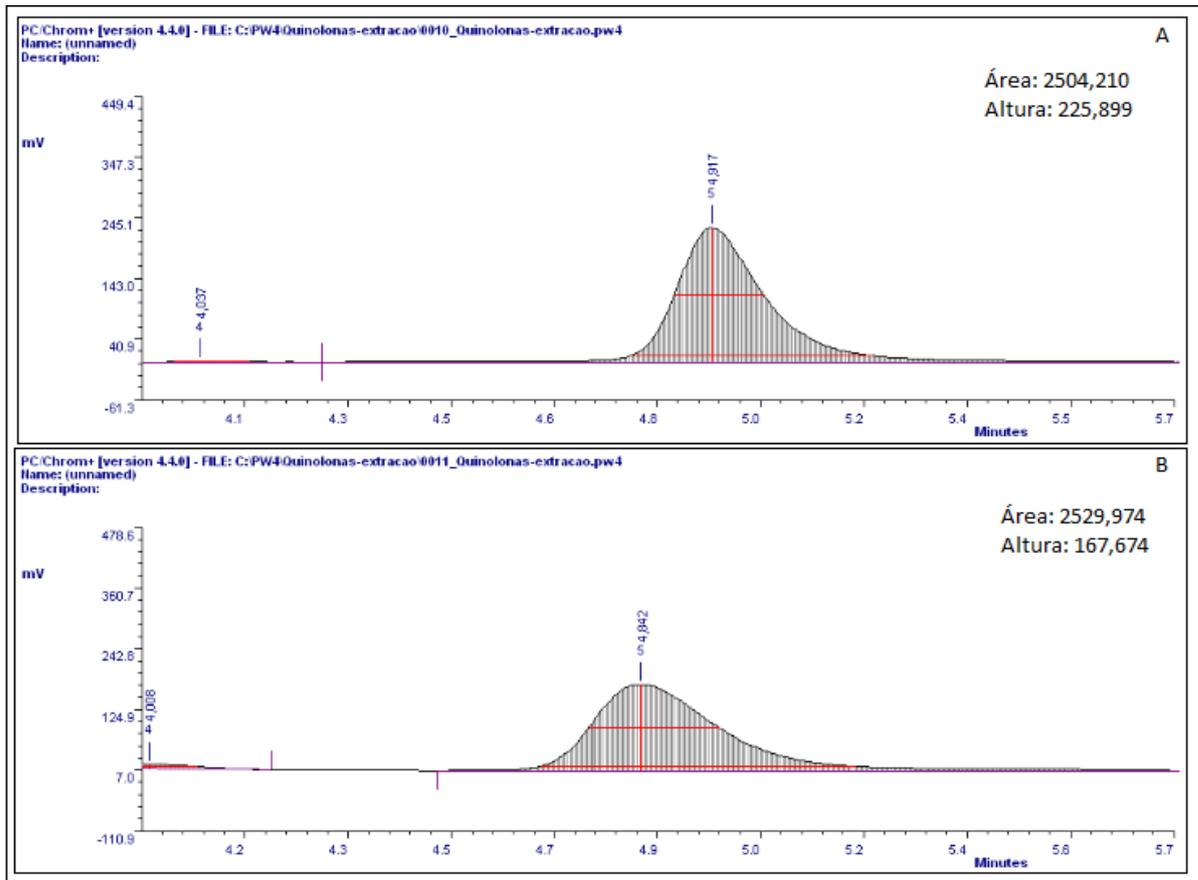


Figura 11. A – Cromatograma da amostra da gota de moxifloxacino diluído em metanol/água (pico 5); B – Cromatograma da extração do moxifloxacino no humor aquoso, diluído em acetonitrila/água (pico 5).

Nos testes de extração do analito realizados com a córnea, o solvente de metanol/água (4:1, v/v) foi o que apresentou melhor nível de recuperação do analito, observado por meio dos valores comparados da área e altura da curva da gota do colírio e desta amostra (Figura 12).

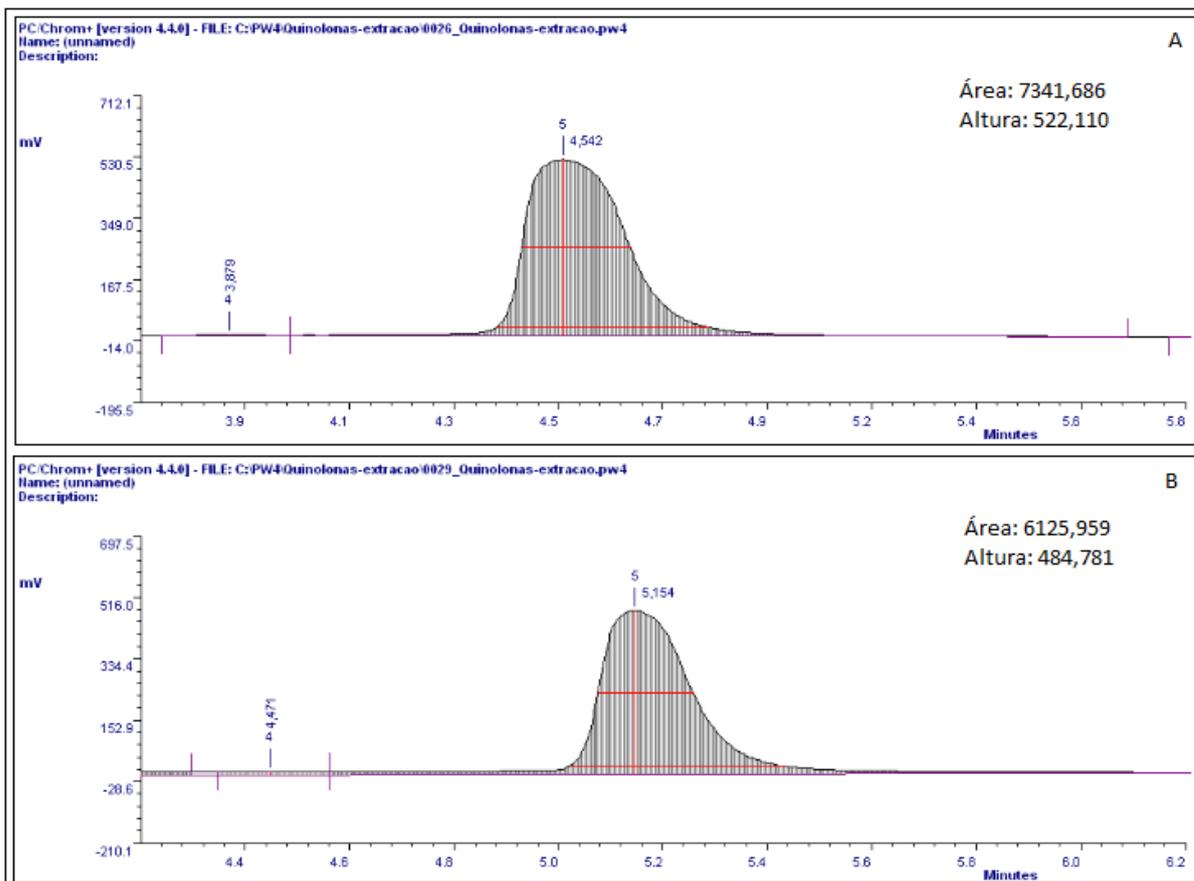


Figura 12. A – Cromatograma da amostra da gota de moxifloxacino diluído em metanol/água (pico 5); B – Cromatograma da extração do moxifloxacino na córnea diluído em metanol/água (pico 5).

### 5.3. VALIDAÇÃO DA TÉCNICA

O método analítico por LC-MS/MS foi validado e apresentou critérios de desempenho adequados para detecção e quantificação simultânea de GA, MO e BE (Figura 13).

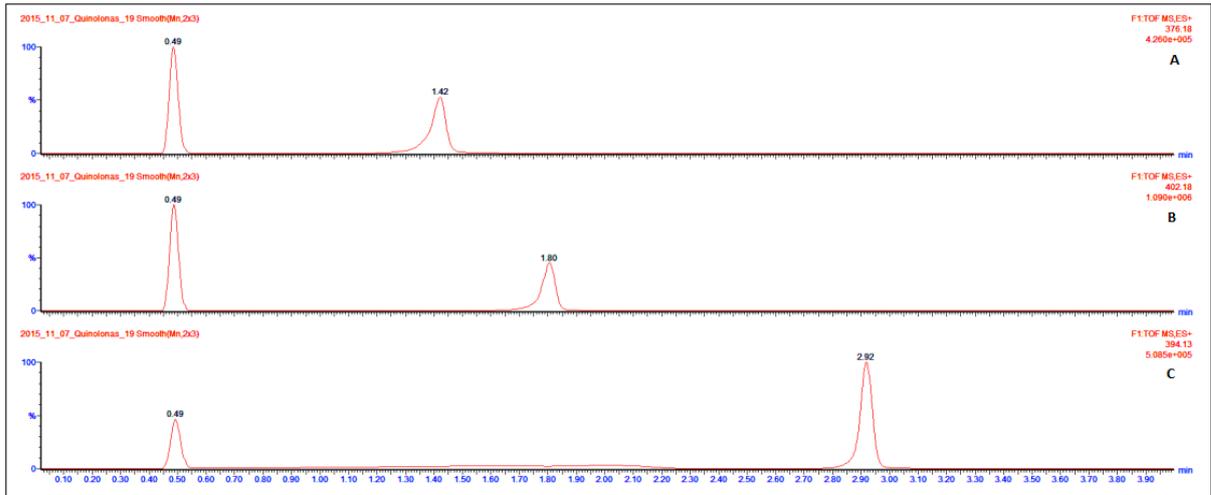


Figura 13. Cromatograma padrão dos analitos. A – Gatifloxacino; B – Moxifloxacino; C – Besifloxacino.

### 5.3.1. Seletividade

Os cromatogramas obtidos nas análises da mistura da solução padrão e das matrizes em branco estão representados abaixo (Figura 14 e 15).

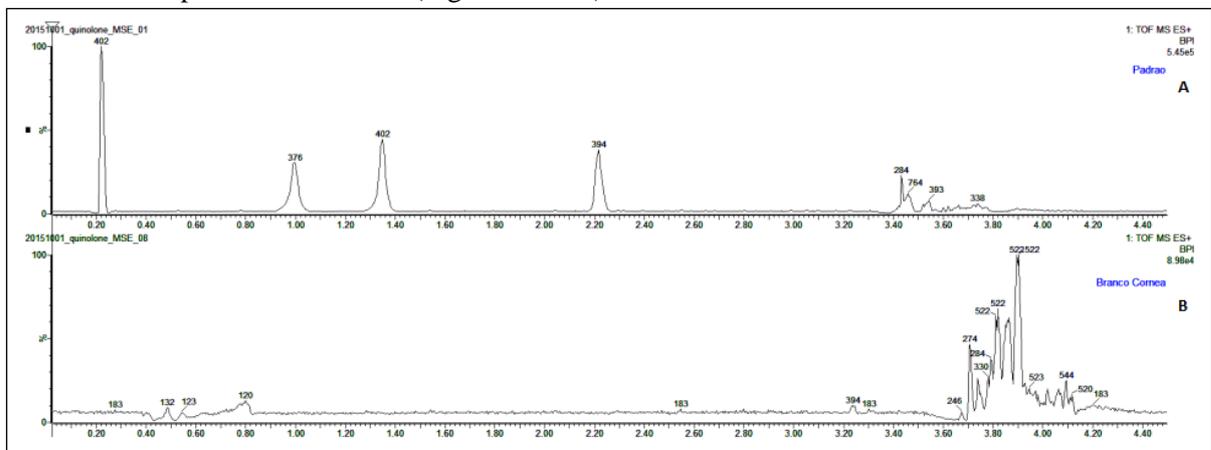


Figura 14. A – Cromatograma da mistura da solução padrão dos três analitos; B – Cromatograma da extração na córnea sem nenhum analito.

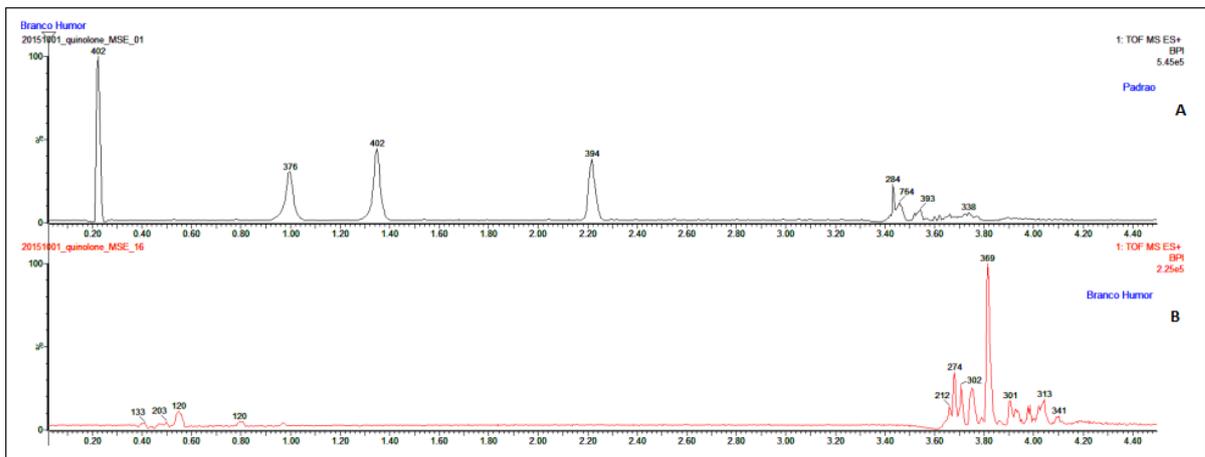


Figura 15. A – Cromatograma da mistura da solução padrão dos três analitos; B – Cromatograma da extração no humor aquoso sem nenhum analito.

### 5.3.2. Linearidade

As curvas analíticas de extratos das matrizes, córnea e HA, fortificadas para cada analito nas concentrações de 0,42 a 16,66 µg/mL estão representadas abaixo (Figura 16 a 18 e Tabela 1). O cálculo dos coeficientes de regressão da curva analítica foi analisado com precaução para que todos estivessem dentro da faixa linear.

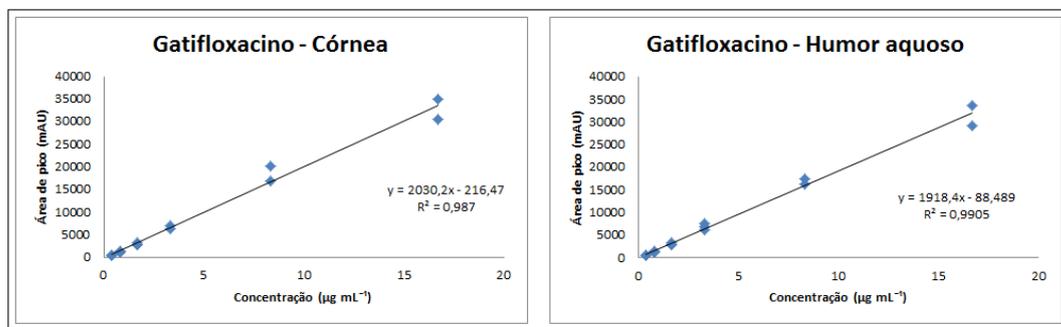


Figura 16. Linearidade da curva nas matrizes, córnea e humor aquoso, fortificadas nas concentrações de 0,42 a 16,66 µg/mL de gatifloxacino.

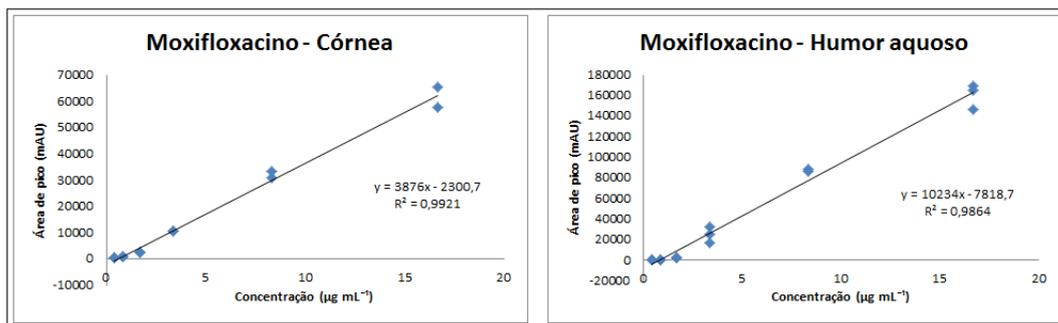


Figura 17. Linearidade da curva nas matrizes, córnea e humor aquoso, fortificadas nas concentrações de 0,42 a 16,66  $\mu\text{g/mL}$  de moxifloxacin.

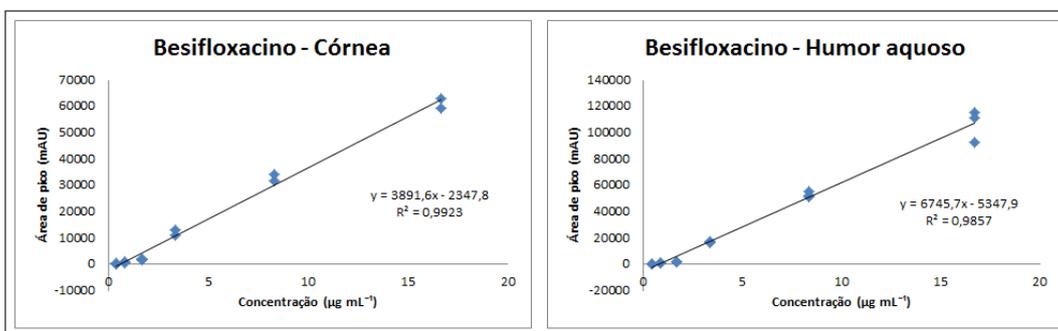


Figura 18. Linearidade da curva nas matrizes, córnea e humor aquoso, fortificadas nas concentrações de 0,42 a 16,66  $\mu\text{g/mL}$  de besifloxacin.

Tabela 1. Equações de regressão linear e coeficiente de determinação das curvas analíticas para cada analito adicionado às matrizes, córnea e humor aquoso.

<b>Analito</b>	<b>Equação</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>r</b>
<b>Gatifloxacino</b>			
Córnea	$y = 2030,2x - 216,47$	0,987	0,993
Humor aquoso	$y = 1918,4x - 88,489$	0,9905	0,995
<b>Moxifloxacino</b>			
Córnea	$y = 3876x - 2300,7$	0,9921	0,996
Humor aquoso	$y = 10234x - 7818,7$	0,9864	0,993
<b>Besifloxacino</b>			
Córnea	$y = 3891,6x - 2347,8$	0,9923	0,996
Humor aquoso	$y = 6745,7x - 5347,9$	0,9857	0,993

R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação; r = coeficiente de correlação.

### 5.3.3. Limite de detecção e quantificação

Os três analitos apresentaram o mesmo LD e LQ independente da matriz avaliada (Tabela 2).

Tabela 2. Limites de detecção e de quantificação do método.

<b>Analito</b>	<b>Limite de Detecção (µg/mL)</b>	<b>Limite de Quantificação (µg/mL)</b>
<b>Gatifloxacino</b>	0,11	0,42
<b>Moxifloxacino</b>	0,11	0,42
<b>Besifloxacino</b>	0,11	0,42

### 5.3.4. Exatidão

Os valores obtidos nos ensaios de recuperação, para cada analito, nas matrizes córnea e HA, estão descritos na Tabela 3 e a média da recuperação obtida de cada analito, na Tabela 4.

Tabela 3. Recuperações médias de cada analito em cada matriz, nas diferentes concentrações.

Analito	RECUPERAÇÃO %	
	Córnea	Humor aquoso
<b>Alta = 16,66 µg/mL</b>		
<b>Gatifloxacino</b>	97,42	98,34
<b>Moxifloxacino</b>	98,83	98,54
<b>Besifloxacino</b>	98,13	99,52
<b>Média = 8,33 µg/mL</b>		
<b>Gatifloxacino</b>	110,99	105,47
<b>Moxifloxacino</b>	106,35	112,21
<b>Besifloxacino</b>	108,32	103,52
<b>Baixa = 3,33 µg/mL</b>		
<b>Gatifloxacino</b>	101,82	103,2
<b>Moxifloxacino</b>	99,76	95,53
<b>Besifloxacino</b>	109,53	98,9

Tabela 4. Recuperações médias obtidas por cada analito em cada matriz.

Analito	RECUPERAÇÃO MÉDIA %	
	Córnea	Humor aquoso
<b>Gatifloxacino</b>	103,42	102,34
<b>Moxifloxacino</b>	101,65	102,1
<b>Besifloxacino</b>	105,33	100,65

### 5.3.5. Precisão

A repetitividade foi observada por meio da análise da dispersão dos resultados conforme os mesmos níveis de concentrações, baixa (3,33 µg/mL), média (8,33 µg/mL) e alta (16,66 µg/mL). O valor é expresso por meio do CV (Tabela 5).

Tabela 5. Repetitividade expressa pelo coeficiente de variação de cada analito nas diferentes concentrações.

<b>Analito</b>	<b>REPETITIVIDADE (CV %)</b>
<b>Alta = 16,66 µg/mL</b>	
<b>Gatifloxacino</b>	4,35
<b>Moxifloxacino</b>	0,77
<b>Besifloxacino</b>	2,37
<b>Média = 8,33 µg/mL</b>	
<b>Gatifloxacino</b>	7,67
<b>Moxifloxacino</b>	4,81
<b>Besifloxacino</b>	3,47
<b>Baixa = 3,33 µg/mL</b>	
<b>Gatifloxacino</b>	7,92
<b>Moxifloxacino</b>	1,96
<b>Besifloxacino</b>	5,4

A reprodutibilidade foi observada por meio da análise da dispersão dos resultados conforme os mesmos níveis de concentrações, baixa (3,33 µg/mL), média (8,33 µg/mL) e alta (16,66 µg/mL), porém analisando resultados em dias diferentes. O valor é expresso por meio do CV (Tabela 6).

Tabela 6. Reprodutibilidade expressa pelo coeficiente de variação de cada analito nas diferentes concentrações.

<b>Analito</b>	<b>REPRODUTIBILIDADE (CV %)</b>
<b>Alta = 16,66 µg/mL</b>	
<b>Gatifloxacino</b>	5,87
<b>Moxifloxacino</b>	3,91
<b>Besifloxacino</b>	5,43
<b>Média = 8,33 µg/mL</b>	
<b>Gatifloxacino</b>	7,63
<b>Moxifloxacino</b>	4,18
<b>Besifloxacino</b>	7,64
<b>Baixa = 3,33 µg/mL</b>	
<b>Gatifloxacino</b>	11,77
<b>Moxifloxacino</b>	8,75
<b>Besifloxacino</b>	10,11

#### 5.4. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS

De acordo com os parâmetros pré-estabelecidos na validação do método analítico, os analitos foram detectados ou não, e quantificados, na córnea e no HA nos diferentes tempos de 10 minutos e uma hora após a instilação da gota.

A partir da área dos cromatogramas obtidos (Figura 19 a 24) fez-se o cálculo dos valores encontrados em cada amostra, que estão dispostos nas tabelas abaixo (Tabela 7 a 18), de acordo com cada fármaco e em relação a cada tempo em estudo. As amostras foram analisadas em duplicata, sendo que em algumas delas não foi possível analisar. Alguns fármacos foram detectados, porém, não foram quantificados, apresentando valores entre LD e LQ (< LQ) e outros não foram detectados na amostra (ND).

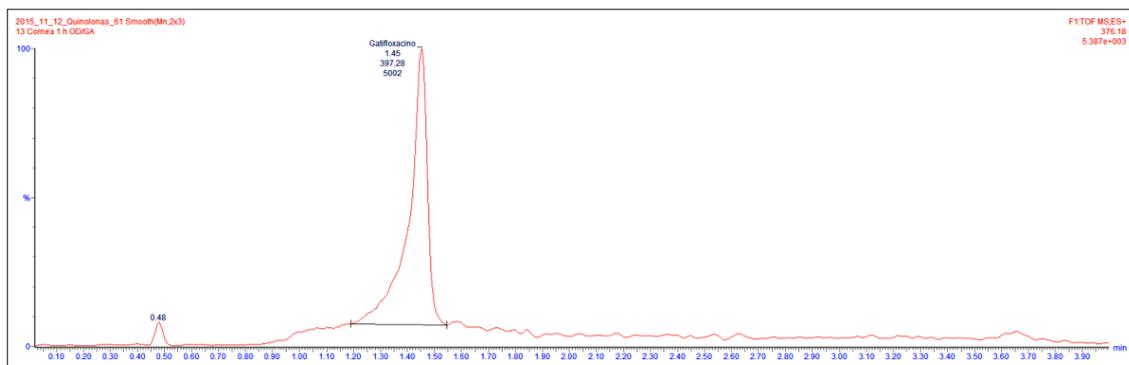


Figura 19. Cromatograma do gatifloxacino na córnea.

Tabela 7. Valores em  $\mu\text{g/g}$  de gatifloxacino na córnea no tempo de 10 minutos.

Amostra	GA - Córnea $\mu\text{g/g}$
	10 minutos
13	3,71
14	3,27
27	4,51
28	5,01
41	4,45
42	2,37
47	2,3
48	11,06
61	8,28
62	2,93
68	<LQ
85	4,93
86	4,25

Tabela 8. Valores em  $\mu\text{g/g}$  de gatifloxacino na córnea no tempo de uma hora.

Amostra	GA - Córnea $\mu\text{g/g}$
	1 hora
1	3,92
2	4,34
7	<LQ
8	<LQ
21	<LQ
22	3,36
35	3,1
36	3,11
49	<LQ
50	<LQ
55	<LQ
56	<LQ
69	7,12
70	6,27

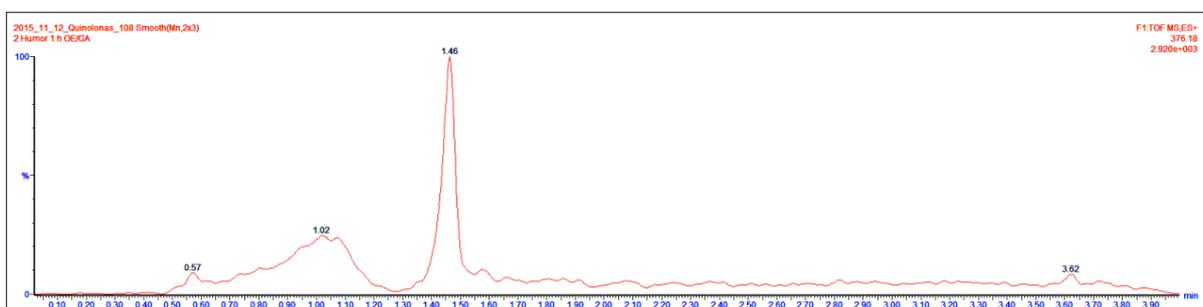


Figura 20. Cromatograma do gatifloxacino no humor aquoso.

Tabela 9. Valores em  $\mu\text{g/mL}$  de gatifloxacino no humor aquoso no tempo de 10 minutos.

Amostra	GA - Humor aquoso $\mu\text{g/mL}$
	10 minutos
13	ND
14	ND
27	ND
28	ND
41	ND
42	ND
47	ND
48	ND
61	ND
62	ND
67	ND
68	ND
85	ND
86	ND

Tabela 10. Valores em µg/mL de gatifloxacino no humor aquoso no tempo de uma hora.

Amostra	GA - Humor aquoso µg/mL
	1 hora
1	<LQ
2	<LQ
7	ND
8	<LQ
21	ND
22	ND
35	ND
36	ND
49	ND
50	ND
55	ND
56	-
69	ND
70	-

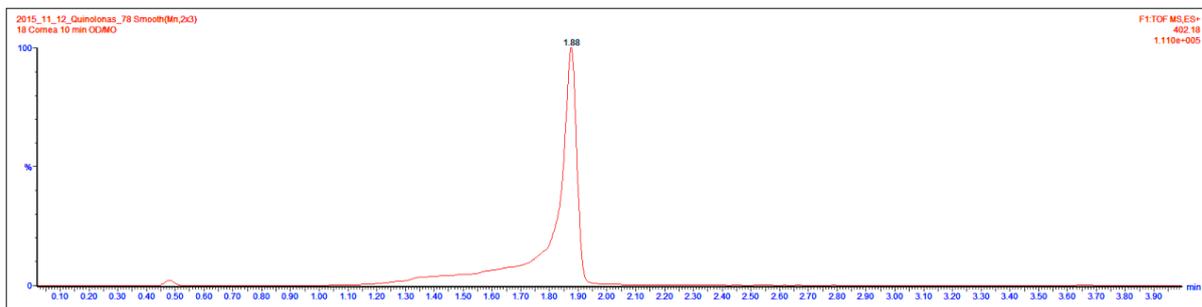


Figura 21. Cromatograma do moxifloxacino na córnea.

Tabela 11. Valores em  $\mu\text{g/g}$  de moxifloxacino na córnea no tempo de 10 minutos.

Amostra	MO - Córnea $\mu\text{g/g}$
	10 minutos
11	12,87
12	12,65
25	13,34
26	13,61
31	36,5
32	36,4
45	14,69
46	15,38
59	10,85
60	11,31
65	22,58
66	23,19

Tabela 12. Valores em  $\mu\text{g/g}$  de moxifloxacino na córnea no tempo de uma hora.

Amostra	MO - Córnea $\mu\text{g/g}$
	1 hora
3	24,01
4	24,36
17	8,86
18	8,96
23	17,28
24	17,23
37	8,36
38	9,08
51	7,98
52	8,02
71	9,13
72	7,28
79	7,13
80	6,48

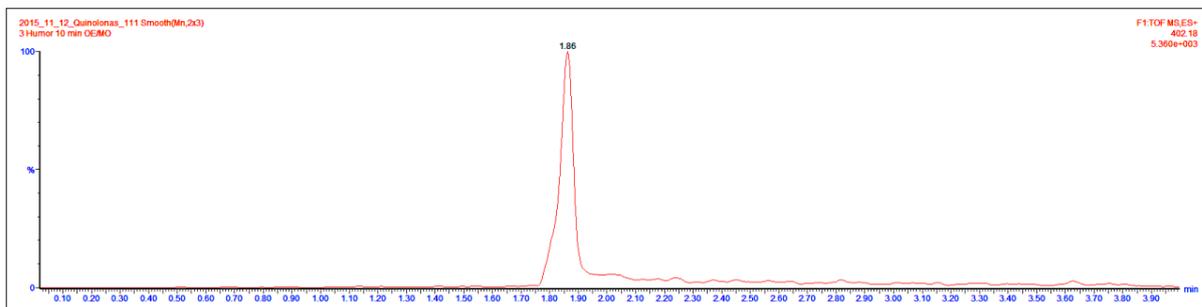


Figura 22. Cromatograma do moxifloxacino no humor aquoso.

Tabela 13. Valores em  $\mu\text{g/mL}$  de moxifloxacino no humor aquoso no tempo de 10 minutos.

Amostra	MO - Humor aquoso $\mu\text{g/mL}$
	10 minutos
11	1,63
12	1,62
25	1,67
26	1,67
31	1,56
32	1,58
45	1,56
46	1,64
59	-
60	1,59
65	-
66	1,64

Tabela 14. Valores em µg/mL de moxifloxacino no humor aquoso no tempo de uma hora.

Amostra	MO - Humor aquoso µg/mL
	1 hora
3	1,82
4	1,57
17	1,77
18	1,78
23	1,94
24	1,57
37	1,66
38	1,66
51	-
52	1,56
71	1,67
72	1,66
79	1,64
80	-

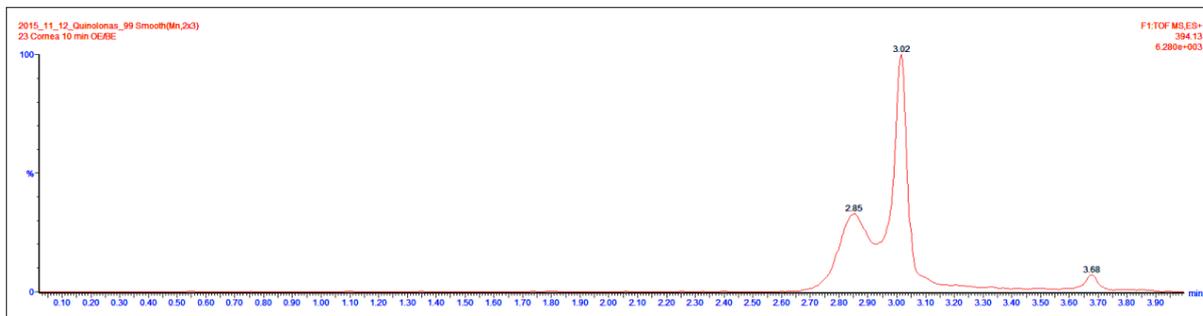


Figura 23. Cromatograma do besifloxacino na córnea.

Tabela 15. Valores em  $\mu\text{g/g}$  de besifloxacino na córnea no tempo de 10 minutos.

Amostra	BE - Córnea $\mu\text{g/g}$
	10 minutos
9	5,52
10	5,5
15	4,67
16	4,64
29	7,71
30	7,56
43	4,76
44	4,81
57	4,75
58	4,72
63	6,8
64	6,74
87	7,96
88	7,96

Tabela 16. Valores em  $\mu\text{g/g}$  de besifloxacino na córnea no tempo de uma hora.

Amostra	BE - Córnea $\mu\text{g/g}$
	1 hora
5	5,12
6	5,15
19	5,93
20	6,04
33	5,44
34	5,39
39	4,05
40	4,1
53	5,32
54	5,3
77	7,03
78	7,21

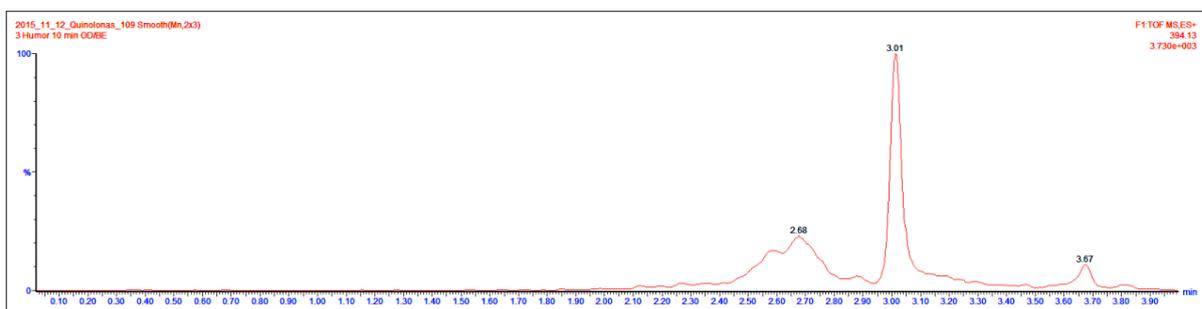


Figura 24. Cromatograma do besifloxacino no humor aquoso.

Tabela 17. Valores em  $\mu\text{g/mL}$  de besifloxacino no humor aquoso no tempo de 10 minutos.

Amostra	BE - Humor aquoso $\mu\text{g/mL}$
	10 minutos
9	1,77
10	1,77
15	1,73
16	1,73
29	1,68
30	1,68
43	1,68
44	1,67
57	1,67
58	1,68
63	1,65
64	1,67
87	1,67
88	1,67

Tabela 18. Valores em µg/mL de besifloxacino no humor aquoso no tempo de uma hora.

Amostra	BE - Humor aquoso µg/mL
	1 hora
5	1,9
6	1,86
19	1,7
20	1,7
33	1,69
34	1,66
39	1,65
40	1,66
53	1,66
54	1,67
77	1,65
78	1,69

#### 5.4.1. Córnea

Nos tempos de 10 minutos e uma hora, as córneas dos animais que receberam MO apresentaram concentrações significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores (médias de 18,6 e 11,7 µg/g de córnea, respectivamente) do que naqueles que receberam BE (média 6,01 e 5,51 µg/g de córnea) e GA (média 4,35 e 2,36 µg/g de córnea). Apesar das concentrações encontradas de todos os fármacos terem reduzido após uma hora em relação aos 10 minutos, esta redução não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para todos os fármacos (Tabela 19).

Tabela 19. Concentrações (em  $\mu\text{g/g}$  de córnea) de gatifloxacino, moxifloxacino e besifloxacino na córnea de cães após 10 minutos e uma hora após a administração. Estão apresentadas as médias seguidas pelo respectivo desvio-padrão.

FÁRMACO	CÓRNEA	
	10 minutos	1 hora
<b>Gatifloxacino</b>	4,35 $\pm$ 2,61 a	2,36 $\pm$ 2,45 a
<b>Moxifloxacino</b>	18,6 $\pm$ 9,66 b	11,7 $\pm$ 6,50 b
<b>Besifloxacino</b>	6,01 $\pm$ 1,43 a	5,51 $\pm$ 1,01 a

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ , teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls)

Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ , teste Mann-Whitney) entre os valores na mesma linha.

Ao analisar o MO, nos tempos de 10 minutos e 1 hora, as córneas apresentaram concentrações relativas significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores (médias de 14,0 e 10,1  $\mu\text{g/mg}$  de MO, respectivamente) do que naqueles que receberam BE (média 4,20 e 4,38  $\mu\text{g/mg}$  de BE) e GA (média 4,72 e 2,68  $\mu\text{g/g}$  de GA). Apesar das concentrações relativas encontradas de todos os fármacos serem menores após uma hora do que em 10 minutos, esta redução não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para todos os fármacos (Tabela 20).

Tabela 20. Concentrações totais dos fármacos na córnea em relação à quantidade de fármaco administrado (em  $\mu\text{g/mg}$  de fármaco administrado) de gatifloxacino, moxifloxacino e besifloxacino em cães após 10 minutos e uma hora após a administração. Estão apresentadas as médias seguidas pelo respectivo desvio-padrão.

FÁRMACO	CÓRNEA	
	10 minutos	1 hora
<b>Gatifloxacino</b>	4,72 $\pm$ 1,91 a	2,68 $\pm$ 2,89 a
<b>Moxifloxacino</b>	14,0 $\pm$ 5,95 b	10,1 $\pm$ 5,40 b
<b>Besifloxacino</b>	4,20 $\pm$ 0,44 a	4,38 $\pm$ 0,71 a

<sup>a,b</sup> Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ , teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls).

Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ , teste Mann-Whitney) entre os valores na mesma linha.

#### 5.4.2. Humor aquoso

No HA (Tabela 21), o fármaco que apresentou as maiores concentrações, tanto aos 10 minutos quanto em uma hora após a aplicação, foi o BE (médias de 1,70 e 1,71 µg/mL de HA, respectivamente), seguida pelo MO (média 1,62 e 1,68 µg/mL de HA) e por último o GA (média 0,06 e 0,10 µg/mL de HA). Aos 10 minutos, todos os fármacos apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre eles, enquanto após uma hora, as concentrações de GA apresentaram diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) nas concentrações entre os dois tempos de mensuração.

Tabela 21. Concentrações (em µg/mL de humor aquoso) de gatifloxacino, moxifloxacino e besifloxacino no humor aquoso de cães após 10 minutos e uma hora após a administração. Estão apresentadas as médias seguidas pelo respectivo desvio-padrão.

FÁRMACO	HUMOR AQUOSO	
	10 minutos	1 hora
<b>Gatifloxacino</b>	0,06 ± 0,00 a	0,10 ± 0,08 a
<b>Moxifloxacino</b>	1,62 ± 0,04 b	1,68 ± 0,07 b
<b>Besifloxacino</b>	1,70 ± 0,04 b	1,71 ± 0,08 b

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ , teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls).

Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ , teste Mann-Whitney) entre os valores na mesma linha.

#### 5.4.3. Relação humor aquoso/córnea

No tempo de 10 minutos, a relação entre as concentrações no HA e na córnea (Tabela 22) apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre todos os fármacos, sendo maior para BE (296,2 µg/mg), intermediária para MO (102,7 µg/mg) e menor para GA (16,7 µg/mg). Por outro lado, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para esta relação entre os fármacos após uma hora. Comparando as relações entre os dois tempos de análise, foram encontrados aumentos significantes ( $p < 0,05$ ) em GA e MO, enquanto o aumento do BE não foi significativo ( $p > 0,05$ ).

Tabela 22. Relação entre as concentrações no humor aquoso e na córnea (em µg/mg) de gatifloxacino, moxifloxacino e besifloxacino em cães após 10 minutos e uma hora após a administração. Estão apresentadas as médias seguidas pelo respectivo desvio-padrão.

FÁRMACO	Relação HA/Córnea	
	10 minutos	1 hora
<b>Gatifloxacino</b>	16,7 ± 9,50 a,A	162,8 ± 212,4 a,B
<b>Moxifloxacino</b>	102,7 ± 38,2 b,A	171,5 ± 61,4 a,A
<b>Besifloxacino</b>	296,2 ± 69,0 c,A	319,3 ± 60,3 b,A

<sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ , teste Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls).

<sup>A,B</sup> Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ , teste teste Mann-Whitney).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. HISTOLOGIA

Com o intuito de avaliar alguma possível lesão nos tecidos oculares, foi realizada a histologia dos BO de todos os cães selecionados. De fato, em situação de presença de inflamação, as células da BHA ficam mais permeáveis permitindo passagem de maior quantidade de células inflamatórias bem como a entrada de fármacos (Gum e MacKay, 2013), o que poderia superestimar os valores obtidos nas concentrações dos fármacos nestes animais. A LVC provoca uma doença sistêmica com sintomatologia variada, envolvendo, dentre outros órgãos, os olhos e seus anexos. As lesões oculares clinicamente identificáveis em cães portadores de LVC são frequentes, apresentando alta prevalência de uveíte, ceratoconjuntivite seca, conjuntivite e blefarite (Peña et al., 2000; Brito et al., 2006; Fulgêncio, 2006; Caminha e Soto-Blanco, 2008).

A degeneração retiniana, alteração microscópica observada em dois animais, indica uma alteração que está diretamente relacionada à idade do animal (Ehrenhofer et al., 2002; Dubielzig et al., 2010). Embora esta alteração não tenha a etiopatogenia esclarecida, sabe-se que vacúolos na camada nuclear interna da retina são encontrados em animais mais velhos, na região da *ora serrata*, parte anterior da retina, próximo ao limbo escleral (Ehrenhofer et al., 2002). Estes animais foram retirados do estudo pelo fato da idade ser um fator que poderia influenciar diretamente a vitalidade corneana e a integridade do sistema lacrimal (Samuelson, 2013), interferindo na absorção e permeabilidade ocular, o que poderia assim alterar significativamente os valores da concentração dos fármacos na córnea e HA.

No presente estudo, o achado histopatológico mais frequente em cães portadores de LVC foi a presença de infiltrado inflamatório nas diferentes estruturas oculares. Este achado é similar ao encontrado em cães com lesões oculares (Peña et al., 2008), sendo sugestivo de início de uma inflamação tecidual.

Devido ao fato da avaliação histopatológica ter sido realizada nos cães que não possuíam lesões macroscópicas, as alterações encontradas neste trabalho estão em menor frequência em relação a outros estudos, nos quais foram avaliados apenas olhos de animais portadores de LVC que possuíam lesões oculares (Molleda et al., 1993; Fulgêncio, 2006; Peña et al., 2008). Os resultados encontrados estão de acordo com a avaliação oftalmológica prévia realizada com os cães, que verificou que nenhuma alteração clínica foi notificada. Os demais olhos apresentaram a anatomia preservada de cada estrutura. Assim, o estudo histopatológico das lesões oculares demonstrou que as alterações oculares podem estar presentes mesmo em cães portadores de LVC que não possuem sinal clínico oftalmológico.

## 6.2. ANÁLISE DAS AMOSTRAS

O preparo das amostras é uma etapa essencial para ter sucesso na determinação dos analitos de interesse. Portanto, foram realizados testes utilizando diferentes meios de solvente, com o intuito de analisar qual deles seria o mais adequado para as diferentes matrizes, córnea e HA.

Em um trabalho que objetivava a detecção do MO em HA de coelhos foi utilizada apenas a acetonitrila como solvente para a extração (Warsi et al., 2012). Xiao-Fei et al. (2016) quantificaram o BE no HA e outros tecidos oculares de coelhos, sendo as amostras diluídas no solvente metanol/água (6:1, v/v). Vishwanathan e Stewart (2001) determinaram as concentrações do GA no plasma de humanos, e Dorival-García et al. (2013) realizaram um estudo de determinação de 13 quinolonas, dentre elas o MO, em água de descarte. Para este fim, estes dois trabalhos realizaram o preparo das amostras utilizando apenas o metanol como solvente.

Nos testes de extração realizados neste estudo com diferentes meios de solução (item 4.7.1), foi detectado visualmente e pelo teste do biureto, que o solvente acetonitrila/água (4:1, v/v) apresentava a melhor precipitação de proteínas e, por meio de CLAE, a recuperação dos analitos quando utilizado no HA. Já a mistura metanol/água (4:1, v/v) utilizada na córnea, foi a que apresentou a melhor recuperação dos analitos.

## 6.3. VALIDAÇÃO DA TÉCNICA ANALÍTICA

A técnica analítica para detecção e quantificação simultânea de GA, MO e BE em HA e córnea de cães foi validada e, de acordo com os parâmetros analisados, foi considerada adequada para a pesquisa dos analitos de interesse.

Na avaliação da seletividade, não foram observados compostos interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção dos fármacos estudados, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente do analito de interesse.

No estudo da linearidade, o valor de  $R^2$  deve ser  $\geq 0,90$  para que a linearidade da curva seja adequada, garantindo assim, uma menor dispersão do conjunto de pontos experimentais (INMETRO, 2010). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Ribani et al., 2007). De fato, no presente trabalho o  $R^2$  obtido por meio da equação da reta foi maior do que o valor recomendado pelo

INMETRO (2010) para todas as análises. Assim, a técnica aqui desenvolvida apresenta linearidade de resposta adequada.

Devido sua alta sensibilidade de detectar compostos em níveis traços mesmo em matrizes complexas, o método de LC/MS-MS apresentou valores de LD de 0,11 µg/mL e de LQ de 0,42 µg/mL. A exatidão, avaliada por meio de ensaios de recuperação, foi adequada para os analitos estudados. Os valores encontrados estão de acordo com os critérios estabelecidos pelo CODEX (2009) para a aceitabilidade dos resultados. Da mesma forma, a precisão do método foi adequada, pois os CV, obtidos nos estudos de repetitividade e reprodutibilidade, apresentaram valores inferiores em relação aos recomendados pela EC (2002) e pelo CODEX (2009). Deste modo, a metodologia desenvolvida está adequada para a utilização para a mensuração simultânea de GA, MO e BE em córnea e HA de cães.

#### 6.4. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS

Para o tratamento das afecções oculares utiliza-se com frequência os quimioterápicos antimicrobianos em estudo. Na classe das fluorquinolonas da quarta geração, considerada a última geração, os fármacos foram desenvolvidos com propriedades físico-químicas que contribuem para a penetração intraocular bem como a permanência dos mesmos em ação nos tecidos oculares (Chung et al., 2013). Para que o fármaco atravesse a córnea e chegue no HA, ele deve ter propriedades intermediárias de solubilidade (Gaudana et al., 2010; Gum e MacKay, 2013).

Após a administração tópica, os fármacos imediatamente se misturam com a lágrima (Cholkar et al., 2013; Chen, 2015), desta forma a solubilidade dos mesmos na lágrima também interfere diretamente na penetração intraocular. Portanto, o pH dos fármacos deve ser o mais próximo possível do pH fisiológico, que é em torno de 7,2 (Silva, 2012). Em relação aos fármacos em estudo, eles possuem semelhantes valores de pH, a saber, GA (pH 6,0), MO (pH 6,8) (Mc Gee et al., 2005) e BE (pH 6,4) (Deschênes e Blondeau, 2015).

A dose administrada dos fármacos, correspondente a uma gota, foi 45 µL para o GA, 38 µL para o MO e 32 µL para o BE. Gaudana et al. (2010) disseram que menos de 5% da dose aplicada é capaz de penetrar os tecidos oculares. Em consideração apenas às concentrações obtidas nos diferentes tempos de mensuração para o MO e o BE, esta afirmação está de acordo com os nossos resultados obtidos. Para o GA, o fármaco não foi detectado no HA em nenhuma das 14 amostras após 10 minutos da instilação e em 9 das 12 amostras obtidas após uma hora. Por outro lado, Regnier (2013) considerou que até 10% da dose administrada seria capaz de penetrar, de forma que os resultados obtidos neste trabalho estejam de acordo com esta afirmação apenas quando se analisa os resultados de concentração corneana, estando os valores de MO e BE expressamente superiores.

Os resultados encontrados neste estudo mostram que o GA foi detectado em todas as amostras da córnea, sendo quantificados em todas do tempo de mensuração de 10 minutos. Porém, na maioria das amostras do HA, nos diferentes tempos, não foi detectado o fármaco em questão. Este resultado sugere que houve um aumento em nível mais expressivo da capacidade de armazenamento da fissura palpebral, sendo que o volume da gota administrada do GA foi maior em relação aos demais fármacos, propiciando uma maior e mais rápida drenagem do mesmo. Dessa forma, este fármaco permaneceu menos tempo em contato com a superfície ocular e, com isto, apresentou menores valores de concentração, ou até mesmo, não foi detectado nas estruturas analisadas.

Silva (2012) afirmou que o MO possui características de hidrossolubilidade e lipossolubilidade que favorecem a permeabilidade corneana, estando esta afirmação, de acordo com os resultados obtidos na concentração corneana, pois, houve uma diferença estatística significativa entre os seus resultados com os demais fármacos, nos dois tempos de mensuração. Este fármaco também apresentou maior concentração relativa. Em relação à concentração no HA, o MO apresentou resultados adequados, sendo sua concentração discretamente maior, porém, sem diferença estatística, no tempo de uma hora. No entanto, as concentrações no HA de BE apresentaram valores ligeiramente maiores do que o MO, principalmente no tempo de 10 minutos, sugerindo que o BE também possua características favoráveis para uma rápida e adequada penetração corneana.

Como parte da gota do colírio instilado é rapidamente drenada, o fármaco possui um tempo limitado de ação na superfície corneana. Dessa forma, a presença na composição do BE de um polímero mucoadesivo pode ser um fator que contribua para aumentar este tempo de adesão à superfície ocular (Deschênes e Blondeau, 2015). O presente trabalho obteve como resultado uma adequada concentração na córnea nos dois tempos de mensuração, sem apresentar diferença significativa. Portanto, podemos sugerir que, sua formulação contribuiu para a permanência da concentração elevada do fármaco no tempo prolongado de uma hora. Ao analisar os resultados obtidos no HA podemos sugerir que o BE também apresentou altos níveis de concentração em relação aos demais fármacos em estudo, sugerindo que, além de aderir à superfície corneana, também possui boa penetrabilidade, provavelmente por ser mais eliminado por meio da lágrima. Xiao-Fei et al. (2016) afirmaram que o BE pode ser absorvido rapidamente e distribuído de maneira extensiva para os tecidos oculares com baixa exposição à circulação sistêmica, sugerindo ser um fármaco promissor, seguro e efetivo no tratamento de infecções oculares.

Chung et al. (2013) compararam a penetração intraocular de quatro fluorquinolonas, GA 0,3%, MO 0,5%, BE 0,6% e levofloxacino 1,5%, após a instilação tópica nos olhos de coelhos. Dentre os grupos em que os animais foram divididos um deles recebia apenas uma gota do fármaco e as amostras oculares (córnea, HA, conjuntiva e vítreo) foram coletadas após 30 minutos e uma hora, e analisadas em CLAE com detector de fluorescência. Na córnea e no HA, nos diferentes tempos, o levofloxacino foi o fármaco que apresentou maiores concentrações (10,67 µg/g na córnea e 2,24 µg/mL no HA), sendo que os autores justificaram isso devido ao fato dele possuir a maior concentração na formulação terapêutica. Em seguida, foi o MO com concentração máxima na córnea de 10,15 µg/g, o GA com 3,33 µg/g e o BE com 1,13 µg/g. No HA manteve a ordem de concentração dos fármacos, sendo a concentração máxima do MO 1,86 µg/mL, do GA 0,64 µg/mL e do BE 0,11 µg/mL.

O MO foi considerado uma fluorquinolona com adequadas propriedades para a penetração intraocular (Chung et al., 2013), o que está de acordo com este estudo. No entanto, o fato do BE apresentar menores concentrações do que o GA não está de acordo com os nossos resultados obtidos. A detecção e quantificação foram realizadas em aparelhos diferentes e isto pode ser um dos motivos que sugerem esta diferença, além do que, foi utilizada outra espécie animal. O LC-MS/MS utilizado no presente estudo é considerado mais sensível do que o CLAE com detector de fluorescência, de forma que as concentrações obtidas foram superiores, com exceção do GA que foi detectado em poucas amostras no HA. Chung et al. (2013) afirmam ainda que o polímero mucoadesivo Durasite® na formulação do BE pode contribuir em uma elevada concentração na conjuntiva.

Xiao-Fei et al. (2016) validaram a técnica e quantificaram o BE 0,6% por meio do LC-MS/MS após a aplicação de uma gota nos olhos de coelhos e coleta da córnea, conjuntiva, HA e lágrima, em diferentes tempos. A concentração obtida do BE no HA foi menor em comparação com este estudo, apresentando valores menores que 0,5 µg/mL. Os autores afirmam que a penetração do BE na córnea é dificultada, o que justifica os maiores resultados serem na concentração do fármaco na conjuntiva.

Em um trabalho, o objetivo era avaliar a penetração na córnea e no HA, de humanos, por meio da aplicação tópica de GA 0,3% e MO 0,5% no momento de uma ceratoplastia e posteriormente analisar por meio do CLAE a concentração obtida (Holland et al., 2008). Observando seus resultados, o MO apresentou concentrações maiores do que dobro daquelas apresentadas pelo GA na córnea e no HA, o que está de acordo com o presente estudo.

Yağci et al. (2007) realizaram um trabalho para avaliar, por meio do CLAE, a penetração de fluorquinolonas de segunda, terceira e quarta geração no HA e vítreo de coelhos que foram submetidos a uma injeção intravítrea de *Staphylococcus aureus*. A concentração do MO no HA, único representante da quarta geração, foi significativamente maior em comparação às demais gerações, concluindo que este fármaco apresentou os melhores resultados na penetração em tecidos oculares inflamados de coelhos. No presente trabalho, que compara a permeabilidade dos fármacos da quarta geração, o MO não foi o que apresentou melhores concentrações no HA, sugerindo que os fármacos da última geração tiveram suas formulações desenvolvidas com o intuito de propiciar uma maior penetração intraocular.

Em um estudo realizado por Solomon et al. (2005), foi avaliada a penetração da aplicação tópica de GA 0,3%, MO 0,5% e ciprofloxacino 0,3% no HA de humanos que foram submetidos à cirurgia de catarata. O MO apresentou maior concentração em comparação aos outros dois fármacos, sendo que em relação ao GA, o MO teve resultados significativamente superiores. Os autores sugeriram que a concentração da formulação terapêutica mais elevada do MO contribuiu para este resultado. Katz et al. (2005) também realizaram um estudo com pacientes cirúrgicos de catarata, avaliando a penetração do MO 0,5% no HA de humanos por meio da LC-MS/MS. Mesmo o fármaco sendo aplicado no mínimo quatro vezes com intervalo de 15 minutos, os resultados obtidos foram semelhantes com o nosso estudo. Pode-se, então, sugerir que o fármaco possui uma circulação intraocular de maneira que não permita o acúmulo do mesmo.

Em um estudo clínico realizado por Williams et al. (2008), foram avaliados os efeitos do tratamento para cicatrização de uma ceratectomia em coelhos por meio do uso do GA 0,3% e do MO 0,5%. Foi concluído que os dois fármacos em estudo apresentaram, entre outros parâmetros, valores de concentração no HA semelhantes, indicando similaridade da ação terapêutica.

Em outro estudo clínico realizado por Sanders et al. (2011), foi comparada a atividade do GA, MO e BE contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* presentes em uma ceratite em coelhos. Foi verificado que os animais que apresentaram melhora clínica mais significativa foram aqueles tratados com o BE.

Ao analisar individualmente os valores das Tabelas 7 a 18, percebemos algumas discrepâncias dos resultados obtidos. Observando estas diferenças podemos sugerir algumas explicações. A variação do tamanho da fissura palpebral de cada animal, o que corresponde diretamente em diferença do diâmetro corneano, interfere na quantidade de fármaco capaz de penetrar a córnea. Durante a realização do experimento, foi utilizado o mesmo frasco para cada um dos fármacos, porém sabe-se que há uma diferença do volume da gota instilada pelo mesmo

frasco, o que poderia também justificar, a diferença encontrada das concentrações dos fármacos. Pode-se ainda sugerir que os olhos em que obtiveram maiores concentrações podem ser aqueles em que foram observadas lesões inflamatórias o que provocou um aumento da permeabilidade aos fármacos.

Com o intuito de avaliar se a concentração obtida dos fármacos, na córnea e humor aquoso, nos diferentes tempos de mensuração apresentam valores acima da CIM para os principais microrganismos, foi realizada uma comparação dos resultados obtidos com o Quadro 1. As concentrações dos fármacos, tanto na córnea como no HA, se mostraram elevadas suficientes, para alcançar a maioria das CIM dos microrganismos oculares mais frequentes.

Em relação aos valores de concentrações encontrados na córnea nos dois tempos de mensuração, todos os fármacos apresentaram valores acima da CIM para todos os microrganismos. Portanto, podem ser considerados fármacos efetivos para inibir o crescimento.

O GA não obteve concentrações no HA, nos dois tempos avaliados, acima da CIM para os seguintes microrganismos: *S. pneumoniae*, *Enterococci species*, *Bacillus species* e *P. aeruginosa*. Para o *S. coagulase negativo* a concentração do GA no HA em uma hora não foi adequada, enquanto que para o *S. aureus* este valor ficou abaixo da CIM considerando o limite superior do intervalo. Em relação ao microrganismo *P. aeruginosa*, tanto o MO quanto o BE, não apresentaram valores de concentrações dentro do limite superior estabelecido pela CIM, ao analisar os resultados obtidos no HA. Sendo assim, o MO e BE sugerem ser fármacos mais eficientes no combate destes microrganismos citados no HA.

## 7. CONCLUSÕES

O método analítico para detecção e quantificação simultânea dos três analitos de interesse (GA, MO e BE) foi desenvolvido e validado, com sucesso, de acordo com os parâmetros estabelecidos, sendo esta técnica reprodutível, rápida e de elevada seletividade e sensibilidade.

Na córnea, nos dois tempos de mensuração, o MO apresentou maiores valores de concentrações e concentrações relativa. No HA, o BE foi o fármaco que obteve melhores resultados. Em comparação com os demais fármacos, o GA apresentou as menores concentrações, tanto na córnea como no HA. No tempo de 10 minutos, a relação HA/córnea estabelecida foi maior para o BE.

Tanto o MO quanto o BE apresentaram valores de concentrações na córnea e no HA que sugerem adequadas propriedades físico-químicas na adesão à superfície ocular e penetração corneana.

## 8. REFERÊNCIAS

AMPARO, M.R. *Desenvolvimento e validação de métodos SPE-LC-MS e MEPS-LC-MS para quantificação de fluorquinolonas em matrizes aquosas*. 2013. 75f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) – Universidade de São Paulo, São Carlos.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. RE nº 899, 2003.

BASHER, T. Cirurgia das Pálpebras. In: SLATTER, D.H. (Ed.) *Manual de cirurgia de pequenos animais*, 3. Ed. Manole, p. 1304 – 1339, 2007.

BRITO, F.L.C.; ALVES, L.C.; MAIA, F.C.L.; LAUS, J.L.; MEUNIER, I.M.J. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v, 58, p. 768 – 775, 2006.

BRITO, M.A.; CORDEIRO, B.C. Besifloxacino, fármaco antibiótico da classe das fluorquinolonas. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 10, p.69 – 80, 2013.

BROADWATER, J.J.; COLITZ, C.; CARASTRO, S.; SAVILLE, W. Tear production in normal juvenile dogs. *Veterinary Ophthalmology*, v.13, p. 321 – 325, 2010.

CAMINHA, A.E.Q.; SOTO-BLANCO, B. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina na cidade de Fortaleza, Ceará. *Archives of Veterinary Science*, v. 13, p. 214 – 218, 2008.

CAVAZOS-ROCHA, N.; CARMONA-ALVARADO, I.; VERA-CABRERA, L.; WASKMAN-DE-TORRES, N.; SALAZAR-CAVAZOS, M.L. HPLC Method for the simultaneous analysis of fluoroquinolones and oxazolidinones in plasma. *Journal of Chromatographic Science Advance Access*, v. 3, p. 1 – 7, 2014.

CHEN, H. Recent developments in ocular drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, v. 23, p. 597 – 604, 2015.

CHLARADLA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, v.31, p. 623 – 636, 2008.

CHOLKAR, K.; PATEL, S.P.; VADLAPUDI, A.D.; MITRA, A.K. Novel Strategies for Anterior Segment Ocular Drug Delivery. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v. 29, p. 106 – 123, 2013.

CHUNG, J.L.; LIM, E.H.; SONG, S.W.; KIM, B.Y.; LEE, J.H.; MAH, F.S.; SEO, K.Y. Comparative intraocular penetration of 4 fluoroquinolones after topical instillation. *Cornea*, v. 32, p. 1046 – 1051, 2013.

CLODE, A. Clinical Pharmacology and Therapeutics, Part 2: Antibacterial Agents, Antifungal Agents, and Antiviral Agents. In: GELATT, K.N. (Ed.) *Veterinary Ophthalmology*, 5. Ed. Wiley-Blackwell, p. 381 – 406, 2013.

CODEX – CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. CAC/GL 71-2009, p.38, 2009.

COMSTOCK, T.L.; KARPECKI, P.M.; MORRIS, T.W.; ZHANG, J. Besifloxacin: a novel anti-infective for the treatment of bacterial conjunctivitis. *Clinical Ophthalmology*, v. 4, p. 215 – 225, 2010.

DAVIDSON, H.J.; KUONEN, V.J. Tear film and ocular mucins. *Veterinary Ophthalmology*, n. 7, p. 71 – 77, 2004.

DAVIS, K.; CARTER, R.; TULLY, T.; NEGULESCU, I.; STOREY, E. Comparative evaluation of aqueous humor viscosity. *Veterinary Ophthalmology*, n. 18, p. 50 – 58, 2015.

DEMOLINER, A. *Otimização e validação de metodologia analítica empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para determinação de multiclassés de agrotóxicos e metabólicos em água de superfície e de abastecimento público*. 2008. 130f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul.

DESCHÊNES, J.; BLONDEAU, J. Besifloxacin in the management of bacterial infections of the ocular surface. *Canadian Journal of Ophthalmology*, v. 50, p. 184 – 191, 2015.

DORIVAL-GARCIA, N.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; CANTARERO, S.; NAVALÓN, A.; VÍLCHEZ, J.L. Simultaneous determination of 13 quinolones antibiotic derivatives in wastewater samples using solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, v. 106, p. 323 – 333, 2013.

DUBIELZIG, R.; KETRING, K.L.; McLELLAN, G.J.; ALBERT, D.M. The retina. In: DUBIELZIG, R.; KETRING, K.L.; McLELLAN, G.J.; ALBERT, D.M. (Ed.) *Veterinary Ocular Pathology a comparative review*, 1. Ed. Saunders Elsevier, p. 365, 2010.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. The Sense Organs, *Textbook of Veterinary Anatomy*, 4. Ed. Saunders Elsevier, p. 332 – 346, 2010.

EC - COMISSÃO das Comunidades Europeias. Decisão da comissão de 12 de agosto de 2002. Dá execução ao disposto na Directiva 2002/657/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 221, p. 8-36, 2002. Disponível em: <[http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/oj/2002/l\\_221/l\\_22120020817pt00080036.pdf](http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/oj/2002/l_221/l_22120020817pt00080036.pdf)>. Acesso em: 02 de dezembro de 2015.

EHRENHOFER, M.C.A.; DEEG, C.A.; REESE, S.; LIEBICH, H. Normal structure and age-related changes of the equine retina. *Veterinary Ophthalmology*, v.5, p. 39 – 47, 2002.

FULGÊNCIO, G.O. *Prevalência de oftalmopatias em cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi no município de Belo Horizonte – Estudo clínico e histopatológico*. 2006. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GAUDANA, R.; ANANTHULA, H.K.; PARENKY, A.; MITRA, A.K. Ocular Drug Delivery. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, v. 12, p. 348 – 360, 2010.

GIONFRIDDO, J.R. O Sistema Nasolacrimal. In: SLATTER, D.H. (Ed.) *Manual de cirurgia de pequenos animais*, 3. Ed. Manole, p. 1349 – 1361, 2007.

GOEL, M.; PICCIANI, R.G.; LEE, R.K.; BHATTACHARYA, S.K. Aqueous Humor Dynamics: A Review. *The Open Ophthalmology Journal*, n. 4, p. 52 – 59, 2010.

GÓRNIAK, S.L. Sulfas, Quinolonas e outros Quimioterápicos. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. (Ed.) *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*, 5. Ed. Guanabara Koogan, p. 432 – 441, 2011.

GOULART, D.S. *Aplicações das técnicas de cromatografia no diagnóstico toxicológico*. 2012. 37f. Seminário (Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

GUM, G.G.; MACKAY, E.O. Physiology of the Eye. In: GELATT, K.N. (Ed.) *Veterinary Ophthalmology*, 5. Ed. Wiley-Blackwell, p. 171 – 207, 2013.

HARTLEY, C.; WILLIAMS, D.L.; ADAMS, V.J. Effect of age, gender, weight, and time of day on tear production in normal dogs. *Veterinary Ophthalmology*, n. 9, p. 53 – 57, 2006.

HOLLAND, E.J.; LANE, S.S.; TERRY, K.; RAIZMAN, M.; DUN, S. Ocular penetration and pharmacokinetics of topical gatifloxacin 0,3% and moxifloxacin 0,5% ophthalmic solutions after keratoplasty. *Cornea*, v. 27, p. 314 – 319, 2008.

ICH, International Conference on Harmonization. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org>> Acesso em: 02 de dezembro de 2015.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JUNIOR, A.Z.; FREITAS, J.C.; ZACARIAS, F.G.S.; SALVADOR, R.; GARCIA, J.L. Investigation of bacterial microbiota and risk factors in dogs with external ocular diseases from Bandeirantes, paraná State, Brazil. *Ciências Agrárias*, v. 33, p. 3243 – 3250, 2012.

KATZ, H.R.; MASKET, S.; LANE, S.S.; SALL, K.; ORR, S.C.; FAULKNER, R.D.; McCUE, B.A.; DAHKIN, D.C. Absorption of topical moxifloxacin ophthalmic solution into human aqueous humor. *Cornea*, v. 24, p. 955 – 958, 2005.

LATENDRESSE, J.R.; WARBRITTON, A.R.; JONASSEN, H.; CREASY, D.M. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's Fluid. *Toxicology Pathology*, v. 30, p. 524 – 533, 2002.

MAGGS, D.J. Ocular Pharmacology and Therapeutics. In: SLATTER, D.H. (Ed.) *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*, 4. Ed. Saunders Elsevier, p. 33 – 61, 2008a.

MAGGS, D.J. Eyelids. In: SLATTER, D.H. (Ed.) *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*, 4. Ed. Saunders Elsevier, p. 107 – 134, 2008b.

MAGGS, D.J. Cornea and Sclera. In: SLATTER, D.H. (Ed.) *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*, 4. Ed. Saunders Elsevier, p. 175 – 202, 2008c.

McGEE, D.H.; HOLT, W.F.; KASTNER, P.R.; RICE, R.L. Safety of moxifloxacin as shown in animal and In Vitro studies. *Survey of Ophthalmology*, v. 50, p. 46 – 54, 2005.

MILLER, P.E. Structure and Function of the Eye. In: SLATTER, D.H. (Ed.) *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*, 4. Ed. Saunders Elsevier, p. 1 – 19, 2008a.

MILLER, P.E. Lacrimal System. In: SLATTER, D.H. (Ed.) *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*, 4. Ed. Saunders Elsevier, p. 157 – 174, 2008b.

MILLER, P.E. The Glaucomas. In: SLATTER, D.H. (Ed.) *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*, 4. Ed. Saunders Elsevier, p. 230 – 257, 2008c.

MOLLEDA, J.M.; NOVALES, M.; GINEL, P.J.; FERNANDEZ, A. Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. *Israel Journal Veterinary Medicine*, v.48, p.173-178, 1993.

NAUTSCHER, N.; BAUER, A.; STEEFFL, M.; AMSELGRUBER, W.M. Comparative morphological evaluation of domestic animal cornea. *Veterinary Ophthalmology*, no prelo, 2015.

ORIA, A.P.; PINNA, M.H.; FURTADO, M.A.; PINHEIRO, A.C.O.; JUNOR, D.C.G.; NETO, J.M.C. Microbiota conjuntival em cães clinicamente saudáveis e cães com ceratoconjuntivite seca. *Ciência Animal Brasileira*, v. 14, p. 495 – 500, 2013.

PACÍFICO DA SILVA, I.; OLIVEIRA, F.A.S.; PEDROZA, H.P.; GADELHA, I.C.N.; MELO, M.M.; SOTO-BLANCO, B. Pesticide exposure of honeybees (*Apis mellifera*) pollinating melon crops. *Apidologie*, v. 46, p. 703 – 715, 2015.

PARK, S.A.; TAYLOR, K.T.; ZWINGENBERGER, A.L.; REILLY, C.M.; TOUPADAKIS, C.A.; MARFURT, C.F.; GODD, K.L.; MURPHY, C.J. Gross anatomy and morphometric evaluation of the canine lacrimal and third eyelid glands. *Veterinary Ophthalmology*, p. 1 – 7, 2015.

PEÑA, M.T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M.G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993 – 1998). *Veterinary Ophthalmology*, v. 3, p. 35 – 41, 2000.

PEÑA, M.T.; NARANJO, C.; KLAUSS, G.; FONDEVILA, D.; LEIVA, M.; ROURA, X.; DAVIDSON, M.G.; DUBIELZIG, R.R. Histopathological features of ocular leishmaniosis in the dog. *Journal of Comparative Pathology*, v.138, p.32-39, 2008.

PLUMB, C.D. *Plumb's Veterinary Drug Handbook*, 7. Ed. Willey-Blackwell, p.1075, 2011.

REGNIER, A. Clinical Pharmacology and Therapeutics, Part 1: Drug Delivery and Pharmacokinetics. In: GELATT, K.N. (Ed.) *Veterinary Ophthalmology*, 5. Ed. Wiley-Blackwell, p. 351 – 380, 2013.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771 – 780, 2004.

RIBANI, M.; COLLINS, C.H.; BOTTOLI, C.B.G. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *Journal of Chromatography*, v. 1156, p. 201 – 205, 2007.

RODRIGUES, V.C. *Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de fármacos em amostras de água, superficial e tratada, utilizando a cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas Tandem (UPLC-MS/MS)*. 2011. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

SAMPAIO, I.B.M. Testes estatísticos para Comparação de Médias. In: SAMPAIO, I.B.M. (Ed.) *Estatística aplicada à experimentação animal*, 4. Ed. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, p. 188 – 206, 2015.

SAMUELSON, D.A. Ophthalmic Anatomy. In: GELATT, K.N. (Ed.) *Veterinary Ophthalmology*, 5. Ed. Wiley-Blackwell, p. 39 – 170, 2013.

SANDERS, M.E.; MOORE, Q.C.; NORCROSS, E.W.; SANFILIPPO, C.M.; HESJE, C.K.; SHAFIEE, A.; MARQUART, M.E. Comparison of Besifloxacin, Gatifloxacin, and, Moxifloxacin against strains of *Pseudomonas aeruginosa* with different quinolone susceptibility patterns in a rabbit model of keratitis. *Cornea*, v. 30, p. 83 – 90, 2011.

SANTOS, L.G.F.; ALMEIDA, A.B.P.F.; SILVA, M.C.; OLIVEIRA, J.T.; DUTRA, V.; SOUSA, V.R.F. Microbiota conjuntival de cães hígidos e com afecções oftálmicas. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, p. 165 – 169, 2009.

SILVA, G.C.M. *Penetração do moxifloxacino, ofloxacino e ciprofloxacino na córnea e humor aquoso de olhos humanos enucleados*. 2012. 87f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SINGH, V.; AHMAD, R.; HEMING, T. The Challenges of Ophthalmic Drug Delivery: A Review. *International Journal of Drug Discovery*, v. 3, p. 56 – 62, 2011.

SLATTER, D.; DIETRICH, U. Córnea e Esclera. In: SLATTER, D.H. (Ed.) *Manual de cirurgia de pequenos animais*, 3. Ed. Manole, p. 1368 – 1396, 2007.

SOLOMON, R.S.; DONNENFELD, E.D.; PERRY, H.D.; SNYDER, R.W.; NEDRUD, C.; STEIN, J.; BLOOM, A. Penetration of topically applied gatifloxacin 0,3%, moxifloxacin 0,5%, and ciprofloxacina 0,3% into the aqueous humor. *Ophthalmology*, v. 112, p. 466 – 469, 2005.

SOSA, A.B.; EPSTEIN, S.P.; ASBELL, P.A. Evaluation of toxicity of commercial ophthalmic fluoroquinolone antibiotics as assessed on immortalized corneal and conjunctival epithelial cells. *Cornea*, n. 8, p. 930 – 934, 2008.

STERN, M.E.; GAO, J.; BEUERMAN, R.W.; FARLEY, W.; ZHUO, L.; McDONNELL, J.; PFLUGFELDER, S. Effects of fourth-generation fluoroquinolones on the ocular surface, epithelium, and wound healing. *Cornea*, n. 25, p. 12 – 24, 2006.

SUBTIL, S.D.O. *Bacteriologia ocular em canídeos – Estudo retrospectivo 2002 – 2010*. 2010. 85f. – Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.

VIANA, F.A.B.; FULGÊNCIO, G.O.; BORGES, K.D.A. Farmacologia Oftalmológica. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. (Ed.) *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*, 5. Ed. Guanabara Koogan, p. 705 – 715, 2011.

VISHWANATHAN, K. STEWART, M.G.B.J. Determination of gatifloxacin in human plasma by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, v. 15, p. 915 – 919, 2001.

WARSI, M.H.; JAIN, G.K.; PATHAN, S.A.; ANWAR, M.; MALLICK, N.; AHMAD, N.; TALEGAONKAR, S.; AHMAD, F.J.; KHAR, R.K. UPLC/Q-TOF-MS/MS method for evaluation moxifloxacin loaded nanoplexes as vehicles for ocular drug delivery. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 35, p. 1826 – 1842, 2012.

WEINER, A.L.; GILGERT, B.C. Advancements in ocular drug delivery. *Veterinary Ophthalmology*, n.13, p. 395 – 406, 2010.

WILLIAMS, K.K.; McCARTNEY, M.D.; RICE, R.L.; WAX, M.B.; HIDDENEN, J.W. The effects of moxifloxacin ophthalmic solution 0,5% or gatifloxacin ophthalmic solution 0,3% treatment on corneal wound healing in pigmented rabbits following anterior keratectomy. *Veterinary Ophthalmology*, v. 11, p. 327 – 334, 2008.

WONG, C.A.; GALVIS, V.; TELLO, A.; VILLAREAL, D.; REY, J.J. Susceptibilidad antibiotic in vitro a fluoroquinolonas. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, n. 87, p. 72 – 78, 2012.

XIAO-FEI, G.; BAI-YANG, M.; MIM, X.; YANG, Y.; JIA-LI, Z.; DA-SONG, Y.; WEI-XIN, W.; YING-XIANG, D.; BIN, D.; MENG-XIANG, S. Rapid, sensitive and selective HPLC-MS/MS method for the quantification of topically applied besifloxacin in rabbit plasma and ocular tissues: Application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 117, p. 37 – 46, 2016.

YAĞCI, R.; OFLU, Y.; DINÇEL, A.; KAYA, E.; YAĞCI, S.; BAYAR, B.; DUMAN, S.; BOZKURT, A. Penetration of second-, third-, and fourth-generation topical fluoroquinolone into aqueous and vitreous humor in a rabbit endophthalmitis model. *Eye*, n. 21, p. 990 – 994, 2007.

YU-SPEIGHT, A.W.; KERN, T.J.; ERB, H.N. Ciprofloxacin and ofloxacin aqueous humor concentrations after topical administration in dogs undergoing cataract surgery. *Veterinary Ophthalmology*, n. 8, p. 181 – 187, 2005.

## 9. ANEXOS

Anexo 1. Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais.

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b>
<b>UFMG</b>	<b>CEUA</b> COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
<p>Senhor(a) Professor(a) Benito Soto Blanco,</p>	
<p>Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Avaliação da penetração de gatifloxacino, moxifloxacino e besifloxacino na córnea e humor aquoso de cães, submetido a esta comissão pelo protocolo 266 / 2014, a CEUA decidiu <b>aprovar</b> a sua solicitação.</p>	
<p>Para acessar ao seu projeto clique no link: <a href="https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/">https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</a> Belo Horizonte, 22/05/2015.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG <a href="https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/">https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</a></p>	<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/cetea">www.ufmg.br/bioetica/cetea</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a></p>

Anexo 2. Autorização do Comitê de Ética do Centro de Controle de Zoonose de Belo Horizonte.



PREFEITURA MUNICIPAL  
DE BELO HORIZONTE

Belo Horizonte, 08 de Maio de 2015.

Ao Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais

Informo que o Centro de Controle de Zoonoses do município de Belo Horizonte, localizado na Rua Edna Quintel, 173 - bairro São Bernardo, atendendo a Portaria 020/2008 autoriza/permite a utilização de carcaças de animais após eutanásia.

Desta forma a aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, Luisa Cangussú Domingos, médica veterinária tem autorização para utilizar dezoito (18) carcaças de animais com o objetivo de realizar seu projeto intitulado "Avaliação da ação de colírio à base de gatifloxacino, moxifloxacino e besifloxacino na córnea e humor aquoso de cães".

Sem mais para o momento.

Atenciosamente,

  
Maria do Carmo de Araujo Ramos  
Gerente do Centro de Controle de Zoonoses  
Maria do Carmo de Araujo Ramos  
Gerente do Centro de Controle de Zoonoses  
BHU, 36.033-7

Centro de Controle de Zoonoses – Rua Edna Quintel, 173 – Bairro São Bernardo -  
CEP: 30.175-030 Telefone: 3246-8067 ou 3277 -7414