

**UNIVERSITY OF SAO PAULO**  
**FACULTY OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**  
**DEPARTMENT OF PHARMACY**  
**Graduate program: drug and medicines**  
**Concentration area: Pharmaceutical Production and Control**

**MIRLA ANALI BAZAN HENOSTROZA**

Besifloxacin nanostructured lipid carrier for the treatment of ophthalmic infections: preparation, physicochemical and biological characterization *in vitro* and *in vivo*

Thesis to obtain the title of DOCTOR  
Supervisor: Prof. Dr. Nádia Araci Bou-Chacra

**São Paulo**  
**2023**

**UNIVERSITY OF SAO PAULO**  
**FACULTY OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**  
**DEPARTMENT OF PHARMACY**  
**Graduate program: drug and medicines**  
**Concentration area: Pharmaceutical Production and Control**

**MIRLA ANALI BAZAN HENOSTROZA**

Besifloxacin nanostructured lipid carrier for the treatment of ophthalmic infections: preparation, physicochemical and biological characterization *in vitro* and *in vivo*

Original Version

Thesis to obtain the title of DOCTOR  
Supervisor: Prof. Dr. Nádia Araci Bou-Chacra

**São Paulo**  
**2023**

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

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

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

H528b HENOSTROZA, MIRLA ANALI BAZAN  
Besifloxacin nanostructured lipid carrier for the treatment of ophthalmic infections: preparation, physicochemical and biological characterization in vitro and in vivo / MIRLA ANALI BAZAN HENOSTROZA. - São Paulo, 2023.  
121 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Farmácia.  
Orientador: Bou-Chacra, Nádia Araci

1. lipid nanoparticles. 2. eye drops. 3. antibiotic. I. T. II. Bou-Chacra, Nádia Araci, orientador.

Mirla Anali Bazan Henostroza

Besifloxacin nanostructured lipid carrier for the treatment of ophthalmic infections: preparation, physicochemical and biological characterization *in vitro* and *in vivo*

Examination Board of

Thesis to obtain the title of DOCTOR

Prof. Dr.

Supervisor/President

---

1<sup>st</sup> examiner

---

2<sup>nd</sup> examiner

---

3<sup>rd</sup> examiner

---

4<sup>th</sup> examiner

São Paulo, \_\_\_\_\_ 2023

## DEDICATION

*To my parents for their endless support and love in my life.*

*To my sibling for their encouragement and love.*

*To my friends for the beautiful moments and inspiration.*

## ACKNOWLEDGMENT

To my family for always supporting my aspirations and dreams. All the people were part of my life and somehow contributed to this process.

To Professor Nádia Araci Bou-Chacra, for her guidance, teaching, encouragement, and resilience throughout this journey.

To the University of Sao Paulo and the Faculty of Pharmaceutical Science for the golden opportunity to accomplish this work.

To Professor Raimar Löbenberg for his contribution to developing new insights and guidance at the University of Alberta.

To colleagues in Prof. Nádia's research group, for overcoming challenges together. Especial thanks to Dr. Aline de Souza and Dr. Megumi Yukuyama for the constant exchange of views when facing difficulties.

To Professor Humberto Gomes Ferraz and colleagues from the Deinfar laboratory for their support. Special credit for Eremita Santos, thank you.

To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Foundation (CNPq) (Process Number: 141992/2019-0, Doutorado-GD) for providing the scholarship during my Doctorate Degree.

I thank the Eurofarma group, especially Pearson Saude Animal, for their partnership in developing this work.

## RESUMO

HENOSTROZA, M.A.B – **Carreador lipídico nanoestruturado contendo besifloxacino para o tratamento de infecções oftálmicas: preparação, caracterização físico-química e biológica *in vitro* e *in vivo***. 2023. 121f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A conjuntivite, ceratite e blefarite, constituem infecções oftálmicas mais frequentes sendo, na sua maioria, causadas por bactérias. O tratamento convencional consiste na administração tópica de antibióticos de amplo espectro. Devido às barreiras oculares, o tratamento tópico requer dose elevada e repetidas administrações para atingir efeito terapêutico. O besifloxacino, fluorquinolona de última geração, indicado exclusivamente no tratamento de infecções oftálmicas por via tópica, apresenta baixa solubilidade em água. Tal característica limita sua biodisponibilidade e predispõe ao desenvolvimento de resistência. Desse modo, abordagens inovadoras tornam-se necessárias no desenvolvimento de colírios contendo esse antibiótico. Carreador lipídico nanoestruturado (CLN) consiste de abordagem farmacotécnica promissora que pode apresentar características inovadoras atribuíveis a escala nanométrica. O objetivo desse projeto consistiu na preparação e na avaliação das características físico-químicas e biológicas do CLN contendo besifloxacino (BFX-CLN). A seleção de lipídio sólido e líquido foi efetuada empregando método de saturação. Os CLNs foram preparados pelo método de homogeneização a alta pressão. O cloridrato de besifloxacino apresentou maior solubilidade em triglicérides do ácido cáprico/caprílico e softisan®154 (gliceril éster do ácido palmítico e ácido esteárico) entre os lipídios líquidos e sólidos testados, respectivamente. O BFX-CLN otimizado apresentou tamanho de partícula (Z-ave)  $93,6 \pm 1,7$  nm e índice de polidispersão (PDI) igual a  $0,15 \pm 1,7$ . A avaliação da estabilidade física não mostrou alteração na Z-ave e IP por período de nove meses, a temperatura de  $30 \pm 2$  °C e  $75 \pm 5$  % umidade relativa. BFX-NLC apresentou 50% da liberação do fármaco, após 12 h. A atividade antimicrobiana *in vitro* demonstrou que o método de preparação não compromete a eficácia antimicrobiana do BFX. Adicionalmente, o BFX-NLC não mostrou toxicidade em larvas de *Galleria mellonella*. Assim, o presente estudo propõe plataforma inovadora para o tratamento de infecções bacterianas oftálmicas com potencial maior eficácia e maior intervalo entre as administrações.

**Palavras-chave:** besifloxacino, carreador lipídico nanoestruturado (CLN), estabilidade, atividade antimicrobiana *in vitro*, citotoxicidade

## ABSTRACT

HENOSTROZA, M.A.B – **Besifloxacin nanostructured lipid carrier containing for the treatment of ophthalmic infections: preparation, physicochemical and biological characterization in vitro and in vivo.** 2023. 121f– Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Conjunctivitis, keratitis, and blepharitis are the most frequent ophthalmic infections caused mainly by bacteria. Conventional treatment consists of topical administration of broad-spectrum antibiotics. Due to ocular barriers, topical treatment requires high doses and repeated administrations to achieve a therapeutic effect. Besifloxacin, a new generation of fluoroquinolone, indicated exclusively for the topical treatment of ophthalmic infections, has low solubility in water. This characteristic limit its bioavailability and predisposes it to the development of resistance. Thus, innovative approaches are needed in the development of antibiotic containing eye drops. Nanostructured lipid carrier (NLC) may present innovative properties attributed to the nanometric scale. This project's objective was to prepare and evaluate the physicochemical and biological characteristics of NLC containing besifloxacin (BFX-NLC) for ophthalmic use. Solid and liquid lipid selection was carried out using the saturation method. NLCs were prepared by the high-pressure homogenization method. BFX showed higher solubility in capric/caprylic acid triglycerides and Softisan®154 among the liquid and solid lipids tested. The optimized BFX-NLC showed Z-aveof  $93.6 \pm 1.7$  nm and a polydispersion index (PDI) equal to  $0.15 \pm 1.7$ . The physical stability showed no change in Z-ave and IP for nine months, at  $30 \pm 2$  °C and  $75 \pm 5$  % relative humidity. BFX-NLC showed 50% of drug release after 12 h. The in vitro antimicrobial activity demonstrated that the preparation method does not compromise the antimicrobial efficacy of BFX. Additionally, BFX-NLC did not show toxicity in *Galleria mellonella* larvae. These findings may foster an innovative platform for treating ophthalmic bacterial infections with larger interval between administrations compared to the conventional preparation.

**Keywords:** besifloxacin, nanostructured lipid carrier (NLC), stability, in vitro antimicrobial activity, cytotoxicity.