

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES BIOCOMPATÍVEIS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO INTRAOCULAR DO CELECOXIBE

Aline Gravinez Perissinato

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

**Araraquara – SP
2019**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES BIOCOMPATÍVEIS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO INTRAOCULAR DO CELECOXIBE

Aline Gravinez Perissinato

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

**Araraquara - SP
2019**

-
- P446d** Perissinato, Aline Gravinez.
Desenvolvimento de nanoemulsões biocompatíveis como sistema de liberação intra-ocular do celecoxibe / Aline Gravinez Perissinato. – Araraquara, 2019.
127 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.
- Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira.
1. Celecoxibe. 2. Microemulsões O/A. 3. Nanoemulsões O/A. 4. Liberação *in vitro*. Atividade anti-angiogênica. 5. *Zebrafish*. 6. RD. 7. DMRI. 8. OVR. I. Oliveira, Anselmo Gomes de, orient. II.. Título.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

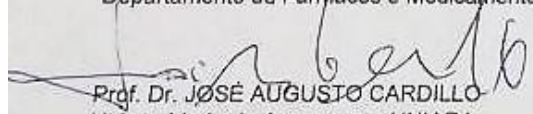
TÍTULO DA TESE: Nanodispersões biocompatíveis como estratégia tecnológica para liberação controlada intra-ocular do AINE Celecoxibe

AUTORA: ALINE GRAVINEZ PERISSINATO

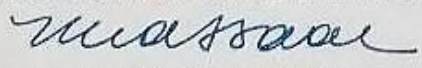
ORIENTADOR: ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA

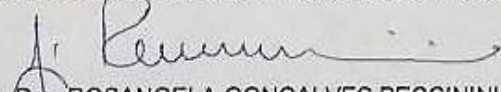
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. JOSÉ AUGUSTO CARDILLO
Universidade de Araraquara- UNIARA

Prof. Dr. NEWTON ANDREO FILHO
Departamento de Ciências Exatas e da Terra / Universidade Federal de São Paulo


Profa. Dra. VERA LUCIA BORGES ISAAC
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP-Araraquara


Profa. Dra. ROSANGELA GONCALVES PECCININI
Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 28 de junho de 2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Telma e Luís Carlos, que, dignamente apresentaram-me o caminho da persistência e honestidade e a importância da família.

À minha irmã, Naiara, pelo enorme laço de carinho que nos une e por ser um dos pilares da minha vida.

Ao meu vô Gê e à minha tia Sil pela ajuda em todas as etapas desta vida acadêmica.

Ao meu noivo, Rodolfo, pelo amor e pelo apoio em todos os momentos, principalmente nos de incertezas, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, primeiramente, por guiarem meu caminho.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, pela amizade, pela confiança depositada em mim, pela oportunidade de poder trabalhar ao lado de alguém que transborda sabedoria e que sabe tão bem transmitir seus ensinamentos.

Aos queridos amigos do laboratório, que se tornaram essenciais: Eli, Bruno, Leda, Lucas, Aline, Mari, João, Karen, Camila, Nati, Vivian, Jéssica, Andressinha, Fer e Gustavo, sem o convívio diário de vocês essa jornada não seria fácil.

Aos professores do Departamento de Fármacos e Medicamentos pela ajuda, amizade e convivência agradável, em especial Profa. Palmira e Prof. Marlus.

À Profa. Leila e ao seus alunos Bruno e Marina pela realização das análises de espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS) no Laboratório Nacional de Espalhamento de Luz Síncrotron – LNLS.

À Prof. Virgínia por disponibilizar o uso do permeador e do microscópio de luz polarizada.

Ao Prof. Breandán Kennedy da University College Dublin por me aceitar em seu grupo de pesquisa e me apresentar um modelo experimental animal tão excitante como o *zebrafish*.

À Yolanda Alvarez da University College Dublin por me passar todo o seu conhecimento e técnica mas, mais importante, por sua amizade e companheirismo.

À Danúbia do Departamento de Físico-Química do IQ-UNESP pela realização das análises de reologia e difração de raios-X.

Aos funcionários do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP pelo auxílio no uso do HPLC dos laboratórios Multiusuário-PADC e Didático de Toxicologia.

Aos funcionários do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, em particular à Nati, Marga, Fátima e Queila.

À secretaria do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP, pela disposição constante em todos os momentos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP que me forneceu conhecimentos, formou meu espírito crítico e me deu oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) pelo auxílio financeiro – Código de Financiamento 001.

A todos vocês, o meu mais sincero obrigado!

EPÍGRAFE

*“Aprenda como se fosse viver
para sempre. Viva como se
fosse morrer amanhã”.*

- Manhatma Gandhi

*“Quem deseja ver o arco-íris,
precisa aprender a gostar da
chuva”.*

- Paulo Coelho

RESUMO

O celecoxibe (CEL) é um inibidor específico de ciclooxigenase 2 e vem sendo estudado também como inibidor da atividade angiogênica em razão de sua propriedade de inibir o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Devido às suas características físico-químicas, o CEL possui baixa solubilidade em água e alta permeabilidade, sendo classificado como fármaco pertencente à classe 2 do Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Alguns anti-inflamatórios não esteroides têm sido utilizados por via tópica no tratamento de grande parte das doenças do segmento anterior dos olhos, mas também apresentam bom prognóstico para o tratamento de doenças do segmento posterior dos olhos, tais como a retinopatia diabética (RD), degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e oclusão venosa retinal (OVR). Na maioria dos casos as concentrações locais dos fármacos no segmento posterior dos olhos não conseguem atender às necessidades quantitativas e temporais dos estímulos dessas doenças quando administrados pela via oral, ocular tópica ou parenteral sistêmica. Assim, o objetivo deste projeto foi desenvolver e caracterizar nanoemulsões (NEs) biocompatíveis visando à administração intraocular do CEL. Os sistemas nanoemulsionados contêm Fosfatidilcolina de Soja (FS) e Tween®20 (Tw) como tensoativos, Captex®200 como fase oleosa e tampão fosfato de potássio pH 7,2 como fase aquosa. As NEs foram desenvolvidas e sua nanoestrutura foi caracterizada através do diâmetro médio de gotículas onde as NEs vazias apresentaram diâmetro médio da ordem de 40 nm com um Potencial Zeta de -7,24 mV enquanto que as NEs carregadas com o CEL tiveram seus diâmetros aumentados em até 245 nm com um Potencial Zeta de -19,30 mV. Os ensaios reológicos revelaram que o comportamento tixotrópico das amostras é altamente dependente da composição das NEs. As medidas de microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios-X a baixo ângulo e difração de raios-X indicaram que na NE vazia não há alteração da nanoestrutura, enquanto que na NE carregada com CEL há uma alteração estrutural com maior grau de ordenação. Esses resultados também revelaram que o aumento da razão O/T na mistura fase oleosa/sistema tensoativo, permite maior incorporação do fármaco no interior das gotículas, aumentando de 28 mg/mL para 80 mg/mL e que o perfil de liberação de todas as NEs foram do tipo saturação, com liberação inicial lenta, mas que se ajustou ao modelo cinético de Weibull. Os experimentos de atividade anti-angiogênica *in vivo*, utilizando o peixe-zebra (*Danio rerio*) Tg(fli1:EGFP), mostraram que o CEL livre e a NE com 5µM do CEL exibiram efeito na inibição da angiogênese ocular específica, inibindo o crescimento de vasos sanguíneos na região da retina. Assim, a associação do CEL com a NE indica uma nova alternativa no tratamento para as doenças relacionadas com a angiogênese excessiva, já que até o momento, o CEL tem sido administrado na forma de solução em DMSO.

Palavras-chave: Celecoxibe. Microemulsões O/A. Nanoemulsões O/A. Liberação *in vitro*. Atividade anti-angiogênica. Zebrafish. RD. DMRI. OVR.

ABSTRACT

Celecoxib (CEL) is a specific inhibitor of cyclooxygenase 2 and has also been studied as an inhibitor of angiogenic activity because of its property of inhibiting vascular endothelial growth factor (VEGF). Due to its physico-chemical characteristics, CEL has low solubility in water and high permeability being classified as a drug belonging to class 2 of the Biopharmaceutical Classification System. Some anti-inflammatory drugs have been used topically to treat most of the anterior segment eye diseases, but also have a good prognosis for the treatment of diseases of the posterior segment of the eye such as diabetic retinopathy (DR), age-related macular degeneration (AMD) and retinal venous occlusion (RVO). In most cases the local concentrations of the drugs in the posterior segment of the eye fail to reach the quantitative and temporal needs of the stimuli of these diseases when administered by the oral, topical ocular and systemic parenteral rout. The aim of this project was to develop and characterize biocompatible nanoemulsions (NEs) capable of increasing the apparent solubility of CEL for intraocular administration. Nanoemulsified systems contain Soy Phosphatidylcholine (FS) and Tween®20 (Tw) as surfactants, Captex®200 as oily phase and potassium phosphate buffer pH 7.2 as the aqueous phase. The NEs were developed and their nanostructure was characterized by the mean diameter of droplets where the empty NEs had an average diameter of the order of 40 nm with a zeta potential of -7.24 mV while the NEs loaded with the CEL had their diameters increased up to 245 nm with a zeta potential of -19.30 mV. The rheological tests revealed that the thixotropic behavior of the samples is highly dependent on the composition of NEs. The polarized light microscopy, X-ray scattering at low angles and X-ray diffraction measurements indicate that in the empty NE there is no change in the nanostructure, whereas in the NE loaded with CEL there is a structural change with a higher degree of ordering. These results also revealed that the increase in the O/T ratio in the mixture of oily phase/surfactant system allows greater incorporation of the drug into the droplets increasing from 28 mg/mL to 80 mg/mL and the release profile of all NEs were saturation-type with slow initial release but conforming to the Weibull kinetic model. *In vivo* anti-angiogenic activity experiments using zebrafish (*Danio rerio*) Tg (fli1: EGFP) showed that free CEL and NE with 5 µM of CEL exhibited an effect on the inhibition of specific ocular angiogenesis, inhibiting the growth of blood vessels in the region of the retina. Thus, the association of CEL with NE indicates a new alternative in the treatment for diseases related to excessive angiogenesis, since to date, CEL has been administered as a DMSO solution.

Keywords: Celecoxib. O/A microemulsions. O/A nanoemulsions. In vitro release. Anti-angiogenic activity. Zebrafish. DR. AMD. RVO.

LISTA DE ABREVIATURAS

A/O – água em óleo

CEL - celecoxibe

CCD – *central composite design*

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

C_o – concentração inicial do fármaco

C_t – concentração do fármaco no tempo t

D – distância

DAD – arranjo de diodos

DMRI – degeneração macular relacionada à idade

DLS – espalhamento de luz dinâmico

dpf – dias pós fertilização

DPR – desvio padrão relativo

EAV – emulsão de alta viscosidade

EBV – emulsão de baixa viscosidade

EGFP – proteína fluorescente verde

EHL – equilíbrio hidrófilo-lipófilo

FA – fase aquosa

FO – fase oleosa

FS – fosfatidilcolina de soja

hpf – horas pós fertilização

K – índice de consistência

k₁ – constante de liberação

k₂ – constante de permeação

LD – limite de detecção

LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

LQ – limite de quantificação

MEs – microemulsões

NEs - nanoemulsões

n – índice do comportamento do fluxo

nm - nanômetro

O/A – óleo em água

OVR – oclusão vascular retinal

Pdl – índice de polidispersidade

PFA - paraformaldeído

Pg – prostaglandinas

qmáx – distância máxima

RD – retinopatia diabética

TCL – triglicerídeo de cadeia longa

TCM – triglicerídeo de cadeia média

Tw - Tween®

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proporção dos solventes nos ensaios preliminares.	39
Tabela 2: Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental.	40
Tabela 3: Resultados de adequação dos sistemas cromatográficos.	51
Tabela 4: Composição do planejamento experimental.	52
Tabela 5: Resultados experimentais do planejamento fatorial.	53
Tabela 6: Resultados do Teste de Cochran para a avaliação da homocedasticidade.	58
Tabela 7: Resultados da ANOVA para a avaliação da significância do coeficiente angular.	59
Tabela 8: Resultados da ANOVA para a avaliação da significância do coeficiente linear.	59
Tabela 9: Resultados do teste de Shapiro-Wilk para a avaliação da normalidade.	60
Tabela 10: Resumo da análise dos resíduos.	61
Tabela 11: Resultados do teste de Durbin- Watson para a avaliação da independência.	61
Tabela 12: Resumo dos resultados estatísticos obtidos no parâmetro linearidade da validação analítica.	62
Tabela 13: Resultados obtidos na determinação da precisão inter-dia do método analítico para a quantificação do CEL.	63
Tabela 14: Resultados obtidos na determinação da precisão intra-dia do método analítico para a quantificação do CEL.	63
Tabela 15: Resultados obtidos na determinação da exatidão inter-dia do método analítico para a quantificação do CEL.	64
Tabela 16: Resultados obtidos na determinação da exatidão intra-dia do método analítico para a quantificação do CEL.	64
Tabela 17: Resultados do limite de detecção e quantificação.	65
Tabela 18: Resultados obtidos para a determinação da robustez do método.	65
Tabela 19: Estabilidade do CEL no meio diluente.	66
Tabela 20: Composição das NEs selecionadas para a sequência de trabalho.	67
Tabela 21: Diâmetro das gotículas e índice de polidispersidade (Pdl) das NEs com variação da razão O/T na ausência e presença de 30 mg/mL de CEL.	70
Tabela 22: Potencial Zeta das NEs com variação da razão O/T na ausência e presença de 30 mg/mL de CEL.	73

Tabela 23: Valores referentes ao volume de fase das NEs e a solubilidade do CEL em cada formulação.	74
Tabela 24: Índice do comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (k) em relação à razão O/T para as NEs preparadas na ausência e na presença de 30 mg/mL de CEL.....	80
Tabela 25: Dados de F.mm das NEs com variação da razão O/T correlacionando com os dados obtidos do índice de consistência (k).	89
Tabela 26: Valores de $q_{\text{máx}}$ (Å) para as NEs relação à razão O/T na ausência e presença de 30 mg/mL de CEL.	95
Tabela 27: Dados dos modelos matemáticos de Korsmeyer-Peppas e Higuchi para caracterizar a cinética de liberação das NEs.	109
Tabela 28: Dados dos modelos matemáticos de Hixson/Crowell e Weibull para caracterizar a cinética de liberação das NEs.	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do celecoxibe.....	24
Figura 2: Representação esquemática da estrutura ocular e suas funcionalidades.	26
Figura 3: Representação esquemática de nanoemulsão O/A e A/O, respectivamente.	29
Figura 4: Estrutura química da fosfatidilcolina.	33
Figura 5: Estrutura química do polissorbato 20.	34
Figura 6: Gráfico de Pareto para o tempo de retenção.....	53
Figura 7: Gráfico de Pareto para o fator de encaudamento.....	54
Figura 8: Gráfico de superfície de resposta descrevendo as melhores condições para o tempo de retenção.....	55
Figura 9: Gráfico de superfície de resposta descrevendo as melhores condições para o fator de encaudamento.....	55
Figura 10: Cromatogramas do branco (A) e da amostra de CEL na concentração de 45,0 µg/mL incorporada à NE (B).	56
Figura 11: Curva analítica de CEL por CLAE.	57
Figura 12: Análise gráfica dos resíduos.....	60
Figura 13: Diagrama de fases pseudo-ternário de sistemas contendo FS/Tw (Tensoativo), Captex® (Fase Oleosa) e sistema tampão (Fase Aquosa). Legenda: (A) Diagrama de fases dos sistemas na ausência de CEL; (B) Diagrama de fases dos sistemas contendo 30 mg/mL de CEL; (NE) Sistema nanoemulsionado; (EAV) Emulsão de alta viscosidade; (EBV) Emulsão da baixa viscosidade; (SF) Separação de fases. Os pontos marcados de A a G representam as composições da NEs utilizadas neste estudo.....	67
Figura 14: Variação do diâmetro médio das gotículas em função do aumento da razão O/T. Legendas: (●) Nanoemulsão na ausência de CEL; (○) Nanoemulsão na presença de 30 mg/mL de CEL.....	70
Figura 15: Variação do Pdl em função do aumento da razão O/T. Legendas: (●) Nanoemulsões na ausência de CEL; (○) Nanoemulsões na presença de 30 mg/mL de CEL.....	72
Figura 16: Variação do Potencial Zeta em função do aumento da razão O/T. Legendas: (●) Nanoemulsões na ausência de CEL; (○) Nanoemulsões na presença de 30 mg/mL de CEL.....	74
Figura 17: Efeito do volume de fase na incorporação do do CEL nas NEs.	75
Figura 18: Efeito da razão de O/T na incorporação do CEL nas NEs.	76

Figura 19: Perfil reológico das NEs em função da razão O/T na ausência de CEL.....	78
Figura 20: Perfil reológico das NEs em função da razão O/T na presença de 30 mg/mL de CEL.....	79
Figura 21: Índice de consistência (k) para NEs na ausência e presença de 30 mg/mL do fármaco em relação à razão O/T.	80
Figura 22: Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da NE com razão O/T 0,33, onde G' corresponde aos símbolos vazios e o G'' aos símbolos cheios.....	82
Figura 23: Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da NE com razão O/T 0,56, onde G' corresponde aos símbolos vazios e o G'' aos símbolos cheios.....	82
Figura 24: Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da NE com razão O/T 0,78, onde G' corresponde aos símbolos vazios e o G'' aos símbolos cheios.....	83
Figura 25: Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da NE com razão O/T 1,00, onde G' corresponde aos símbolos vazios e o G'' aos símbolos cheios.....	83
Figura 26: Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da NE com razão O/T 0,33, onde G' corresponde aos símbolos vazios e o G'' aos símbolos cheios.....	84
Figura 27: Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da NE com razão O/T 0,56, onde G' corresponde aos símbolos vazios e o G'' aos símbolos cheios.....	85
Figura 28: Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da NE com razão O/T 0,78, onde G' corresponde aos símbolos vazios e o G'' aos símbolos cheios.....	85
Figura 29: Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da NE com razão O/T 1,00, onde G' corresponde aos símbolos vazios e o G'' aos símbolos cheios.....	86
Figura 30: Evolução temporal da compliância das NEs na ausência do fármaco.	87
Figura 31: Evolução temporal da compliância das NEs na presença de 30 mg/mL do fármaco.....	87
Figura 32: Valores de compliância a 200s (etapa de fluência) das NEs em função da razão O/T.....	88
Figura 33: Fotomicrografias dos sistemas preparados com proporções crescentes da razão O/T. Aumento de 40x.....	91
Figura 34: Curvas de SAXS das NEs em relação à razão O/T na ausência de CEL....	93
Figura 35: Curvas de SAXS das NEs em relação à razão O/T na presença de 30 mg/mL de CEL.....	94
Figura 36: Difrátogramas dos componentes isolados: Tween®20, Captex®200, FS e CEL.....	96
Figura 37: Difrátogramas da mistura física dos componentes das NEs.	96

Figura 38: Difrátogramas das NEs na ausência do fármaco.	97
Figura 39: Difrátogramas das NEs na presença de 30 mg/mL do fármaco.	98
Figura 40: Estabilidade da NE A (O/T 0,33).	99
Figura 41: Estabilidade da NE B (O/T: 0,56).	99
Figura 42: Estabilidade da NE C (O/T: 0,78).	100
Figura 43: Estabilidade da NE D (O/T: 1,00).	100
Figura 44: Perfil de liberação do CEL nas NEs com variação da razão O/T	103
Figura 45: Efeito da razão O/T na relação entre a quantidade máxima de CEL incorporada nos sistemas nanoemulsionados e do CEL livre.	105
Figura 46: Curvas de liberação das NEs com variação da razão O/T fitados com o modelo de Weibull.	109
Figura 47: Imagens fluorescentes mostrando a integridade dos vasos sanguíneos intersegmentais GFP-positivos a 2 dpf em larvas tratados com CEL livre e incorporado à NE e controles tratados com DMSO e Sunitinibe.	112
Figura 48: Gráfico hierárquico da bioatividade das amostras em uma concentração de 0,1 a 15,0 µM do CEL livre e incorporado às NEs e controles tratados com DMSO e Sunitinibe para inibir a angiogênese do desenvolvimento usando peixe-zebra Tg(fli1: EGFP).....	113
Figura 49: Imagens fluorescentes que ilustram a integridade dos vasos sanguíneos da retina GFP-positivos a 5 dpf em larvas tratados com CEL livre e incorporado à NE e controles tratados com DMSO e Sunitinibe.	114
Figura 50: CEL livre e incorporada resultam em inibição dose-dependente da angiogênese intraocular. As larvas Tg (fli1: EGFP) de 1 dpf foram tratadas com concentrações variando de 0,1 a 15,0 uM e controles tratados com DMSO e Sunitinibe e o número de ramos primários de vasos hialoides foram determinados a 5 dpf.	115
Figura 51: Taxa de sobrevivência das larvas após 5 dpf tratadas com CEL livre e incorporado à NE e controles tratados com DMSO e Sunitinibe.	116
Figura 52: Inibição dependente do tempo do desenvolvimento e da angiogênese intraocular pelo CEL.	117
Figura 53: Respostas optocinéticas (OKR) de larvas de 5 dpf.	118

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
3. OBJETIVOS	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAL	37
4.1.1 Matérias-primas, reagentes e solventes	37
4.1.2 Equipamentos	37
4.2 MÉTODOS	38
4.2.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de CEL por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ...	38
4.2.1.1 Ensaio preliminares para determinação da concentração ideal de metanol:água	38
4.2.1.2 Planejamento fatorial com ponto central	39
4.2.1.3 Validação da metodologia analítica	40
4.2.2 Preparação dos sistemas estabilizados por fosfatidilcolina de soja e Tween®20	43
4.2.3 Diagrama de fase para o sistema estabilizado por FS/Tw	43
4.2.4 Caracterização dos sistemas selecionados	44
4.2.4.1 Determinação do diâmetro médio da gotícula e Pdl por espalhamento dinâmico de luz	44
4.2.4.2 Potencial Zeta	44
4.2.4.3 Determinação da incorporação do CEL nas NES	45
4.2.4.3.1 <i>Determinação das densidades das NES</i>	<i>45</i>
4.2.4.3.2 <i>Determinação do volume de fase</i>	<i>45</i>
4.2.4.4 Análise reológica	46
4.2.4.5 Seringabilidade	46
4.2.4.6 Microscopia de luz polarizada	46
4.2.4.7 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	46
4.2.4.8 Difração de raios-X	47
4.2.4.9 Estudos de estabilidade física das NES	47

4.2.5	Estudos de liberação <i>in vitro</i>	47
4.2.6	Estudos <i>in vivo</i> para avaliar a atividade anti-angiogênica do CEL utilizando o modelo animal peixe-zebra	48
4.2.6.1	Ensaio dose-dependente	49
4.2.6.2	Quantificação dos vasos hialoides da retina	49
4.2.6.3	Ensaio do comportamento visual	50
4.2.6.4	Ensaio de tempo-dependência do CEL	50
5.1	DETERMINAÇÃO DO CEL EM NES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	51
5.1.1	Ensaios preliminares para determinação das proporções ideais de metanol:água	51
5.1.2	Gráficos de Pareto e de superfície de resposta	52
5.1.3	Parâmetros de validação	56
5.2	DIAGRAMA DE FASES	66
5.3	CARACTERIZAÇÃO DAS NES	69
5.3.1	Análise do diâmetro médio das gotículas e Pdl por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	69
5.3.2	Análise do Potencial Zeta	73
5.3.3	Incorporação do CEL nas NES em função do volume de fase	74
5.3.4	Análise do comportamento reológico	76
5.3.5	Análise da seringabilidade	88
5.3.6	Microscopia de luz polarizada	90
5.3.7	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	91
5.3.8	Difração de raios-X	95
5.3.9	Determinação da estabilidade física das NES	98
5.4	ANÁLISE DA LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> E MODELOS CINÉTICOS	101
5.5	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI-ANGIOGÊNICA DO CEL UTILIZANDO MODELO ANIMAL PEIXE-ZEBRA	110
6.	CONCLUSÕES	118
7.	REFERÊNCIAS	119

1. INTRODUÇÃO

Doenças que afetam o segmento ocular posterior estão atualmente aumentando a um ritmo alarmante. Estas incluem degeneração macular relacionada à idade (DMRI), edema macular diabético, retinite viral, vitreorretinopatia proliferativa, uveíte posterior, oclusões vasculares da retina (OVR), neovascularização da coroide e retinopatia diabética (RD), para citar alguns (Kaur e Kakkar, 2014). A maioria dessas doenças pode invariavelmente levar à perda permanente da visão se deixado sem tratamento (Kaur e Kakkar, 2014).

Do total de doenças oculares debilitantes, 55% são doenças do segmento posterior, enquanto as vendas farmacêuticas oftálmicas, representando as doenças do segmento posterior, foi de apenas 5% da venda total de produtos oculares. A opção mais comum de tratamento atual para distúrbios do segmento posterior ocular é a cirurgia (Edelhauser *et al.*, 2010).

No entanto, com uma melhor compreensão da anatomia do olho, da fisiopatologia dessas doenças do segmento posterior dos olhos, e o avanço das técnicas e dos sistemas de liberação ocular de fármacos, várias novas terapias medicamentosas eficazes estão sendo oferecidas como alternativas viáveis (Edelhauser *et al.*, 2010).

O tratamento dessas doenças requer uma aplicação direta e local do fármaco no segmento posterior do olho em uma concentração terapêutica porque, a entrega de moléculas exógenas para os tecidos intraoculares, incluindo a retina, é significativamente limitado, especialmente pelas vias tópicas e sistêmicas (Kaur e Kakkar, 2014).

O olho é um órgão altamente protegido com várias barreiras anatômicas e fisiológicas, como a barreira hemato-aquosa e a barreira hemato-retiniana. Entretanto, o uso de sistemas de liberação nanoestruturados demonstrou desafiar essas barreiras e atingir tecidos oculares internos, incluindo a retina (Kaur e Kakkar, 2014).

Embora os agentes anti-inflamatórios esteroides possam ser considerados para o tratamento da inflamação ocular, a administração clínica de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) aumentou nas últimas duas décadas, principalmente devido à capacidade de evitar efeitos indesejáveis dos agentes esteroides, como a diminuição da resposta imunológica à infecção, formação de catarata, elevada pressão intraocular e inibição da repitelização após desnudação epitelial (Seyfoddin *et al.*, 2010).

Os AINEs são comumente usados na administração tópica na gestão e prevenção da inflamação ocular envolvendo estruturas do segmento anterior do olho, edema macular cistoide (EMC), relacionado à cirurgia de catarata e a manutenção da midríase durante a cirurgia de catarata (Souto *et al.*, 2010). Para superar os problemas da terapia ocular convencional, como o tempo de residência, drenagem de fármacos e administração frequente, vários sistemas de liberação, como nanopartículas poliméricas e, mais recentemente, nanopartículas lipídicas (nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados), assim como novas rotas de administração ocular, estão sendo explorados para melhorar a biodisponibilidade ocular de fármacos (Sánchez-López *et al.*, 2017).

Nanopartículas lipídicas sólidas para administração ocular de diclofenaco de sódio foram desenvolvidos por Attama *et al.* Estas partículas contendo 5,0% de matriz lipídica (Phospholipon®90G) e polissorbato 80 (Tween®80), foram formulados por homogeneização a quente, usando homogeneizador de alta pressão. Alta eficiência de encapsulamento foi alcançado, seguido por liberação sustentada de diclofenaco sódico e alta permeação através da córnea (Attama *et al.*, 2008).

O flurbiprofeno, outro AINE, evita a produção de prostaglandinas, bloqueando a ação da ciclooxigenase (COX), reduzindo a inflamação seguida de cirurgia ocular ou tratamento à laser. Este fármaco foi incorporada com sucesso em carreadores lipídicos nanoestruturados em um estudo realizado por Gonzalez-Mira *et al.* (Gonzalez-Mira *et al.*, 2010).

Apesar dos crescentes estudos para testar a eficácia dos AINEs em tratar DMRI, RD e OVR não há evidências convincentes que os AINEs administrados via tópica ou sistêmica reduzem de forma mensurável a produção de prostaglandina retiniana, em contraste, a administração intraocular resulta em níveis de fármaco na retina consideravelmente mais altos, minimizando a exposição sistêmica (Kim *et al.*, 2008).

Estudos anteriores demonstraram que a injeção intravítrea de ceterolaco resulta em níveis de fármaco na retina de 100 a 1000 vezes maior do que após o uso tópico. No entanto, o ceterolaco é seis vezes mais seletivo da COX-1 do que da COX-2 e tem uma meia vida intraocular curta, que limita muito seu efeito terapêutico (Baranano *et al.*, 2009).

O celecoxibe (CEL), por outro lado, exibe uma prolongada meia vida intraocular devido à sua relativa insolubilidade no vítreo. Após uma única injeção intravítrea, a maioria do fármaco rapidamente precipita (de forma semelhante ao acetato de

triancinolona), mas mantém uma concentração solubilizada muito superior à sua concentração inibitória mediana para COX-2 (Seedher e Bhatia, 2003).

Após injeção, o celecoxibe é imediatamente precipitado uma vez fora de seu veículo, e alguns cristais do fármaco podem ser claramente visualizados por semanas atrás da cápsula da lente (Seedher e Bhatia, 2003).

O celecoxibe é um fármaco da classe dos anti-inflamatórios não esteroides (AINE). É um composto lipofílico (logP 3,5) pertencente à classe 2 do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, sendo um fármaco pouco solúvel e altamente permeável (Palamoor e Jablonski, 2013).

O CEL tem sido investigado para várias terapias de câncer como: o câncer de colón, mama, pulmão, estômago, cabeça e pescoço (Tolloczko-Iwaniuk *et al.*, 2018) e, atualmente, pelos seus efeitos antiproliferativo e inibidor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) para tratamento de câncer e doenças oculares provocadas pela vascularização excessiva, como a degeneração macular relacionada com a idade (DMRI), a retinopatia diabética (RD) e a oclusão venosa da retina (OVR) (Amrite *et al.*, 2006; Amrite *et al.*, 2008).

Evidências recentes apóiam o papel terapêutico do celecoxibe na RD. O tratamento com celecoxibe na indução de estreptozotocina em ratos diabéticos reduzem a expressão de VEGF na retina e o vazamento vascular, e um estudo prospectivo controlado demonstrou que o celecoxibe oral reduziu significativamente o derrame vascular em pacientes com RD, apesar da parada prematura devido às preocupações sobre a toxicidade cardiovascular. A injeção intraocular minimiza a sua toxicidade, e por causa da sua relativa insolubilidade no vítreo, o celecoxibe possui propriedades ideais para a liberação intraocular (Ayalasomayajula e Kompella, 2003).

Até o presente momento não há estudos clínicos da incorporação do CEL em um novo sistema de liberação cuja via de administração seja a rota intraocular. O único estudo que tem na literatura trata-se da farmacocinética, segurança e eficácia da administração intraocular do CEL utilizando como solvente o DMSO (dimestilsulfóxido), o qual o tempo de meia vida do fármaco é de 24 horas após a administração, tanto no humor vítreo como na retina (Kim *et al.*, 2014).

Os resultados deste estudo demonstram que uma única injeção de celecoxibe parece não ser tóxica para a retina e proporciona uma liberação sustentada do fármaco até 8 semanas (Kim *et al.*, 2014).

Atualmente, há uma tendência bastante evidente para o desenvolvimento de sistemas de liberação minimamente invasíveis e com efeitos secundários limitados e

controláveis (Paganelli *et al.*, 2010), além das novas abordagens tecnológicas há necessidade de agentes mais seguros.

Um dos principais problemas da farmacoterapia das doenças do segmento posterior dos olhos é atingir e manter concentrações terapêuticas nos tecidos locais pelo tempo necessário para inibir o estímulo da doença (Geroski e Edelhauser, 2000; Maurice, 2002). A baixa concentração dos fármacos nos tecidos do segmento posterior dos olhos está relacionada com a eficiente barreira de proteção dos olhos, barreiras anatômicas e fisiológicas, as quais incluem a intensa resistência à permeabilidade da córnea, a dinâmica lacrimal, a drenagem naso-lacrimal e a alta eficiência da barreira hemato-ocular (Järvinen *et al.*, 1995; Peyman e Ganiban, 1995; Geroski e Edelhauser, 2000).

As formulações convencionais não possuem habilidade de gerar o efeito terapêutico adequado ou podem causar efeitos indesejados ao paciente, devido à toxicidade potencial do fármaco, da frequência de administração ou pela necessidade de administrar doses elevadas pela via sistêmica para obter o resultado terapêutico. Para contornar esses problemas, novos sistemas de liberação de fármacos, tais como os lipossomas, nano e microemulsões, géis hidrofílicos, nano e micropartículas, e implantes biodegradáveis têm sido estudados (Pal Kaur e Kanwar, 2002; Oliveira *et al.*, 2013).

O termo microemulsão (ME) foi introduzido na literatura por Hoar e Schulman ao descreverem os sistemas transparentes ou translúcidos, obtidos pela titulação de uma emulsão comum com álcool de cadeia média (cotensoativo), as quais se transformavam do aspecto leitoso inicial, para sistemas transparentes ou translúcidos (Hoar e Schulman, 1943; Garti e Aserin, 1996).

As MEs são definidas como sistemas transparentes, caracterizados pela mistura de óleo, água, tensoativo e cotensoativo, formando um sistema termodinamicamente estável; enquanto que as nanoemulsões (NEs), apesar de também possuírem as mesmas características visuais, não apresentam estabilidade termodinâmica, pois não conseguem diminuir sua tensão interfacial a ponto de contrariar totalmente a energia de superfície provocada pelo aumento da área interfacial (Oliveira *et al.*, 2004).

As MEs e NEs são geralmente caracterizadas como agregados esféricos com diâmetro muito pequeno, na faixa de 5 a 500 nm, enquanto que o diâmetro das gotículas de uma emulsão comum é da ordem de 1 µm a 100 µm; são classificadas como sistemas coloidais com diâmetro de partícula menor que $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz incidente e, portanto, não espalham luz. Este fato explica porque as NEs e

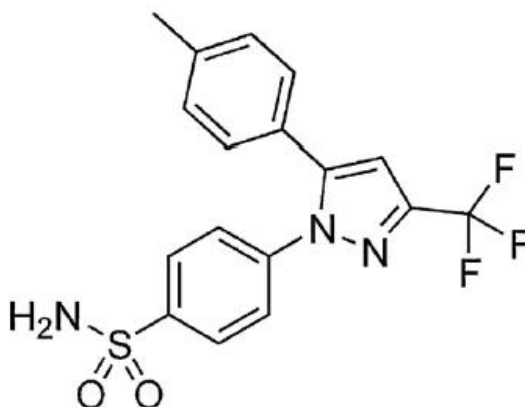
MEs são sistemas opticamente transparentes (Lawrence e Rees, 2000; Aulton e Taylor, 2005; Pestana, 2009).

As micro e nanoemulsões podem ter orientação óleo em água ou água em óleo. Para incorporar o celecoxibe, fármaco com características lipofílicas, foram desenvolvidas nanoemulsões óleo em água e o fármaco foi incorporado na fase interna oleosa. Sendo assim, com a fase externa aquosa e dimensão reduzida da fase interna, estas formulações podem ser administradas através da via intraocular, rota de administração que mais tem mostrado resultados satisfatórios no tratamento das doenças do segmento posterior dos olhos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O celecoxibe (4-[5-(4-metilfenil)-3-trifluorometil]pirazol-1-il]benzenosulfonamida CAS 16959-42-5 (Figura 1) é um inibidor específico de ciclooxygenase 2 (COX-2), sem a inibição da ciclooxygenase 1 em doses terapêuticas (Avrahami *et al.*, 2007). Este fármaco é um anti-inflamatório não esteroide (AINE) levemente ácido (pKa: 11,1), hidrofóbico (logP: 3,5) e sua baixa solubilidade em água (3 a 7 µg/mL) contribui para a elevada variabilidade na sua absorção (Avrahami *et al.*, 2007).

Figura 1: Estrutura química do celecoxibe.



De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica este fármaco possui baixa solubilidade e alta permeabilidade (classe 2) (Amidon *et al.*, 1995), sendo que a dimensão do tamanho da partícula influencia, tanto a uniformidade do conteúdo como nos fenômenos de dissolução e biodisponibilidade do medicamento (Avrahami *et al.*, 2007).

É geralmente aceito que compostos com baixa solubilidade e alta permeabilidade através das membranas biológicas mostrem uma taxa limitada de dissolução e absorção *in vivo* (Palamoor e Jablonski, 2013). Assim, é necessário agregar tecnologia farmacêutica à forma de administração como meio de melhorar a solubilidade aparente do fármaco e sua biodisponibilidade (Palamoor e Jablonski, 2013).

Os AINEs têm sido utilizados topicamente no tratamento de algumas doenças oculares para aumentar a midríase, reduzir a inflamação pós-operatória, prevenir e tratar edema de mácula associado à cirurgia de catarata, além de aplicações no controle da dor e fotofobia após cirurgia refrativa e alívio do prurido associado à conjuntivite alérgica. Mais recentemente, pesquisadores comprovaram que os AINES

são benéficos para o tratamento da retinopatia diabética, degeneração macular associada à idade, oclusão venosa retiniana e tumores oculares localizados na parte posterior do globo ocular (Ibrahim *et al.*, 2013).

O CEL tem sido investigado para várias terapias de câncer (Tolloczko-Iwaniuk *et al.*, 2018) e, atualmente, pelos seus efeitos anti-proliferativo e inibidor de VEGF para tratamento de câncer e doenças oculares como a degeneração macular relacionada com a idade (DMRI), a retinopatia diabética (RD) e a oclusão venosa da retina (OVR) (Amrite *et al.*, 2006; Amrite *et al.*, 2008).

Existem duas formas de DMRI, a úmida (~ 20% dos casos) e a forma seca (~ 80% dos casos). Embora a forma úmida seja menos frequente, ela representa a causa mais severa de perda de visão (Ferris *et al.*, 1984). A progressão da forma úmida da doença está relacionada com a angiogênese excessiva, denominada de neovascularização da coroide (NVC). Esse processo, de invasão de vasos sanguíneos na coroide provoca descolamento e atrofia da retina, com perda da visão central (Kulkarni e Kuppermann, 2005).

A RD é uma patologia microvascular da retina, em que o vazamento vascular e proliferação estão relacionados com a deficiência de visão. Um processo inflamatório parece desempenhar o papel principal no processo fisiológico da RD (Joussen *et al.*, 2004). Placas de microinflamação incluindo a dilatação dos vasos com alteração do fluxo sanguíneo para os tecidos e exudação de fluídos, são as principais causas da progressão da RD. Fármacos AINE inibidores de ciclooxigenase-2, como o celecoxibe, além de suas propriedades anti-inflamatórias, aplicáveis no tratamento e prevenção de inflações de diversas origens, também demonstraram, em testes pré-clínicos, reduzir as anormalidades dos vazamentos vasculares e de serem úteis como uma das formas de tratamento para a RD (Joussen *et al.*, 2004; Amrite *et al.*, 2010).

As oclusões venosas são a segunda causa mais comum de doenças vasculares da retina, atrás apenas da retinopatia diabética. A obstrução venosa do ramo é definida como a oclusão focal de uma veia retiniana ao nível de um cruzamento arteriovenoso, onde a artéria passa anteriormente à veia (Marques, 2003).

É uma afecção quase sempre de início súbito, na qual o paciente apresenta visão borrada ou defeito de campo visual e hemorragias intraretinianas distribuídas setorialmente. Afeta indivíduos de ambos os sexos, sendo mais frequente entre 60 e 70 anos de idade (Marques, 2003).

Geralmente, as hemorragias intraretinianas são menos graves se a oclusão é incompleta. A localização da interrupção do fluxo venoso determina a distribuição das

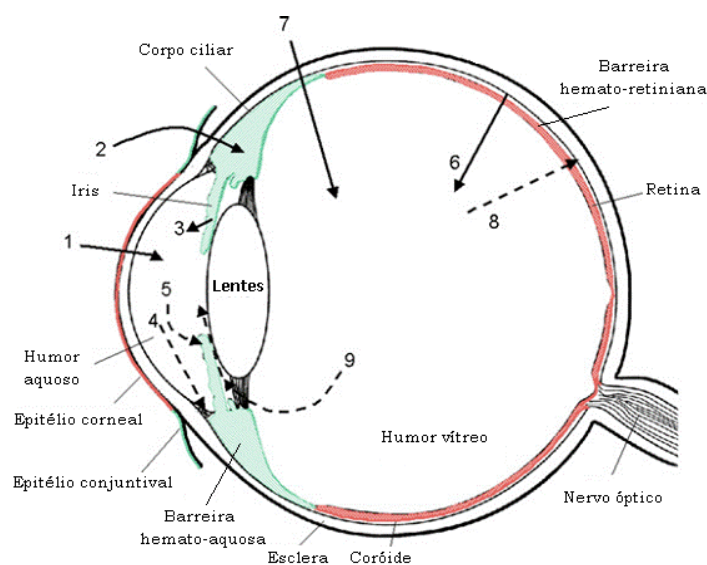
hemorragias intraretinianas. Se a obstrução está situada próxima ao disco óptico, dois quadrantes do fundo podem ser atingidos (oclusões hemisféricas); no entanto se a oclusão é mais periférica, um quadrante, ou menos, pode estar envolvido. Quando o bloqueio é periférico às veias tributárias que drenam a mácula, pode não haver diminuição da visão (Marques, 2003).

Desta forma, parece evidente que os fármacos anti-inflamatórios não esteróides inibidores de VEGF são alternativas terapêuticas viáveis no tratamento de RD, DMRI e OVR. No entanto, a grande maioria desses compostos terapêuticos possui solubilidade desprezível em água, além do que as administrações por via tópica e sistêmica não produzem os resultados esperados. Assim, a necessidade do desenvolvimento de estratégias tecnológicas para a administração do CEL parece ser evidente. Atualmente, há uma tendência bastante evidente para o desenvolvimento de sistemas de liberação minimamente invasíveis e com efeitos secundários limitados e controláveis (Paganelli *et al.*, 2010).

Além das novas abordagens tecnológicas há necessidade de agentes mais seguros. Desta forma, embora os corticosteróides sejam eficazes no tratamento da RD, eles podem causar catarata, pela elevação da pressão intraocular, que pode provocar o glaucoma (Carnahan e Goldstein, 2000). Assim sistemas de administração intra e periocular contendo CEL, podem representar alternativas eficazes e mais seguras para as terapias atualmente disponíveis.

As principais vias oculares de administração e de eliminação dos fármacos estão apresentadas na Figura 2:

Figura 2: Representação esquemática da estrutura ocular e suas funcionalidades.



Fonte: (Urtti, 2006)

Os números referem-se a: **1)** permeação de fármaco pela via transcorneal a partir do fluído lacrimal no interior do segmento anterior dos olhos; **2)** permeação do fármaco pela via não córnea através da conjuntiva e esclera no interior da úvea; **3)** distribuição do fármaco a partir da corrente circulatória via barreira hemato-aquosa no interior do segmento anterior dos olhos; **4)** eliminação do fármaco do segmento anterior dos olhos pelo humor aquoso para a malha de trabalho trabecular e canal de Sclemm's; **5)** eliminação do fármaco do humor aquoso para a circulação sistêmica através da barreira hemato-aquosa; **6)** distribuição do fármaco do segmento posterior dos olhos através da barreira hemato-retiniana; **7)** Administração intravítrea do fármaco; **8)** eliminação do fármaco do vítreo via rota posterior através da barreira hemato-retiniana; **9)** eliminação do fármaco do vítreo via rota anterior para o segmento posterior (Urtti, 2006; Lima-Filho *et al.*, 2013; Oliveira e Silva-Junior, 2016).

Uma barreira para o tratamento de doenças da retina é a eficácia da liberação de fármacos nos tecidos intraoculares, incluindo a própria retina. A via tópica é ineficaz porque os medicamentos de administração tópica não atingem o segmento posterior do olho e a via sistêmica está associada com a toxicidade devido a elevadas doses, necessárias para atingir níveis terapêuticos na retina (Palamoor e Jablonski, 2013).

Uma via alternativa, como a intravítrea, pode proporcionar níveis elevados de fármaco para o tratamento de doenças na retina e fornecer a concentração eficaz na em comparação com outras rotas (Palamoor e Jablonski, 2013).

A rota intravítrea de administração de fármacos tem ganhado importância para a liberação de fármacos na coroide, retina e vítreo. Tem sido demonstrado que a via intravítrea pode fornecer níveis terapêuticos eficazes para o tratamento da neovascularização coroidal associado com a degeneração macular relacionado à idade (Paganelli *et al.*, 2004; Amrite *et al.*, 2008; Paganelli *et al.*, 2009; Paganelli *et al.*, 2010).

A administração intravítrea envolve a administração direta de solução de fármaco/suspensão em humor vítreo via planar, através da barreira hemato-retiniana, usando uma agulha de 30-G. Em contraste com as rotas tópicas e sistêmicas, a injeção intravítrea produz altas concentrações de fármaco localmente disponíveis para o tecido ocular interno, incluindo a coroide e a retina (Kaur e Kakkar, 2014). Inoue e colaboradores fizeram a comparação de sub-Tenon e injeção intravítrea de acetato de triancinolona e observaram que a concentração do fármaco disponível no humor vítreo foi maior quando aplicado pela via intravítrea (Inoue *et al.*, 2004).

Biofármacos com massa molecular menor que 500 Da quando aplicados intravítreamente, no entanto, tendem a ser drenados do local de aplicação com uma

meia vida inferior a 3 dias, indicando uma necessidade de injeções regularmente. No entanto, o período que requer uma dose repetida pode ser de alguns dias a vários meses para anticorpos macromoleculares. Por exemplo, o número médio de injeções de bevacizumab (Avastin®; Roche) precisa ser administrada 3 vezes por ano para o tratamento da DMRI. Por outro lado, a frequência de dosagem recomendada de ranibizumab (Lucentis®; Genentech/Novartis) é uma vez por mês (0,5 mg; 50 µL) por um período mínimo de 9 meses (Rosenfeld *et al.*, 2006), enquanto o Macugen® (pagaptanib sódico; Pfizer) precisa ser injetado intravítrealmente em intervalos de 6 semanas durante pelo menos um ano (Kitagawa e Yuzawa, 2013).

No entanto, injeções intravítreas repetitivas, mesmo se amplamente espaçadas, estão invariavelmente associados a complicações, como a hemorragia vítrea, descolamento de retina, catarata e endoftalmite. A taxa de endoftalmite e descolamento de retina observados com injeção intravítrea é de 0,2% e 0,05%, respectivamente. Além disso, a adesão do paciente é menor com tais regimes devido ao doloroso e invasivo procedimento que requer hospitalização e médico especialmente treinado para administração, aumentando o custo, além do alto custo do medicamento por si (Kaur e Kakkar, 2014).

A escolha da melhor via de administração juntamente com a escolha do tipo de formulação que será administrada (nanopartícula, micropartícula, nano e microemulsões ou lipossomas) deve ser cuidadosamente selecionada.

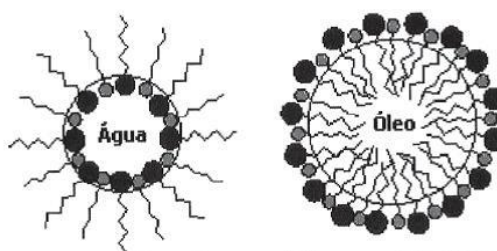
Quando não levamos em conta a via de administração mais adequada e não temos disponíveis novos sistemas de liberação de fármacos, tais como os lipossomas, nano e microemulsões, géis hidrofílicos, nano e micropartículas, faz-se o uso das formulações convencionais, estas não possuem habilidade de gerar o efeito terapêutico adequado ou podem causar efeitos indesejados ao paciente, devido à toxicidade potencial do medicamento, da frequência de administração ou pela necessidade de administrar doses elevadas para obter o resultado terapêutico pela via sistêmica.

A utilização de substâncias ativas pouco solúveis em água, é uma problema em formulações farmacêuticas líquidas. Na verdade, as formas farmacêuticas mais utilizadas em aplicações farmacêuticas são de natureza aquosa, o que limita a escolha das formulações disponíveis. Obviamente, a substância ativa é apresentada como uma solução ou dispersão aquosa quando é solúvel ou dispersível em água, respectivamente. Alternativamente, a substância ativa pode ser encapsulada em uma forma de administração, seja dissolvida no interior de uma partícula sólida ou incorporada em gotículas de um sistema emulsionado (Noomen *et al.*, 2008).

Neste cenário surge como forte candidata a formulação de nano- microemulsões às quais representam um aspecto importante em tecnologia farmacêutica, pelas implicações biológicas da presença destes sistemas em fórmulas farmacêuticas. Dessa forma, as nano- micremulsões podem aumentar a solubilidade aparente de fármacos lipofílicos, modificam o perfil de biodisponibilidade, modificam a estabilidade de grande número de compostos de uso terapêutico, etc. (Oliveira *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2004).

O termo microemulsão foi introduzido na década de 40 por Hoar e Schulman para definir um sistema fluído e semi-transparente obtido pela titulação até o ponto de clarificação de uma emulsão simples com um álcool de cadeia média, como o hexanol ou o pentanol. No ponto de clarificação não foi necessária agitação e uma dispersão transparente foi formada espontaneamente. Estes pesquisadores observaram, através de microscopia eletrônica, que as dispersões transparentes formadas eram constituídas de microgotículas de óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), cercadas por um filme interfacial misto de tensoativo e co-tensoativo (álcool) (Figura 3). O tamanho das gotículas variava de 100 a 600 nm, significativamente menores que os da emulsão simples inicial, justificando seu aspecto transparente e o termo microemulsão (Hoar e Schulman, 1943; Cunha-Júnior *et al.*, 2003).

Figura 3: Representação esquemática de nanoemulsão O/A e A/O, respectivamente.



Fonte: (Oliveira *et al.*, 2004).

Este termo foi revisado muitas vezes e a definição que melhor descreve o sistema contempla que “as microemulsões são dispersões coloidais líquidas, opticamente isotrópicas e termodinamicamente estáveis, compostas de água, óleo e tensoativo” (Danielson e Lindmann, 1981).

As microemulsões (MEs) são sistemas isotrópicos e transparentes compostos por dois líquidos imiscíveis geralmente água e óleo, estabilizados termodinamicamente pelo uso de tensoativos e co-tensoativos, localizados na interface óleo/água (Zana *et*

al., 1987; Constantinides, 1995; Oliveira *et al.*, 1997; Lawrence e Rees, 2000; Correa *et al.*, 2005; Formariz *et al.*, 2005; Formariz *et al.*, 2006; Silva, 2013). A orientação para sistemas O/A ou A/O é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo e da relação entre as proporções de tensoativo e co-tensoativo. Elas requerem a adição de quantidades elevadas de tensoativo para estabilizar a grande área interfacial criada pelos nanoglóbulos e a adição de co-tensoativo para garantir a diminuição da tensão interfacial para níveis suficientes para que o sistemas se forme espontaneamente (Constantinides, 1995; Oliveira *et al.*, 2004)

A estabilidade termodinâmica das microemulsões pode ser explicada devido ao fato de que quando um dos líquidos dividiu-se no interior do outro formou-se uma fase interna, dispersa ou descontínua, rodeada por uma fase externa, dispersante ou contínua. Assim, o processo de emulsificação implica num grande aumento de área interfacial a qual leva a um aumento brusco da energia livre de superfície (Oliveira *et al.*, 2004) que pode ser descrito pela Equação 1, na qual, γ representa a tensão interfacial entre as fases oleosa e aquosa e ΔS a diferença entre a área interfacial antes e após a formação do sistema.

$$\Delta G = \gamma \times \Delta S \quad \text{(Equação 1)}$$

Uma das teorias disponíveis para explicar a formação das microemulsões é originada do conceito da “Tensão Negativa Transiente na Interface”. A equação 1 mostra que ΔG varia diretamente com a área interfacial e que se, a tensão interfacial (γ) for transientemente negativa, ΔG será < 0 e haverá condições para a microemulsificação espontânea (Oliveira *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2009).

A principal característica das nanoemulsões (NEs) é formar uma emulsão muito fina, cujas dimensões das gotículas da fase interna é da ordem de nanômetros. As NEs são superiores às soluções micelares em termos de potencial de solubilização de substâncias, por isso, são usadas para aumentar a solubilização e a absorção de fármacos lipofílicos (Constantinides, 1995; Oliveira *et al.*, 1997; Formariz *et al.*, 2005; Silva, 2013; Singh *et al.*, 2017).

As nanoemulsões são definidas como formulações não estáveis termodinamicamente, com diâmetro de gotículas entre 200 e 500 nm, obtidas à custa do fornecimento de alta energia, o que as tornam translúcidas ou semi-transparentes, independentemente do método de preparação (Singh *et al.*, 2017).

Também são chamadas de miniemulsões, emulsões submicrônicas, emulsões ultrafinas ou emulsões finas dispersas. São compostas por óleo, tensoativos, co-tensoativos e água. Como são sistemas não totalmente estabilizados possuem a tendência natural de separação das fases. No entanto, elas possuem alta estabilidade cinética por longo período, ao contrário das microemulsões, que são estáveis termodinamicamente.

As nano e microemulsões são sistemas reservatórios, nos quais as gotículas da fase interna constituem microambientes dimensionalmente restritos, com propriedades particulares diferentes das propriedades da fase externa, podendo ligar ou associar moléculas com diferentes polaridades (Oliveira *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2009). Foi demonstrado na literatura que a liberação de substâncias ativas dissolvidas na fase interna da nano e microemulsão O/A é mais lenta em relação ao fármaco livre, mostrando a habilidade desse tipo de agregado como sistema reservatório que pode proporcionar efeito prolongado. Estudos com o anti-inflamatório não esteroide piroxicam utilizando microemulsões catiônicas demonstraram claramente esse fenômeno (Oliveira *et al.*, 2004).

A possibilidade de formar nano e microemulsões depende do balanço entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas do tensoativo, determinada não somente pela sua estrutura química, mas também por outros fatores como temperatura, força iônica e a presença de co-tensoativo. A mistura de tensoativos com equilíbrio hidrófilo-lipófilo adequado proporciona a condição máxima de solubilização do óleo e da água. Assim, a formação da nano e microemulsão geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como tensoativo, água, óleo e, quando necessário, o co-tensoativo sendo que a orientação para sistemas O/A ou A/O é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo e do óleo, da relação entre as proporções tensoativo/cotensoativo e entre as proporções água/óleo (Formariz *et al.*, 2005).

Os agentes tensoativos são substâncias caracterizadas pela presença de uma região polar e outra apolar em suas estruturas moleculares. Podem formar emulsões do tipo água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A), as quais são definidas pelo equilíbrio apresentado entre as regiões polar e apolar do emulsionante empregado, denominado tecnicamente de Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL). O EHL é numericamente representado em uma escala com valores que vão de zero a vinte, em função do tamanho da cadeia polar presente nas moléculas do emulsionante. As microemulsões podem ser de três tipos: O/A, A/O ou bicontínua (Figura 3). Geralmente, os sistemas do tipo O/A são formados na presença de baixa concentração de fase

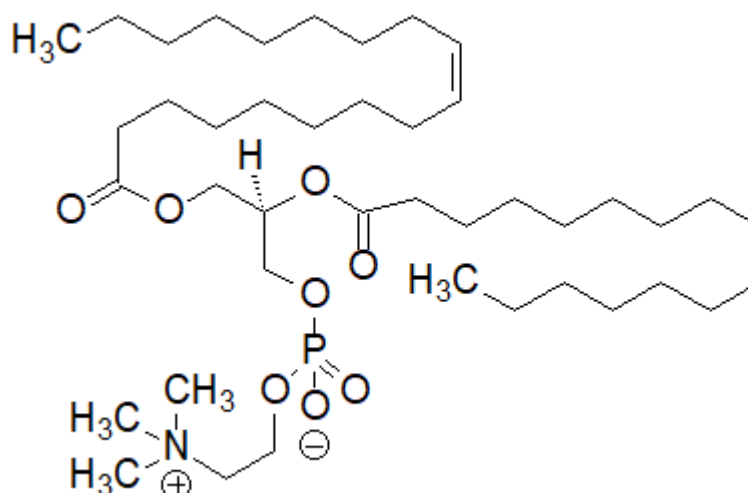
oleosa e com emulsionantes que apresentam equilíbrio hidrófilolipófilo (EHL) na faixa de 8-14; os do tipo A/O são formados quando a concentração de fase aquosa é baixa e com emulsionantes com EHL na faixa de 3-8; e, os do tipo bicontínuo se formam quando as concentrações de fase aquosa e fase oleosa são similares e tanto o óleo quanto à água existem como uma fase contínua (Cunha-Júnior *et al.*, 2003).

A fosfatidilcolina ou lecitina de soja foi utilizada como tensoativo nas formulações estudadas. A lecitina é muito utilizada como adjuvante farmacotécnico em comprimidos, preparações tópicas vaginal ou retal, suspensões, cápsulas, formulações intravenosas e intramusculares e preparações para uso inalatório (Rowe *et al.*, 2006; Silva, 2013).

A fosfatidilcolina de soja é um tensoativo natural que se difunde na interface óleo-água. Funcionalmente tem como característica ser emoliente, emulsificante e solubilizante. Pode ser utilizada em preparações farmacêuticas injetáveis (intramuscular e intravenosa), formulações para nutrição parenteral, produtos tópicos e alimentícios. O equilíbrio hidrófilo-lipófilo EHL da fosfatidilcolina de soja está na faixa de 3-4. Estas são facilmente oxidadas e por essa razão devem ser estocadas em frascos bem fechados e protegidos da luz, além disso, se decompõem em valores de pH extremos (Pal Kaur e Kanwar, 2002; Rowe *et al.*, 2006; Silva, 2013).

A fosfatidilcolina de soja (Figura 4) apresenta em sua estrutura duas longas cadeias carbônicas, o que explica sua hidrofobia. Mas também possui cabeça de polar constituída de grupo aniônico (fosfato) e catiônico (colina) conferindo característica zwitteriônica à molécula em pH neutro, explicando sua forte hidrofilia da cabeça polar. Apesar desse equilíbrio hidrofílico e lipofílico, a fosfatidilcolina de soja é lipofílica demais para conseguir formar espontaneamente a camada lipídica necessária, de tensão interfacial próxima de zero, para a formação de uma nano e microemulsão. Portanto, há a necessidade de um co-tensoativo, como álcoois de cadeia curta, para a formação das nano e microemulsões (Park *et al.*, 1999; Silva, 2013).

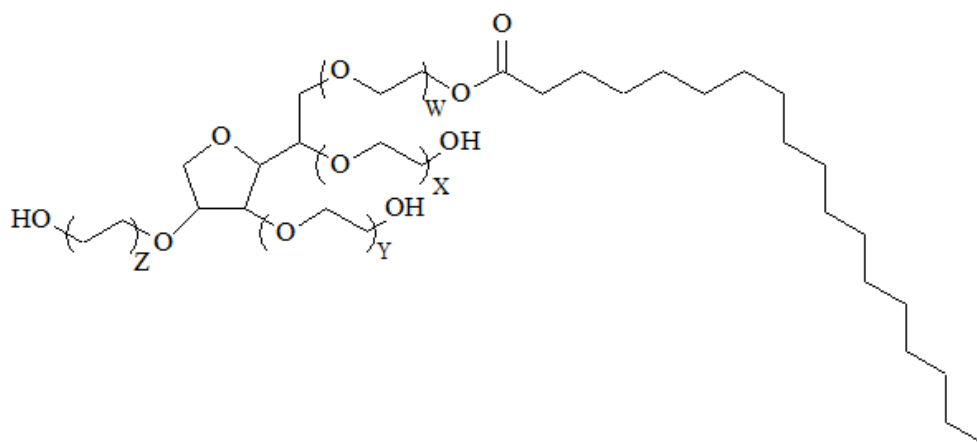
Figura 4: Estrutura química da fosfatidilcolina.



Os co-tensoativos são responsáveis pela redução adicional da tensão interfacial necessária para a formação e estabilidade termodinâmica das microemulsões, além de promoverem fluidificação do filme interfacial formado pelo tensoativo, impedindo na maioria das vezes a elevação da viscosidade do sistema obtido (Cunha-Júnior *et al.*, 2003).

Os principais co-tensoativos utilizados na preparação de nano e microemulsões são álcoois e glicóis de baixa massa molecular e que apresentam uma cadeia carbônica entre dois e dez carbonos. Uma avaliação criteriosa da toxicidade do co-tensoativo a ser empregado no preparo de uma nano e microemulsão é considerada de fundamental importância na elaboração de uma formulação desse tipo de sistema, tendo em vista que essas substâncias podem apresentar efeitos irritantes significativos, como por exemplo, os álcoois de baixa massa molecular (Cunha-Júnior *et al.*, 2003).

Assim, o co-tensoativo mais utilizado para estabilizar emulsões, nano e microemulsões é o polissorbato 20 ou Tween® 20 (Figura 5) um surfactante não iônico do tipo polissorbato formado pela etoxilação do sorbitano antes da adição do ácido láurico (Rowe *et al.*, 2006).

Figura 5: Estrutura química do polissorbato 20.

Além das características estruturais do sistema, o principal parâmetro de referência na preparação das nano- microemulsões está relacionado com a solubilidade do fármaco na fase oleosa.

Os óleos de elevada cadeia carbônica não permitem a obtenção de nano e microemulsões e aqueles de natureza menos apolar (triglicérides, principalmente) permitem a dissolução de maiores concentrações de fármacos lipossolúveis. Assim, entre os principais óleos estudados, destaca-se o triglicerídeo de cadeia longa (TCL) de origem vegetal, o triglicerídeo de cadeia média (TCM) que tem sido utilizado isolado ou em combinação com o TCL. O grau de pureza desses óleos deve ser elevado, no sentido de prevenir a ocorrência de irritação que pode ser provocada pelos contaminantes presentes em óleos com baixa pureza (Cunha-Júnior *et al.*, 2003).

Assim, a fase oleosa utilizada neste trabalho foi o Captex® 200 também conhecido como triglicerídeos de cadeia média ou TCM e é fabricado pela esterificação de ácidos graxos fracionados de óleo de coco (principalmente, caprílico e cáprico) e glicerina. É preparado a partir de matérias-primas de óleos vegetais de qualidade alimentar.

A literatura relata que na composição da fase aquosa pode ser necessária a adição de tampões e/ou agentes isotonizantes tendo como finalidade à obtenção e manutenção de um pH favorável garantindo assim, o efeito terapêutico e à estabilidade do fármaco (Cunha-Júnior *et al.*, 2003). Dessa maneira, utilizou-se como fase aquosa o tampão fosfato de potássio pH 7,2 uma vez que a nanoemulsão utilizada será administrada pela via intravítrea.

Na preparação das nano e microemulsões, devem ser construídos diagramas de fase pseudoternários para definir a extensão e a natureza das regiões de formação destes sistemas. Para isto, após a seleção dos constituintes da formulação, um

diagrama é construído, assumindo-se que as nano e microemulsões são sistemas formados por três componentes: fase aquosa, fase oleosa e uma mistura de emulsionantes (emulsionante/co-emulsionante), sendo que cada vértice do diagrama indica um destes componentes. Qualquer combinação dos constituintes pode ser representada como porcentagem no diagrama (Cunha-Júnior *et al.*, 2003). A partir desses dados, pode-se selecionar a região do diagrama de fases que mais convenientemente represente a condição mais apropriada para que o fármaco seja incorporado (Formariz *et al.*, 2005).

Os diagramas pseudoternários podem ser obtidos a partir de dados de titulação ou pela preparação de amplo número de amostras com diferentes proporções dos componentes. A vantagem do primeiro método é que este pode ser usado para estudar amplo número de amostras de diferentes composições de maneira rápida (Bhargava *et al.*, 1987; Lawrence e Rees, 2000). Normalmente, os sistemas nano e microemulsionados podem ser diferenciados visualmente dos outros sistemas, uma vez que os demais sistemas apresentam-se como emulsões líquidas opacas, emulsões géis opacas, representadas por sistemas de viscosidade elevada, ou com separação de fases. Já os sistemas nano e microemulsionados líquidos são caracterizados como sistemas semi-transparentes ou opticamente transparentes e os sistemas géis são caracterizados como cristais líquidos (Formariz *et al.*, 2005).

Contrária à facilidade de preparação, a caracterização das nano e microestruturas desses sistemas requer a aplicação de técnicas sofisticadas de análise, diferentes das utilizadas rotineiramente (Lawrence e Rees, 2000). Algumas propriedades físicas são de obtenção relativamente simples, em que se utilizam medidas de densidade, viscosidade e espalhamento de luz. Entretanto, para caracterização da natureza isotrópica, são utilizadas técnicas de microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), difração de raios-X e microscopia eletrônica, técnicas nem sempre disponíveis com facilidade (Cunha-Júnior *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS

O objetivo neste projeto foi desenvolver e caracterizar nanoemulsões biocompatíveis visando à administração intraocular do celecoxibe para doenças do segmento posterior dos olhos. Além disso, também foram estudados os parâmetros de liberação *in vitro* e a atividade anti-angiogênica *in vivo*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matérias-primas, reagentes e solventes

- Acetonitrila grau HPLC, J.T. Baker®, USA;
- Água deionizada em sistema Milli Q com condutividade $18,2\mu\text{S. cm}^{-1}$;
- Celecoxibe, Shanghai Moton Building Engineering Ltd, China;
- Diéster de ácido cáprico e caprílico com propilenoglicol (Captex® 200)

Abitec Corporation, USA;

- Dimetilsulfóxido P.A., Sigma-Aldrich®, USA;
- Fosfatidilcolina de soja (Epikuron® 200), Lucas Meyer, Alemanha;
- Fosfato de potássio bibásico anidro P.A, Labsynth Produtos para

Laboratórios Ltda, Brasil;

- Hidróxido de sódio, PA-ACS, Grupo Química Brasil, Brasil;
- Lauril sulfato de sódio, Synth, Brasil;
- Metanol grau HPLC, J. T. Baker®, USA;
- Metilcelulose, Sigma-Aldrich®, USA;
- Monolaurato de sorbitano etoxilado (Tween® 20), Aldrich Chemicals,

USA;

- Paraformaldeído, Sigma-Aldrich®, USA.

4.1.2 Equipamentos

- Agitador magnético modelo PC-351, Corning® Incorporated;
- Analisador de textura modelo XT Plus, Stable Micro Systems®;
- Balança digital modelo PA214P, Ohaus®;
- Centrífuga modelo Excelsa II 206-BL, Fanem®.
- Coluna cromatográfica C_{18} 250x4,6 mm, 5 μm , J.T. Baker®.
- Difrátômetro de raios-X modelo D-500, Siemens®;
- Filtros descartáveis para seringas, porosidade 0,22 μm , Corning®

Incorporated;

- Microscópio confocal modelo UV 510 META LSM, Zeiss®;
- Microscópio de luz polarizada modelo Carl Zeiss Axion 40, Zeiss®;

- Microscópio modelo SZX16, Olympus®;
- Peagâmetro modelo Q400AS, Quimis®;
- Reômetro modelo Carri-med CSL 100, TA® Instruments;
- Sistema automático com célula de difusão vertical do tipo Franz modelo Microette Plus, Hanson Research Coporation®;
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) modelo Flexar FX-20 LC com injetor manual e equipado com detector UV-Vis e DAD, Perkin Elmer®;
- Sistema de purificação de água modelo Milli - Q Plus, MILLIPORE®;
- Ultrassom de haste modelo XL2020, Sonicador® Ultrasonic Liquid Processor;
- Zetasizer modelo Nano ZS, Malvern® Instruments.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de CEL por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.2.1.1 Ensaios preliminares para determinação da concentração ideal de metanol:água

As amostras dos ensaios preliminares foram preparadas na concentração de 45 µg/mL de CEL utilizando a solução diluente de metanol:acetonitrila (60:40% v/v) e filtradas em filtros de membrana 0,22 µm.

Foi utilizado sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) modelo Flexar FX-20 LC com injetor manual e equipado com detector UV-Vis e DAD (Perkin Elmer®), operando a 252 nm e coluna de fase reversa C₁₈ 250 x 4,6 mm, 5 µm (J.T. Baker®).

A fase móvel foi constituída dos solventes acetonitrila, metanol e água deionizada. Foram realizados ensaios preliminares para determinar a melhor faixa de concentração dos solventes, uma vez que o CEL é hidrofóbico e mudanças na proporção dos solventes poderiam alterar o seu tempo de retenção e sua seletividade. Assim, fixou-se a quantidade de acetonitrila em 40% (Krishnaveni e Sathyannaryana, 2012) e variou a proporção de metanol:água conforme Tabela 1. O volume de injeção foi de 20 µL e a fluxo de 1,0 mL/min utilizando detector UV-Vis operando em comprimento de onda de 252 nm.

Tabela 1: Proporção dos solventes nos ensaios preliminares.

Metanol (% v/v)	Água (% v/v)
60	0
55	05
45	15
35	25
30	30
20	40
10	50

4.2.1.2 Planejamento fatorial com ponto central

O uso do planejamento fatorial com ponto central possibilita estudar os efeitos que causam maior influência nas repostas obtidas de um experimento e as interações com esses efeitos (Breitkreitz *et al.*, 2014).

Para a quantificação da influência de cada fator na resposta, planejamentos fatoriais completos em 2 níveis (2^k para k fatores estudados) são indicados; porém, se a resposta obtida não for linear, serão necessários adicionar novos níveis ao planejamento fatorial, permitindo cálculos dos coeficientes quadráticos (Teófilo e Ferreira, 2006).

Depois de realizado os ensaios preliminares e observada a melhor proporção metanol:água, foi realizado um planejamento fatorial com ponto central para otimizar a concentração dos solventes e o fluxo da fase móvel, a fim de melhorar o tempo de retenção e o sinal analítico. Foram feitos 10 experimentos em triplicata em 1 bloco com 2 réplicas no ponto central.

Dentre os planejamentos que podem ser empregados neste caso, o planejamento fatorial com ponto central (*central composite design*, CCD) é amplamente utilizado na otimização de sistemas cromatográficos. Os fatores e os níveis estão mostrados na Tabela 2. O software Statistica® 7.0 foi utilizado para a análise da variância dos resultados (ANOVA), na construção dos gráficos de superfícies de repostas e dos gráficos de Pareto.

Tabela 2: Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental.

Fatores	Níveis				
	- α	-1	0	1	α
Acetonitrila (% v/v)	20	30	40	50	60
Fluxo (mL/min)	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2

4.2.1.3 Validação da metodologia analítica

Através do planejamento experimental foi possível determinar uma concentração ótima dos solventes e uma taxa de fluxo de fase móvel ideal. Assim, prosseguiu-se com a validação da metodologia desenvolvida, que envolve testes de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, robustez e estabilidade de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA pela RDC 166, de 24 de julho de 2017 (Anvisa, 2017b). Para a análise estatística dos dados foram utilizados o suplemento de ferramentas de análise do Excel e o software Action Stat versão 3.

- **Seletividade**

Para avaliação da seletividade, soluções padrão de CEL na concentração de 45,0 $\mu\text{g/mL}$, preparadas com o mesmo diluente dos ensaios preliminares e soluções padrão de CEL na mesma concentração, que foram incorporadas à formulação, foram injetadas no sistema cromatográfico. A pureza cromatográfica dos picos referentes ao CEL foi determinada por meio de varreduras espectrais na região do UV (200-370 nm) usando detector de DAD, sendo possível estabelecer o índice de similaridade espectral. As soluções diluentes foram analisadas na ausência de CEL de modo a avaliar a eluição de possíveis interferentes no tempo de retenção do CEL.

- **Linearidade e faixa de trabalho**

A linearidade do método foi avaliada para demonstrar a relação de proporcionalidade entre a concentração das soluções padrão de CEL e a área dos picos. Para isso, preparou-se solução padrão estoque de CEL em metanol:acetonitrila (60:40 % v/v) na concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$ e diluições sucessivas foram realizadas de modo a obter soluções padrão nas concentrações de 05, 15, 25, 35, 45, 55 e 65 $\mu\text{g/mL}$. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo possível a determinação do coeficiente de correlação (r) que deve estar acima de 0,990 e da equação de reta $y =$

$ax + b$, em que a corresponde ao coeficiente angular (inclinação) e b representa o coeficiente linear (intercepto).

A faixa de trabalho deve ser estabelecida a partir dos estudos de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão, sendo dependentes da aplicação pretendida; no caso para análise de teor a faixa de trabalho deve ser de 80 a 120% da concentração teórica do teste.

- **Efeito matriz**

Para calcular o efeito matriz, foram utilizadas as curvas analíticas feitas em solvente e na matriz, no caso a matriz foi composta pelos excipientes da formulação.

O efeito matriz pode ser mensurado por meio da Equação 2 e o limite máximo de aceitação para o efeito matriz é de 20% (Feng *et al.*, 2015).

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \left(\frac{\text{Coeficiente angular na curva analítica no extrato da matriz} - 1}{\text{Coeficiente angular na curva analítica no solvente}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

- **Precisão intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (reprodutibilidade)**

A precisão intra e inter dias foi estabelecida como a dispersão das medidas ao redor do seu valor médio e expressa matematicamente pelo desvio padrão relativo (DPR), apresentado na Equação 3 obtidos através da análise de amostras de CEL em 3 níveis de concentrações (baixa: 05 ug/mL; média: 45 ug/mL e alta: 65 ug/mL), durante dois dias consecutivos (inter-dia) e em 3 replicatas em um mesmo dia (intra-dia). O DPR deve ser no máximo de 5% em todos os níveis de concentração.

$$\text{DPR} = (\text{Desvio padrão} / \text{média}) \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

- **Exatidão intra e inter-dia**

A exatidão do método analítico foi determinada usando três réplicas de soluções padrão de CEL nos níveis de concentrações de 05, 45 e 65 µg/mL. As análises foram realizadas em dois dias consecutivos. A exatidão intra e inter dias, apresentada como porcentagem de recuperação (E), foi calculada pela Equação 4, apresentada a seguir:

$$E = \frac{(\text{Concentração encontrada} - \text{Concentração teórica})}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Os valores aceitáveis da porcentagem de recuperação devem estar entre 98 e 102% em todos os níveis de concentração.

- **Limite de detecção (LD)**

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado; porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. No caso de CLAE pode ser determinado pela Equação 5:

$$LD = DP_{\alpha} \times 3 / IC \quad (\text{Equação 5})$$

Onde: DP_{α} é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração; IC é a inclinação da curva de calibração.

- **Limite de quantificação (LQ)**

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser expresso pela Equação 6:

$$LQ = DP_{\alpha} \times 10 / IC \quad (\text{Equação 6})$$

Onde: DP_{α} é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração; IC é a inclinação da curva de calibração.

- **Robustez**

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal e os valores aceitáveis de variação devem seguir o mesmo critério de aceitação da exatidão. No caso optou-se por alterar a temperatura de análise, o fluxo da fase móvel e o tamanho do poro da membrana de filtração das amostras.

- **Estabilidade**

A estabilidade do CEL na solução padrão na concentração de 45,0 µg/mL foi determinada mantendo a solução à temperatura ambiente. As análises foram

realizadas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas para quantificação do fármaco. Os ensaios foram realizados em triplicata. O valor inicial foi estabelecido como 100,0% e a variabilidade, a partir do resultado inicial, foi calculada a partir das determinações nos tempos seguintes. Aceita-se resultados entre 98 e 102% de recuperação da concentração teórica do teste.

4.2.2 Preparação dos sistemas estabilizados por fosfatidilcolina de soja e Tween®20

Os sistemas foram obtidos dissolvendo-se a fosfatidilcolina de soja (FS) em volumes previamente estabelecidos de fase oleosa (Captex® 200) e de co-tensoativo (Tween® 20, Tw). A fase aquosa (tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,2) foi adicionada, fracionada em volumes de 0,5 mL. Essa sequência de adição facilita a homogeneização da mistura, que foi submetida a ultrassom de haste, com potência 220 Watts, operando em modo descontínuo, por 20 minutos, com intervalos de 30 segundos a cada um minuto, à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 3800 rpm por 15 minutos, para eliminar resíduos de titânio liberados pela haste de ultrassom. A escolha da proporção entre os tensoativos foi baseada em trabalhos previamente desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa (Wargaftig, 2000; Pestana, 2009). A proporção de FS/ Tw foi mantida fixa em 1:1 para todos os experimentos.

A incorporação da CEL nos sistemas foi determinada pela adição do anti-inflamatório em excesso, diretamente à formulação previamente preparada e quantificação por CLAE.

Os ensaios utilizados para a caracterização dos sistemas foram: determinação do diâmetro médio das gotículas por espalhamento dinâmico de luz, determinação da viscosidade, comportamento reológico, microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), difração de raio-X, seringabilidade, liberação *in vitro* e testes de estabilidade do diâmetro médio da gotícula, índice de polidispersidade e Potencial Zeta.

4.2.3 Diagrama de fase para o sistema estabilizado por FS/Tw

A partir da mistura de tensoativo/co-tensoativo (FS/Tw) prepararam-se, em triplicata, formulações de 3 g com composição variando de 10 a 90% da mistura de tensoativos. A este sistema foi adicionado Captex®200, como fase oleosa, em concentrações decrescentes correspondentes de 90 a 10%. Cada formulação foi

titulada com fase aquosa e submetida a ultrassom por 20 minutos à temperatura ambiente.

As alterações ocorridas nos sistemas a cada alíquota de água adicionada foram analisadas visualmente.

Considerando as proporções dos componentes (sistema tensoativo, fase oleosa e fase aquosa) após titulação aquosa foi possível determinar os pontos em que se deu a transição de sistema opticamente transparente para sistema opaco ou ainda separação de fases no diagrama de fase.

A partir destes dados foram selecionados sistemas em função do volume das fases que foram utilizados para estudo das características físico-químicas.

4.2.4 Caracterização dos sistemas selecionados

4.2.4.1 Determinação do diâmetro médio da gotícula e Pdl por espalhamento dinâmico de luz

O diâmetro médio das gotículas da fase oleosa foi determinado por espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering - DLS*) juntamente com o índice de polidispersidade (*Polydispersity Index - Pdl*).

Prepararam-se 5 g de cada formulação previamente selecionadas não contendo o fármaco, que foram diluídas em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,2 em uma proporção de 200 µL de formulação para 4 mL de tampão fosfato pH 7,2 e, posteriormente, filtradas em filtro de acetato de celulose com tamanho de poro 0,45 µm e colocadas em cubetas de quartzo. As cubetas foram colocadas no equipamento Zetasizer modelo Nano ZS (Malvern® Instruments) de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda a sua extensão.

O mesmo procedimento de preparo de amostra foi realizado com as NEs contendo o fármaco no interior das gotículas de óleo da fase interna.

4.2.4.2 Potencial Zeta

Prepararam-se 5 g de cada formulação previamente selecionadas não contendo o fármaco, que foram diluídas em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,2 em uma proporção de 200 µL de formulação para 4 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,2 e, posteriormente, filtradas em filtro de acetato de celulose com tamanho de poro 0,45 µm e colocadas em cubetas de quartzo. As cubetas foram colocadas no equipamento

Zetasizer modelo Nano ZS (Malvern® Instruments) de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda a sua extensão.

O mesmo procedimento de preparo de amostra foi realizado com as NEs contendo o fármaco no interior das gotículas de óleo da fase interna.

4.2.4.3 Determinação da incorporação do CEL nas NEs

Fármaco em excesso foi adicionado às formulações previamente preparadas até que se observasse a formação de precipitado. As amostras foram submetidas a ultrassom de modo descontínuo por 20 minutos com pulso de 1 minuto a cada 20 segundos, à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugadas a 3800 rpm por 15 minutos para eliminar o excesso de fármaco não incorporado.

O sobrenadante foi diluído em metanol:acetonitrila (60:40 % v/v) e filtrado em filtro de membrana de acetato de celulose com tamanho de poro 0,45 µm, para posterior análise, conforme metodologia analítica desenvolvida.

4.2.4.3.1 Determinação das densidades das NEs

A densidade foi determinada pela pesagem de quantidades exatas de cada formulação utilizando-se pipetas volumétricas de 2 mL através da seguinte equação:

$$D = m / V \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

D = densidade;

m = massa;

V = volume.

4.2.4.3.2 Determinação do volume de fase

O volume de fase foi calculado através da Equação 8 com a finalidade de relacionar a incorporação do CEL em função do volume de fase do sistema.

$$\phi = 1 - (w \times \delta) \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

ϕ = volume de fase;

w = massa da fase externa;

δ = densidade da NE.

4.2.4.4 Análise reológica

Foram feitas leituras da varredura oscilatória para a determinação do G' e G'' , curva de fluxo no intervalo de 0 a 100 s⁻¹ para a curva ascendente e de 100 a 0 s⁻¹ para a curva descendente com duração de 2 minutos cada para determinar a tixotropia e leituras de fluência e relaxação por 10 minutos. Todas as análises foram feitas em triplicata à temperatura ambiente (25°C).

A quantidade de amostra utilizada foi de 1,2 mL de cada NE na presença e ausência do fármaco as quais foram colocadas sobre a placa de modo a preencher todo o espaço entre o cone e a placa. O equipamento utilizado foi o Reômetro modelo Carri-med CSL 100 (TA® Instruments) e o software para analisar os dados foi o Rheology Solutions (dados V1.1.7 da versão, TA® Instruments).

4.2.4.5 Seringabilidade

As NEs com e sem o fármaco foram preenchidas em seringa de plástico de 3 mL. Cada seringa foi colocada no suporte metálico e imobilizado com anel de fixação de plástico. Um transdutor de força foi conectado ao analisador de textura modelo XT Plus (Stable Micro Systems®) para medir a força com que o braço do analisador de textura é movido e empurra o êmbolo da seringa. A taxa de deslocamento foi de 2,0 mm/s. Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente.

4.2.4.6 Microscopia de luz polarizada

Uma gota de cada formulação selecionada foi colocada sobre uma lâmina de vidro e cobertas com lamínula e analisadas em microscópio de luz polarizada modelo Axion 40 (Zeiss®).

4.2.4.7 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

As medidas foram realizadas na estação de medidas SAXS-1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, que é equipado com um

monocromador ($\lambda = 1,608\text{\AA}$), uma câmara de ionização, um detector vertical e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento.

O espalhamento das partículas existentes no sistema foi subtraído da intensidade total do espalhamento. As intensidades de todos os espalhamentos das amostras foram medidas em unidades relativas mas, para uma comparação quantitativa, as medidas foram normalizadas nas mesmas condições experimentais.

4.2.4.8 Difração de raios-X

O grau de cristalinidade ou o estado amorfo das amostras foi analisado através da difração de raios-X. Os dados foram coletados em um difratômetro modelo D-500 (Siemens®) (Cu K α radiação, $\lambda = 1,541\text{ \AA}$), com um monocromador de grafite curvo, usando o método de contagem de passos (passo $0,05^\circ$ e tempo 0,1 segundo) em um intervalo de 2θ entre 4° e 70° . Foram feitas análises das formulações com e sem o fármaco e dos constituintes da formulação.

4.2.4.9 Estudos de estabilidade física das NEs

A estabilidade das NEs e das CEL-NE foram avaliadas em intervalos de tempos regulares (tempo zero, 5, 15, 20 30, 60 e 90 dias). As amostras foram analisadas em triplicata através do crescimento do diâmetro médio das gotículas das NEs, índice de polidispersidade e Potencial Zeta utilizando para isso o espalhamento dinâmico de luz.

As amostras foram armazenadas em geladeira, em embalagem de plástico e protegida da luz. Foi estabelecido como parâmetro de estabilidade um aumento de até 30% no diâmetro médio das gotículas e um Pdl abaixo de 0,30 para caracterizar a estabilidade do sistema. Para efeito de comparação e determinação se houve diferença significativa entre as leituras nos intervalos de tempo pré-determinados, foi realizada uma análise estatística utilizando o software GraphPad Prisma 5 com teste de one-way ANOVA e Tukey com valores de confiança de 95%.

4.2.5 Estudos de liberação *in vitro*

O ensaio de liberação *in vitro* foi realizado no equipamento de permeação com células de difusão verticais do tipo Franz modelo Microette Plus (Hanson Research Corporation®). O meio receptor foi determinado após avaliação da solubilidade do fármaco na solução receptora, garantindo a condição *sink* na fase receptora. A

condição sink é garantida quando a concentração do fármaco no meio for pelo menos 3 vezes menor do que a concentração de saturação, permitindo assim a difusão do fármaco sob um gradiente de concentração (Phillips *et al.*, 2012). Foi utilizado o tampão fosfato de sódio pH 7,2 contendo 0,15% de laurilsulfato de sódio. A liberação do fármaco foi avaliada utilizando-se membrana sintética de acetato de celulose 0,45 μm . As formulações foram colocadas até completar o copo dosador do equipamento (aproximadamente 300 μL e área de exposição de 1,77 cm^2).

Os experimentos foram conduzidos a 37,5°C e a solução receptora constantemente agitada a 300 rpm, por meio de um agitador magnético. Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas nos tempos de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 e 34 horas, filtradas em membrana 0,45 μm e injetadas em CLAE utilizando detector UV-Vis, operando com comprimento de onda de 252 nm, para quantificação do CEL. Um volume de 0,8 mL foi desprezado antes do início de cada coleta. As alíquotas da coleta e volume desprezados foram repostas automaticamente e utilizadas nos cálculos da quantidade real liberada. Os resultados foram colocados em gráficos para a definição do modelo de cinética adequado para cada formulação.

Foi utilizada, como controle, uma suspensão de CEL livre composta por tampão fosfato de potássio pH 7,2 e 30 mg de CEL.

Foi aplicado modelo matemático a partir dos gráficos de liberação para observar a cinética de liberação de cada formulação.

4.2.6 Estudos *in vivo* para avaliar a atividade anti-angiogênica do CEL utilizando o modelo animal peixe-zebra

Os estudos para a avaliação da atividade anti-angiogênica do CEL foram realizados no Laboratório de Farmacologia Ocular e Genética, sob supervisão do Prof. Dr. Breandán N. Kennedy, do Instituto Conway que está localizado na Escola de Ciências Biomédicas e Biomoleculares da University College Dublin (UCD) em Dublin, Irlanda. O Subcomitê de Ética em Pesquisa Animal (AREC) da University College Dublin considerou o protocolo para uso de larvas de peixe-zebra com 5 dias pós a fertilização (dpf) neste projeto, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal, manifestando-se favorável à sua execução, de acordo com os Protocolos AREC-13-26-Kennedy, AREC-14-68-Kennedy, AREC-14-69-Kennedy e AREC-E-18-08-Kennedy.

4.2.6.1 Ensaio dose-dependente

Para avaliar a atividade anti-angiogênica do CEL no crescimentos dos vasos sanguíneos da região intersegmental da larva foi utilizado o peixe-zebra (*Danio rerio*) transgênico Tg(fli1:EGFP), o qual expressa uma proteína verde fluorescente nos vasos sanguíneos sob o controle do gene promotor fli1. Os peixes foram mantidos de acordo com os procedimentos em um ciclo de 14 h claro/10 h escuro, a 28°C e alimentados com caldo de camarão de água salgada duas vezes ao dia (Matthews *et al.*, 2002). Embriões foram obtidos por fases naturais de desova e desenvolvimento estabelecido pelo tempo e critérios morfológicos. Em 0,6 hpf (horas pós fertilização), 5 embriões por poço foram colocados em 400 µL de meio de embrião/DMSO 1% e incubados com o fármaco a ser analisado em diferentes concentrações (0,1 a 15 µM) (Merrigan e Kennedy, 2017) e DMSO (veículo controle) a 28°C, em um ciclo de luz de 14 h/10 h ciclo escuro (Alvarez *et al.*, 2009). Após 2 dpf (dias pós fertilização) as larvas foram eutanasiadas com paraformaldeído (PFA) 4% em tampão fosfato de sódio e incubadas a 4°C, durante 2 horas, antes da análise.

Antes da análise da vasculatura intersegmental, as larvas foram rastreadas sob um microscópio modelo SZX16 (Olympus®) para observar malformações gerais. A padronização geral da barbatana, vasculatura intestinal e intersegmental foram examinadas (Alvarez *et al.*, 2009).

Após o procedimento anterior, as larvas foram fixadas em placas escavadas (placas de Kline) com metilcelulose 10% e manipuladas com uma agulha de tungstênio de 0,5 mm. Para analisar a fluorescência dos vasos inter-segmentais nas larvas foi utilizado um microscópio confocal modelo UV 510 META LSM (Zeiss®) para a quantificação dos vasos do tronco.

4.2.6.2 Quantificação dos vasos hialoides da retina

Para avaliar a inibição específica da angiogênese ocular, os embriões foram tratados a partir de 2 dpf até 5 dpf com DMSO (veículo controle) e com o fármaco de interesse livre e incorporado à NE. O tratamento foi feito com 400 µL de meio de embrião com 5 embriões por poço em placas de 48 poços. As larvas foram incubadas com o fármaco na concentração ideal, determinada através do procedimento descrito no item 4.2.6.1, a 28°C em um ciclo de 14 h de luz/ 10 h de escuro. Após este

procedimento, as larvas foram eutanasiadas com PFA 4% em tampão fosfato de sódio e mantidas a 4°C, por 2 horas, antes da análise (Galvin *et al.*, 2016).

A quantificação dos vasos primários hialoides seguiu o seguinte procedimento: para acessar a atividade da vasculatura hialoide, as lentes dos olhos do peixe-zebra foram dissecados com pinças e agulhas cirúrgicas e colocados em lâminas de microscópio com depressão contendo metilcelulose 10% e manipuladas com uma agulha de tungstênio de 0,5 mm (Alvarez *et al.*, 2009).

O plexo do vaso hialoide que envolve as lentes foi analisado por microscopia confocal utilizando um microscópio confocal modelo UV 510 META LSM (Zeiss®) e o número de ramos primários, irradiando do disco óptico, na parte de trás da lente, foi determinado em cada larva.

4.2.6.3 Ensaio do comportamento visual

A função visual foi analisada através do ensaio de resposta optocinética (OKR) (Brockhoff, 2006). Para realizar o OKR foram utilizados larvas tratadas a partir de 2 dpf até 5 dpf. O fármaco foi removido e as larvas foram lavadas com meio de embrião (Reynolds *et al.*, 2016) e fixadas em placas de Petri de 9 mm contendo meio de embrião/metilcelulose 9% e colocados dentro de um tambor listrado preto e branco (99% de contraste e 18° por listras). O tambor gira a 18 rpm por 30 segundos no sentido horário e no sentido anti-horário e o número de sacadas (movimentos voluntários mais rápidos dos olhos e são dirigidos a um novo estímulo que se apresente no campo visual) foram contabilizados (Alvarez *et al.*, 2009; Merrigan e Kennedy, 2017).

4.2.6.4 Ensaio de tempo-dependência do CEL

Para analisar se o fármaco inibirá a angiogênese da hialoide durante um período de desenvolvimento específico, as larvas a partir de 1dpf até 4 dpf foram tratadas por 24, 48, 72 e 96 horas e a vasculatura hialoide foi analisada em 5 dpf conforme metodologia descrita no item 4.2.6.2 (Alvarez *et al.*, 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DO CEL EM NEs POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

5.1.1 Ensaios preliminares para determinação das proporções ideais de metanol:água

A disponibilidade de metodologias analíticas com sensibilidade e especificidade adequadas é fundamental para a avaliação das características de incorporação do fármaco em uma formulação.

Nesse trabalho foi desenvolvida e validada uma metodologia rápida, simples, sensível e reprodutível para quantificar o CEL em NEs por CLAE.

Os resultados dos ensaios preliminares (Tabela 3), para determinar a melhor faixa de proporção dos solventes foram analisados de acordo com os cálculos dos parâmetros de adequação de sistemas cromatográficos (tempo de retenção, fator de retenção, número de pratos teóricos e assimetria dos picos) determinados de acordo com a Farmacopeia Americana (USP39-NF34, 2016).

Tabela 3: Resultados de adequação dos sistemas cromatográficos.

Metanol % (v/v)	Água % (v/v)	Tempo de retenção (min)	Fator de retenção (k')	Número de pratos teóricos (N)	Assimetria dos picos
60	0	2,664	0,3	9759	1,2
55	5	2,778	0,3	6291	0,7
45	15	3,290	0,6	4867	0,9
35	25	4,615	0,6	4333	0,9
30	30	5,895	1,8	4787	0,8
20	40	10,828	4,2	7585	1,0
10	50	22,333	9,8	10172	1,0

Nota: a concentração de acetonitrila foi mantida em 40% (v/v) para todas as corridas.

Assim, infere-se que a melhor proporção entre metanol e água é a condição de 20% de metanol e 40% de água, ou seja, 1:2, uma vez que o tempo de retenção nessa condição é ideal para um fármaco incorporado em uma nanoemulsão, que apresenta componentes oleosos em sua matriz que poderiam se ligar ao componente apolar da coluna C18 e eluir logo no início da corrida cromatográfica; outro ponto importante de ressaltar-se é em relação à lavagem da coluna para a próxima corrida, com o tempo de retenção do CEL mais longo, isso nos permite que uma quantidade de fase móvel satisfatória passe pela coluna arrastando qualquer possível componente oleoso da matriz que poderia interferir na análise do CEL caso ficasse retido na coluna. Além do

tempo de retenção estar adequado, a assimetria do pico está 1,0, o que indica ótima simetria do pico.

5.1.2 Gráficos de Pareto e de superfície de resposta

Para aperfeiçoar as condições do sistema cromatográfico, na quantificação do CEL incorporado nas NEs, um planejamento experimental com ponto central foi construído com base nos seguintes fatores: fase móvel e fluxo. Assim, na configuração da montagem do planejamento do fator relacionado à fase móvel, a composição da fase móvel foi expressa em percentual da proporção de metanol:água (1:2) em relação ao restante do percentual de acetonitrila.

O experimento foi realizado desta forma, pois não é possível variar as proporções dos três solventes neste tipo de planejamento uma vez que o modelo só admite os três solventes como sendo somente um fator (composição da fase móvel). A acetonitrila foi escolhida para ser mantida na proporção média de 40%, simbolizando o ponto central do experimento, porque modificações neste solvente pioram as resoluções dos picos cromatográficos (Krishnaveni e Sathyannaryana, 2012). Assim, apenas as proporções de metanol e água foram variadas complementarmente à quantidade de acetonitrila que se altera conforme os níveis de variação da Tabela 2. A tabela 4 mostra as condições de cada corrida do experimento.

Tabela 4: Composição do planejamento experimental.

Experimento	Acetonitrila % (v/v)	Metanol % (v/v)	Água % (v/v)	Fluxo (mL/min)
Preliminar	40	20	40	1,0
1	30	23	47	0,9
2	30	23	47	1,1
3	50	17	33	0,9
4	50	17	33	1,1
5	40	20	40	1,0
6	20	27	53	1,0
7	60	13	27	1,0
8	40	20	40	0,8
9	40	20	40	1,2
10	40	20	40	1,0

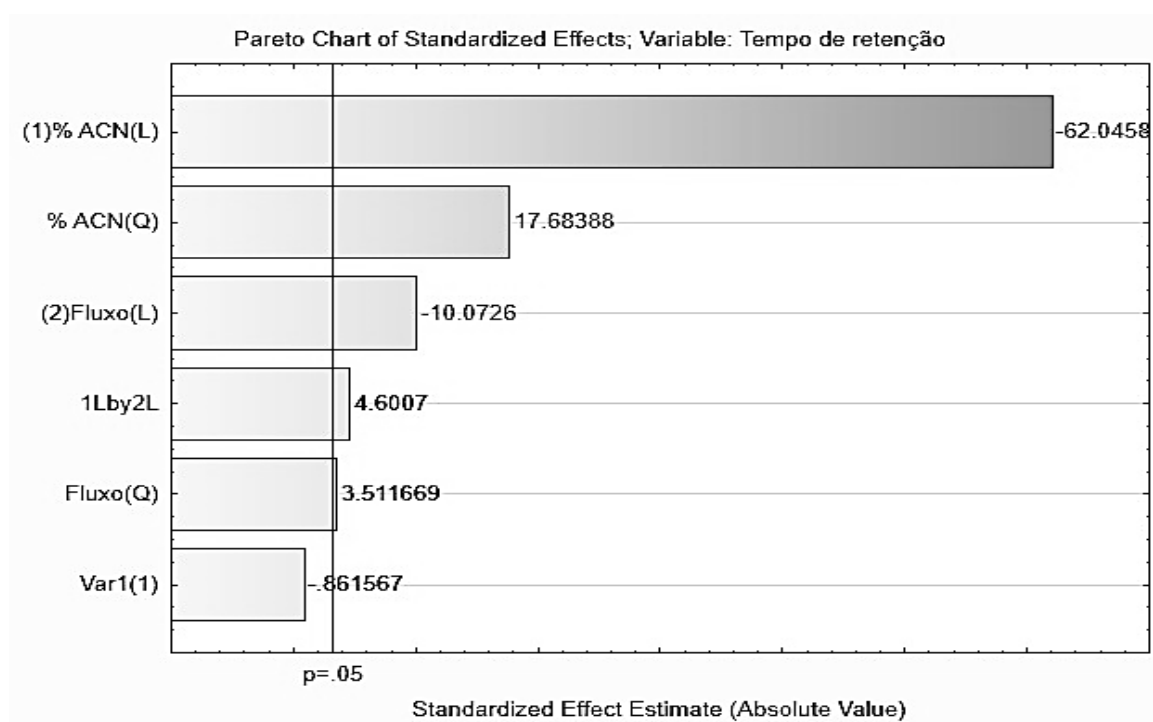
As repostas consideradas para a construção dos gráficos foram o tempo de retenção e o fator de encaudamento do pico. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados experimentais do planejamento fatorial.

Experimento	Tempo de retenção	Fator de encaudamento
Preliminar	10,828	1,000
1	28,003	1,010
2	23,177	0,820
3	6,696	0,750
4	5,467	0,690
5	9,826	0,720
6	24,720	0,520
7	4,325	0,730
8	12,400	0,660
9	8,810	0,720
10	9,936	0,740

Os resultados descritos na Tabela 5 podem ser vistos através do gráfico de Pareto (Figura 6).

Para o tempo de retenção, os fatores estudados foram significantes para a regressão linear e para a regressão quadrática. Isso significa que todos os fatores afetam os resultados dos experimentos. As interações entre os fatores são significativas, mas seus efeitos estimados são menores do que os efeitos estimados do próprio fator, o que se deve, provavelmente, à alta significância obtida para os fatores individuais.

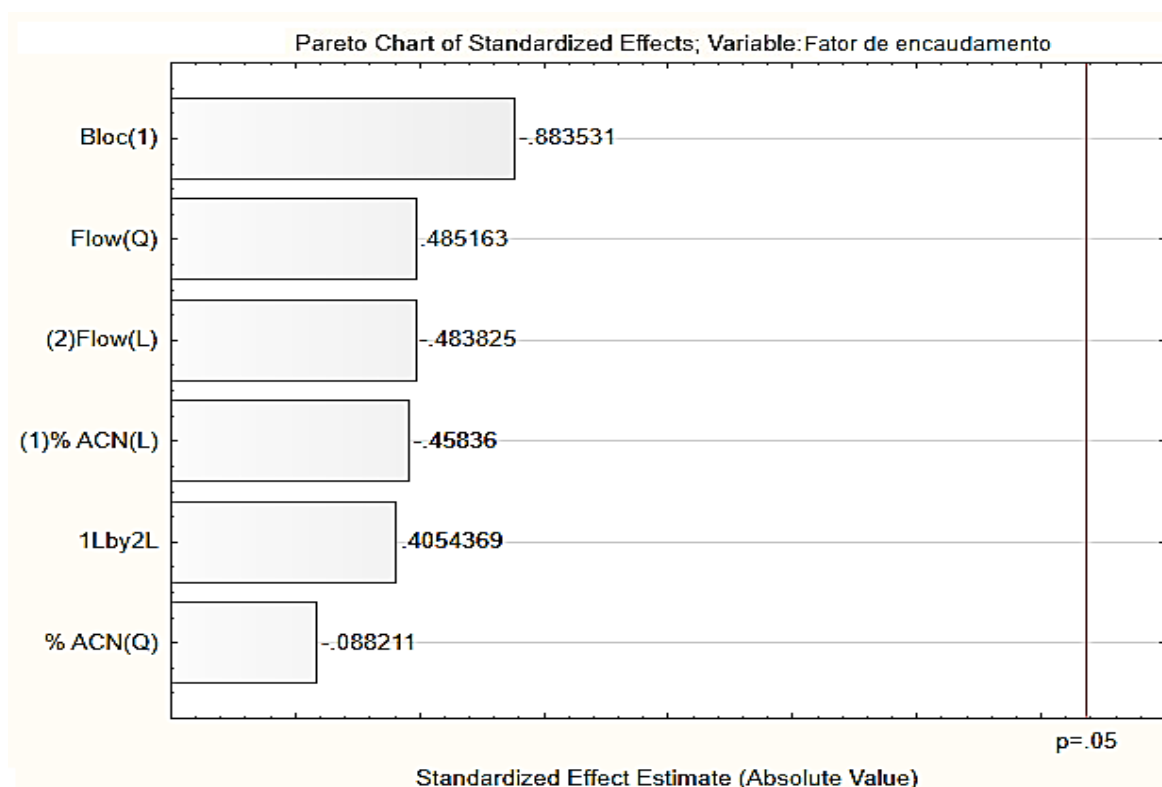
Figura 6: Gráfico de Pareto para o tempo de retenção.

Para o fator de encaudamento, todos os fatores estudados foram insignificantes para a regressão linear e para a regressão quadrática. Isso significa que todos os

fatores não afetam os resultados dos experimentos. As interações entre os fatores não são significativas.

Os resultados descritos na Tabela 5 para encaudamento podem ser vistos através do gráfico de Pareto (Figura 7).

Figura 7: Gráfico de Pareto para o fator de encaudamento.



As informações dos gráficos de superfície de resposta nas Figuras 8 e 9, mostram que os melhores parâmetros para o sistema cromatográfico são as condições onde a proporção de acetonitrila é aproximadamente 40% e o fluxo é de 1,0 mL/min pois, nesses valores, tem-se um tempo de retenção 10 min ótimo e com um fator de encaudamento menor que 0,7.

Figura 8: Gráfico de superfície de resposta descrevendo as melhores condições para o tempo de retenção.

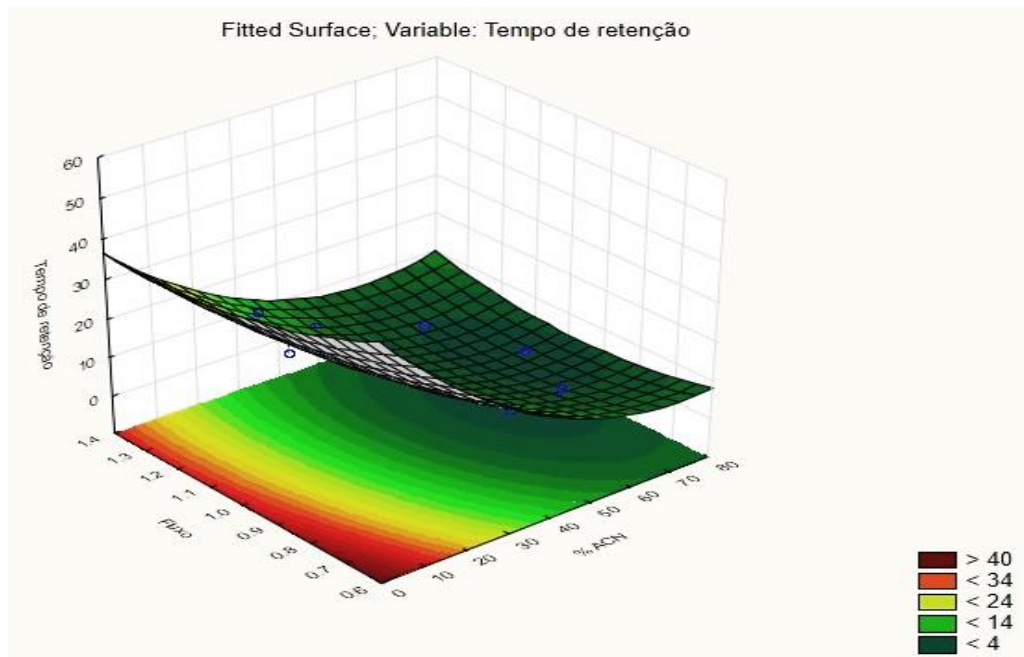
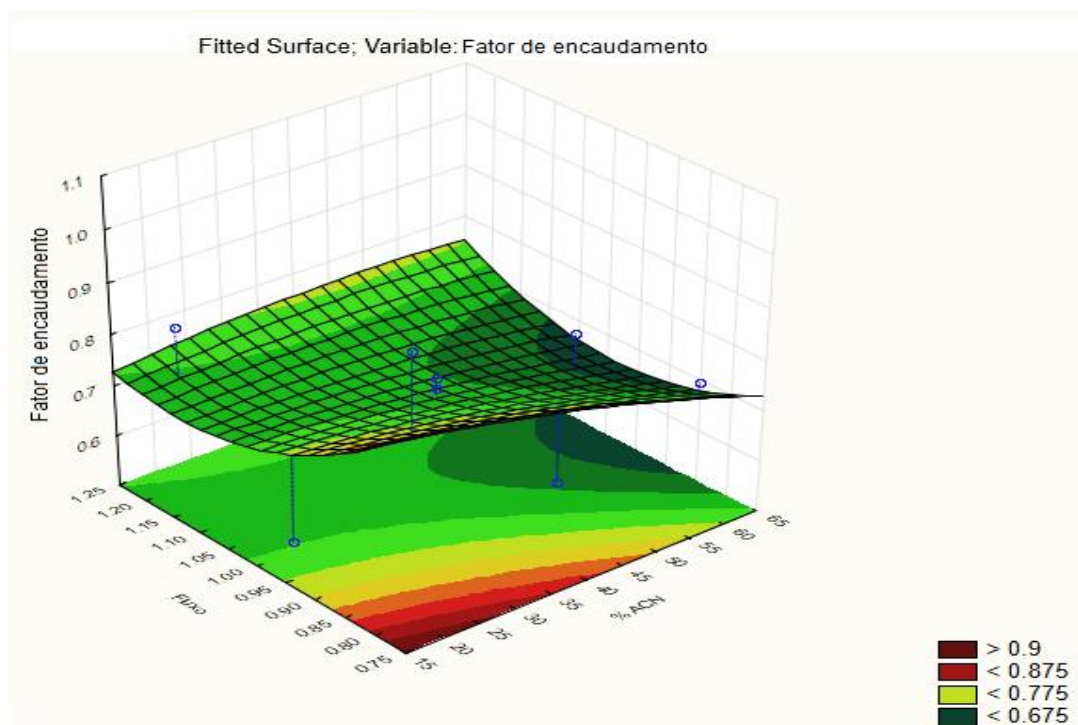


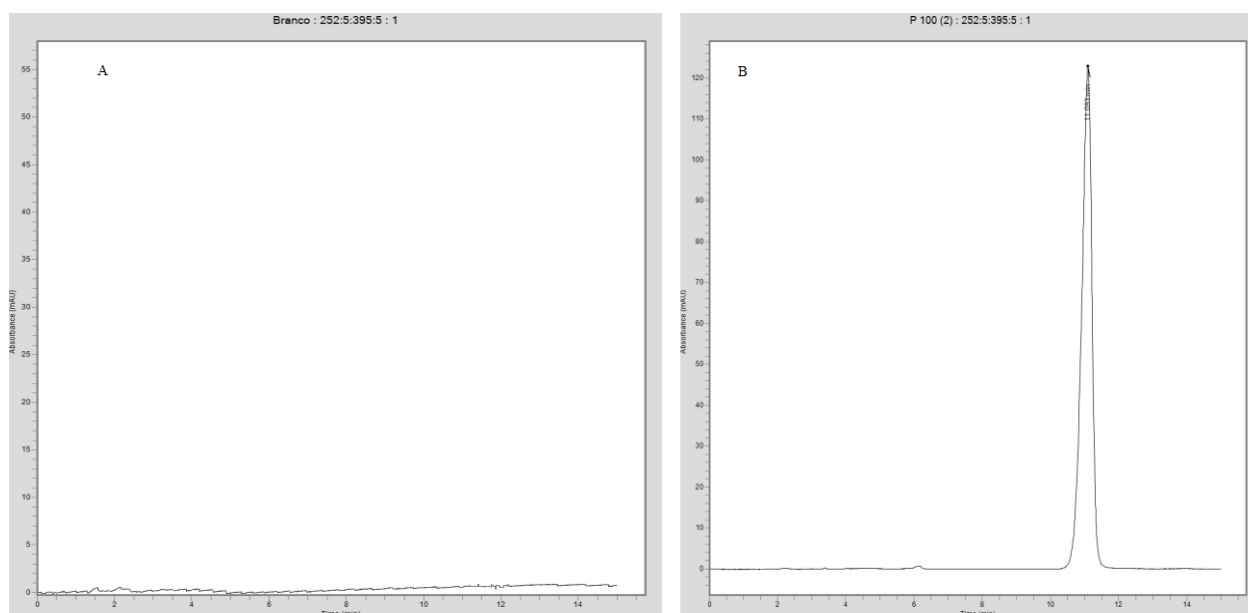
Figura 9: Gráfico de superfície de resposta descrevendo as melhores condições para o fator de encaudamento.



5.1.3 Parâmetros de validação

De acordo com o estudo de seletividade, picos de interferentes não foram detectados, no mesmo tempo de retenção do CEL, nas amostras de branco ou incorporadas na formulação. Na Figura 10, estão apresentados os cromatogramas de solução padrão de CEL incorporadas na concentração de 45,0 µg/mL e o seu respectivo branco.

Figura 10: Cromatogramas do branco (A) e da amostra de CEL na concentração de 45,0 µg/mL incorporada à NE (B).



A pureza cromatográfica do pico de CEL foi determinada pelo índice de similaridade espectral. O índice de similaridade foi estabelecido comparando a amostra de CEL incorporada à formulação. O resultado indicou um índice de similaridade de 100,0 % e foi considerado satisfatório. A pureza cromatográfica é um indicativo de que não ocorre a eluição de interferentes no mesmo tempo de retenção do pico principal.

O efeito matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou aumento do sinal ou resposta instrumental (Anvisa, 2017b).

Conforme a Equação 2, descrita no item 4.2.1.3, o efeito matriz foi 0,244%, o que indica que não há interferência dos excipientes na quantificação do analito, visto que o valor de aceitação para o efeito matriz é de 20%.

A linearidade compreende a correlação entre a resposta do método e a concentração ou quantidade de analito, cujo comportamento deve ser descrito por uma

equação linear. É citada como a habilidade do método analítico de produzir resultados que são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito dentro de uma faixa especificada (Inmetro, 2010).

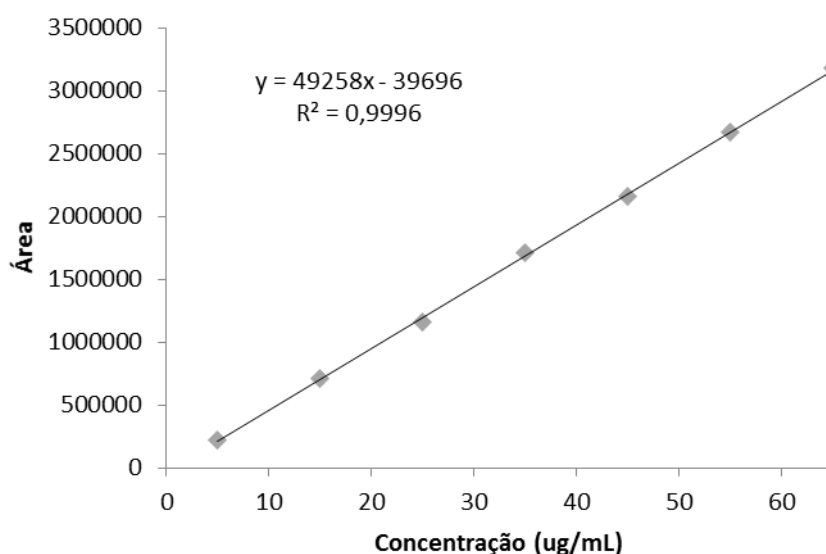
Os coeficientes são calculados empregando o método dos mínimos quadrados o qual estabelece a reta de regressão que permite obter os coeficientes lineares (a) e angulares (b). Também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r) ou de determinação (r^2), os quais permitem uma estimativa da qualidade do ajuste da curva obtida pois, quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Anvisa, 2017b).

Conforme o guia da ANVISA nº10 de 2017, antes de qualquer avaliação estatística propriamente dita, é importante fazer uma análise visual para observar se os pontos, quando dispostos no gráfico, têm relação linear aparente (Anvisa, 2017a).

Para a análise da linearidade, obteve-se o gráfico das áreas em função da concentração do analito e a equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados (Figura 11).

A equação de reta e o r^2 obtidos foram de, respectivamente, $y = 49258x - 39696$ e 0,9996.

Figura 11: Curva analítica de CEL por CLAE.



Após a confirmação da linearidade da curva analítica, tanto visualmente quanto através do r^2 , foi necessária a avaliação das variâncias (teste de hipóteses). Neste

caso, se analisa a homocedasticidade das variâncias constantes dos erros na construção da curva analítica.

O método recomendado para a estimativa da equação é o método dos mínimos quadrados (MMQ). Este método pode ter um fator de ponderação, sendo então denominado método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) ou pode ser aplicado diretamente, sem fator de ponderação, sendo então denominado método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). O MMQO também pode ser entendido como um caso particular do MMQP no qual o fator de ponderação é igual a 1. Para a escolha do método a ser utilizado, deve-se considerar a variância dos resultados de y para cada valor de x . Se a variância de y for constante (situação denominada homocedasticidade), pode-se utilizar o MMQO. Caso sejam observadas alterações de variância de y (situação denominada heterocedasticidade) é recomendável que se utilize o MMQP, pois a utilização do MMQO poderá gerar resultados tendenciosos (Anvisa, 2017b; a).

Para avaliação da homocedasticidade foi utilizado o Teste de Cochran, onde o teste de hipóteses segue com: H_0 (variâncias dos níveis são iguais) e H_1 (pelo menos uma variância é diferente).

O resultado pode ser visto na Tabela 16. Como o P-valor (0,0806) é maior que 0,05 e o valor estatístico (0,5247) é menor do que 0,616 (valor C tabelado) não rejeitamos a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%. Logo, o modelo é homocedástico.

Tabela 6: Resultados do Teste de Cochran para a avaliação da homocedasticidade.

Estatística	GL	P-valor
0,5247	3	0,0806

Outro fator importante é o cálculo do teste F de significância da regressão linear, sendo que o valor do F crítico deve ser menor que o de F calculado, o que indica a significância da regressão.

Para avaliar a significância do coeficiente angular do modelo utilizamos o teste F da ANOVA. Neste caso, testamos as seguintes hipóteses: H_0 (coeficiente angular igual a zero) e H_1 (coeficiente angular diferente de zero).

Os resultados estão apresentados na Tabela 7. Como o P-valor ($4,3027 \times 10^{-26}$) do teste F da ANOVA é menor que 0,05 e os valores estatísticos são maiores do que 6,12

(valor F tabelado) considera-se o coeficiente angular diferente de zero ao nível de significância de 5%.

Tabela 7: Resultados da ANOVA para a avaliação da significância do coeficiente angular.

	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	1	$2,03517 \times 10^{13}$	$2,03517 \times 10^{13}$	7406,2848	$4,3027 \times 10^{-26}$
Resíduos	19	52209955801	2747892411		

Outro critério para testar a linearidade do método é que o valor de b deve estar próximo de zero e, caso haja um valor significativamente diferente de zero, deve ser demonstrado que não há nenhum efeito sobre a precisão do método (Harris, 2012).

Para avaliar o intercepto (coeficiente linear) utiliza-se o teste t de Student. Neste caso, as seguintes hipóteses foram testadas: H0 (intercepto igual a zero) e H1 (intercepto diferente de zero).

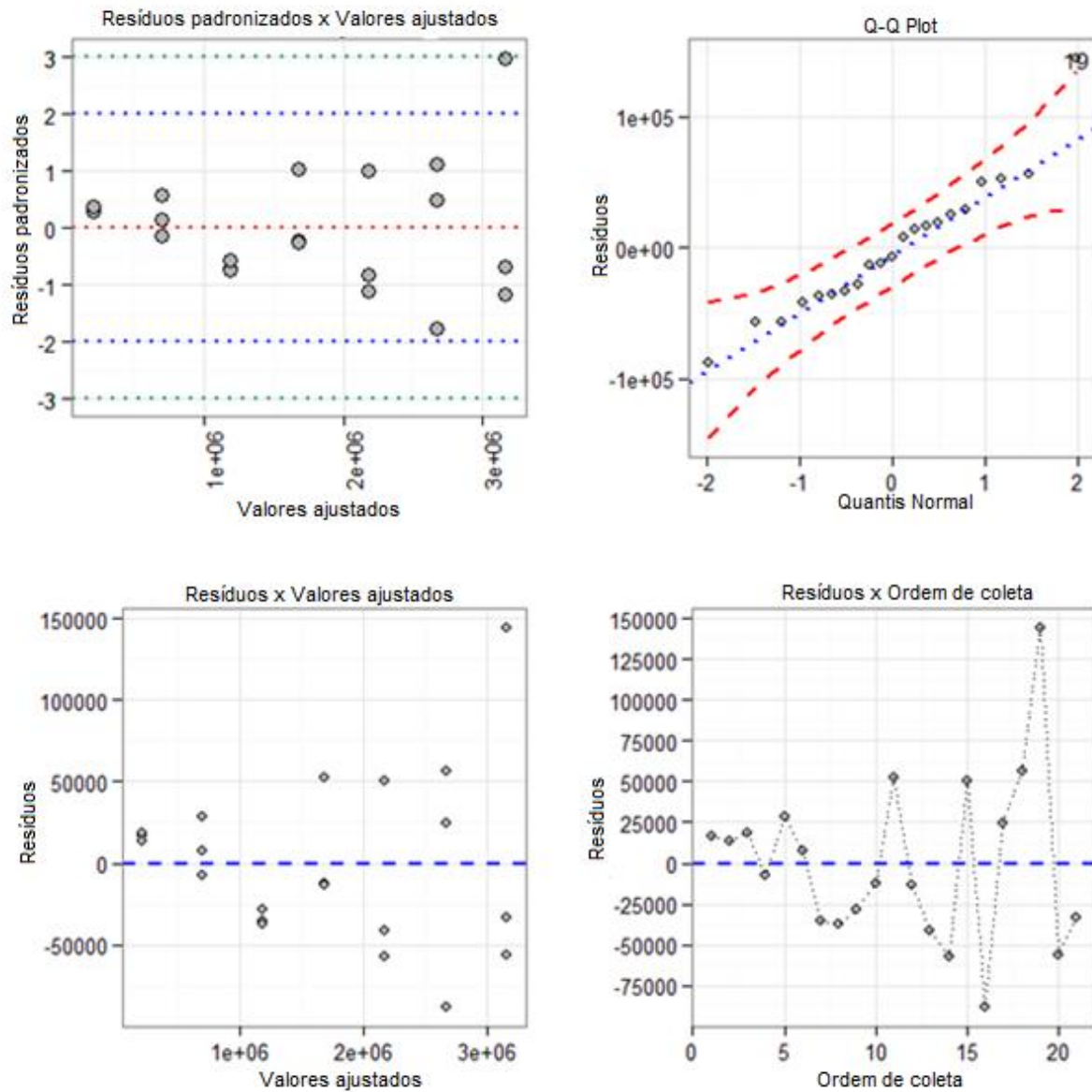
Através dos resultados da Tabela 8, pode-se notar que como o P-valor (0,0999) do teste t são maiores que 0,05 e os valores estatísticos de T são menores que 4,30 (valor tabelado), o intercepto é considerado igual a zero ao nível de significância de 5%.

Tabela 8: Resultados da ANOVA para a avaliação da significância do coeficiente linear.

	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	-39874,8619	23056,156	-1,7294	0,0999
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	49222,1323	571,953		

Já a análise do gráfico dos resíduos permite detectar problemas no ajuste da curva como, por exemplo, desvios de linearidade, heterocedasticidade, pontos anômalos, parâmetros utilizados para investigar a adequabilidade de um modelo de regressão linear, onde as suposições do modelo ajustado precisam ser validadas para que os resultados sejam confiáveis (Ribeiro *et al.*, 2008).

Os gráficos para avaliação visual (Figura 12) devem incluir a distribuição de todos os resíduos em função da concentração e da resposta, preferencialmente com uma linha reta no valor de média e outras duas linhas delimitando os valores esperados. Os valores fora da faixa esperada são considerados *outliers* (valores aberrantes) e pode-se utilizar o teste de Grubbs para estimar esses valores. Neste caso, é importante investigar se existe alguma causa analítica para esses valores aberrantes e se, mesmo com esses valores, os dados ainda podem ser utilizados (Anvisa, 2017a).

Figura 12: Análise gráfica dos resíduos.

Para a verificação da normalidade foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk conforme as hipóteses abaixo e os valores estão apresentados na Tabela 9:

H0: a distribuição dos resíduos é Normal;

H1: a distribuição dos resíduos não é Normal.

Tabela 9: Resultados do teste de Shapiro-Wilk para a avaliação da normalidade.

Estatística w.	P-valor
0,9455	0,2800

Como o P-valor (0,2800) no teste de Shapiro-Wilk é maior que 0,05 e os resultados baseados na estatística W são maiores do que 0,908 (valor tabelado), pode-se inferir que os resíduos possuem normalidade ao nível de significância de 5%.

Para a detecção de *outliers* foram avaliados os resíduos padronizados como pode ser observado na Tabela 10. Como critério, foram considerados valores extremos na resposta, as observações com resíduos padronizados maiores que 3.

Tabela 10: Resumo da análise dos resíduos.

N.Obs	Concentração (µg/mL)	Resíduos	Resíduos Padronizados
1	5	16249,62048	0,337173806
2	5	13491,97048	0,279953556
3	5	18220,89048	0,378076953
4	15	-7716,012381	-0,154748305
5	15	28552,17762	0,572627527
6	15	7477,457619	0,149963975
7	25	-35479,93524	-0,697925479
8	25	-37227,28524	-0,732297585
9	25	-28605,38524	-0,562696270
10	35	-12232,17810	-0,239110464
11	35	52332,85190	1,022984821
12	35	-13115,59810	-0,256379259
13	45	-41696,47095	-0,820210896
14	45	-57116,91095	-1,123546229
15	45	50202,57905	0,987534470
16	55	-88094,22381	-1,766771634
17	55	24366,12619	0,488674271
18	55	55901,89619	1,121139165
19	65	143888,15330	2,985627658
20	65	-56475,76667	-1,171851935
21	65	-32923,95667	-0,683160311

A avaliação da independência das observações através do teste de hipóteses de Durbin-Watson pode ser observado na Figura 12 no Gráfico Resíduos x Ordem de Coleta e na Tabela 11, onde: H0 (observações são independentes) e H1 (observações não são independentes).

Tabela 11: Resultados do teste de Durbin- Watson para a avaliação da independência.

Estatística dw	P-valor
2,0472	0,4468

Como o P-valor (0,4468) do teste de Durbin-Watson é maior que 0,05 e os valores estatísticos de DW são maiores do que 1,5 (valor tabelado), o resíduo possui independência das observações ao nível de significância de 5%.

Em resumo a todos esses resultados estatísticos (Tabela 12), a curva analítica apresentou homocedasticidade através do método de Cochram, ou seja, os dados regredidos apresentam variância constante.

O modelo dos mínimos quadrados utilizado foi considerado linear, pois apresentou coeficiente de correlação $> 0,990$, o y intercepto se apresentou estatisticamente igual a 0, ou seja, pode ser utilizada calibração de ponto único para a quantificação.

A avaliação da significância do coeficiente angular foi feita através do teste F, a avaliação da independência dos resíduos foi realizada pelo teste de Durbin-Watson e avaliação da normalidade dos resíduos através do teste de Shapiro-Wilk inferindo que os resíduos apresentaram distribuição normal e independência.

Também foi avaliada a detecção de *outliers* dos resíduos através do teste de Grubbs, onde não foi detectado nenhum valor aberrante.

Tabela 12: Resumo dos resultados estatísticos obtidos no parâmetro linearidade da validação analítica.

Parâmetro	Valores tabelados	Valores calculados
Homocedasticidade	$< 0,616$	0,5247
Coeficiente de correlação (r)	$> 0,990$	0,9997
Coeficiente de determinação (r^2)	-	0,9996
Significância do coeficiente angular	$> 6,120$	7406,2848
Avaliação do coeficiente linear (intercepto)	$< 4,30$	-1,7294
Normalidade dos resíduos	$> 0,908$	0,9455
Independência dos resíduos	$> 1,500$	2,0472
Avaliação de <i>outliers</i>	$< 3,000$	Não há <i>outliers</i>

Os resultados de exatidão e precisão da metodologia analítica estão apresentados nas Tabelas 13, 14, 15 e 16. Os resultados foram considerados satisfatórios conforme a finalidade dos estudos.

O teste de precisão foi realizado em dias diferentes, ou seja, repetibilidade e precisão intermediária e foram preparadas as amostras em três níveis de concentração diferentes, onde a amostra foi quantificada através de uma curva analítica utilizando os pontos 5, 15, 25, 35, 45, 55 e 65 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 13: Resultados obtidos na determinação da precisão inter-dia do método analítico para a quantificação do CEL.

Níveis	Concentração (µg/mL)	Área do pico	Média	DPR (%)
Nível baixo	5,0	223487,760	223649,316	0,420
		224872,210		
		222587,980		
Nível médio	45,0	2152821,600	2169121,903	0,818
		2160742,780		
		2193801,330		
Nível alto	65,0	3163584,350	3155466,173	0,617
		3128616,740		
		3174197,430		

Tabela 14: Resultados obtidos na determinação da precisão intra-dia do método analítico para a quantificação do CEL.

Níveis	Concentração (µg/mL)	Área do pico	Média	DPR (%)
Nível baixo	5,0	222177,960	222406	0,155
		222145,870		
		222894,370		
Nível médio	45,0	2167754,980	2156024	0,694
		2134887,860		
		2165429,430		
Nível alto	65,0	3185227,850	3166513	0,887
		3126784,870		
		3187527,210		

A avaliação da exatidão foi realizada em 3 (três) concentrações diferentes: 5, 45 e 65 µg/mL. O preparo foi idêntico ao teste de efeito de matriz. Para a quantificação, foi utilizada a equação da reta da linearidade, pois ambos os testes foram realizados no mesmo dia, ou seja, utilizou-se a equação $y = 49258x - 39696$. A Equação 4 foi utilizada para o cálculo da recuperação.

Tabela 15: Resultados obtidos na determinação da exatidão inter-dia do método analítico para a quantificação do CEL.

Níveis	Concentração (ug/mL)	Área do pico	Média	DPR (%)	Concentração (real)	Recuperação (%)
Nível baixo	5,0	210802,360	212190,926	0,465	5,113	102,272
		213013,670				
		212756,750				
Nível médio	45,0	2182141,130	2175028,197	0,598	44,962	99,915
		2156780,760				
		2186162,700				
Nível alto	65,0	3175775,210	3158816,950	0,962	64,934	99,898
		3184564,310				
		3116111,330				

Tabela 16: Resultados obtidos na determinação da exatidão intra-dia do método analítico para a quantificação do CEL.

Níveis	Concentração (ug/mL)	Área do pico	Média	DPR (%)	Concentração (real)	Recuperação (%)
Nível baixo	5,0	213678,740	212602	0,377	5,122	102,439
		212376,830				
		211752,090				
Nível médio	45,0	2187316,020	2169495	0,824	44,849	99,665
		2145038,430				
		2176129,820				
Nível alto	65,0	3162945,120	3149801	0,630	64,751	99,616
		3164710,650				
		3121745,850				

Os valores aceitos pela RDC 166 da ANVISA, que trata sobre validação de métodos analíticos, os ensaios de precisão e exatidão devem apresentar DPR menores que 5% (Anvisa, 2017b), e os valores encontrados para este método respeitam os limites aceitáveis.

Os valores de exatidão preconizados pela mesma resolução da ANVISA nos permite resultados de quantificação na faixa de porcentagem de recuperação de 98 a 102%, e os valores encontrados para este método são de acordo com a RDC.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados conforme as Equações 5 e 6 a partir do desvio padrão do y (intercepto da reta) que foi realizada em triplicata. Os resultados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Resultados do limite de detecção e quantificação.

Equação da reta	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
y = 49258x - 39696	1,404	4,681
y = 49138x - 35466		
y = 49153x - 36421		

Assim, o limite de detecção foi de 1,404 µg/mL e o limite de quantificação foi de 4,681 µg/mL para o celecoxibe.

Os resultados do teste de robustez do método estão indicados na Tabela 18, na qual se pode observar que o método é capaz de suportar pequenas modificações, sem alterar o resultado final.

Tabela 18: Resultados obtidos para a determinação da robustez do método.

Modificações	Concentração (ug/mL)	Área dos picos	Média	DPR (%)	Concentração (real)	Recuperação (%)
Fluxo	45,0	2108640,030	2136314,457	2,076	44,176	98,168
		2101409,850				
		2198893,490				
		2183720,840				
Temperatura	45,0	2102835,830	2133050,137	1,690	44,109	98,021
		2112593,740				
		2193626,330				
		2109376,250				
Filtro	45,0	2163449,223	2163449,223	1,771	44,726	99,392
		2187345,090				

A determinação da estabilidade é um estudo importante para demonstrar que não ocorrem degradações químicas da molécula do ativo durante os ensaios de validação da metodologia. Pode-se considerar que de acordo com os resultados apresentados na Tabela 19, o CEL permaneceu estável por até 96 horas na solução padrão. Geralmente se aceita que resultados entre 98 e 102% de recuperação são indicativos de que não ocorrem alterações significativas relacionadas à degradação química do fármaco (Anvisa, 2017b).

Tabela 19: Estabilidade do CEL no meio diluente.

Tempos	Concentração (ug/mL)	Área dos picos	Média	DPR (%)	Concentração (real)	Recuperação (%)
24 hs	45,0	2166729,450	2137829	1,041	44,206	98,236
		2134208,650				
		2112548,870				
48 hs	45,0	2145298,480	2133781	0,412	44,124	98,054
		2132095,360				
		2123950,410				
72 hs	45,0	2153890,460	2137595	0,555	44,201	98,226
		2125937,400				
		2132956,340				
96 hs	45,0	2123905,900	2134125	0,377	44,131	98,069
		2143562,890				
		2134905,400				

5.2 DIAGRAMA DE FASES

Os diagramas de fase pseudo-ternários, os quais descrevem em que condições experimentais os componentes devem ser combinados para formar preparações opticamente semi-transparentes, é de extrema relevância para a caracterização dos sistemas nanoemulsionados (Oliveira *et al.*, 2004).

Os tensoativos usados neste trabalho foram selecionados de estudos prévios com várias proporções FS/Tw na composição das NEs, que resultaram em diferentes valores de EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo) (Wargaftig, 2000; Pestana, 2009). O EHL descreve a atração simultânea da mistura de tensoativos pela fase oleosa e aquosa. Esta condição favorece a diminuição da energia livre do sistema. Quando FS e Tw são incorporados numa combinação de óleo e sistema tampão, as moléculas de tensoativo devem estar localizadas na interface óleo-água, o que é termodinamicamente favorável à estabilização do sistema. A proporção FS/Tw 1:1 (p/p) foi estabelecida a fim de se obter um valor de EHL que resultasse num sistema transparente utilizando Captex®200 como fase oleosa (Wargaftig, 2000; Pestana, 2009).

Os sistemas selecionados estão detalhados na Tabela 20 e representados na Figura 13. Estes sistemas foram selecionados no diagrama de fases pseudo-ternário na ausência de CEL e contendo 30 mg/mL do fármaco. Os pontos estão contidos na região caracterizada como líquido semi-transparente a transparente pois, partindo do aspecto visual, poderia ser uma região de nanoemulsão.

Nesta região, particularmente de interesse para as nanoemulsões, os sistemas foram selecionados visando obter dispersões óleo-em-água. Embora o diagrama de

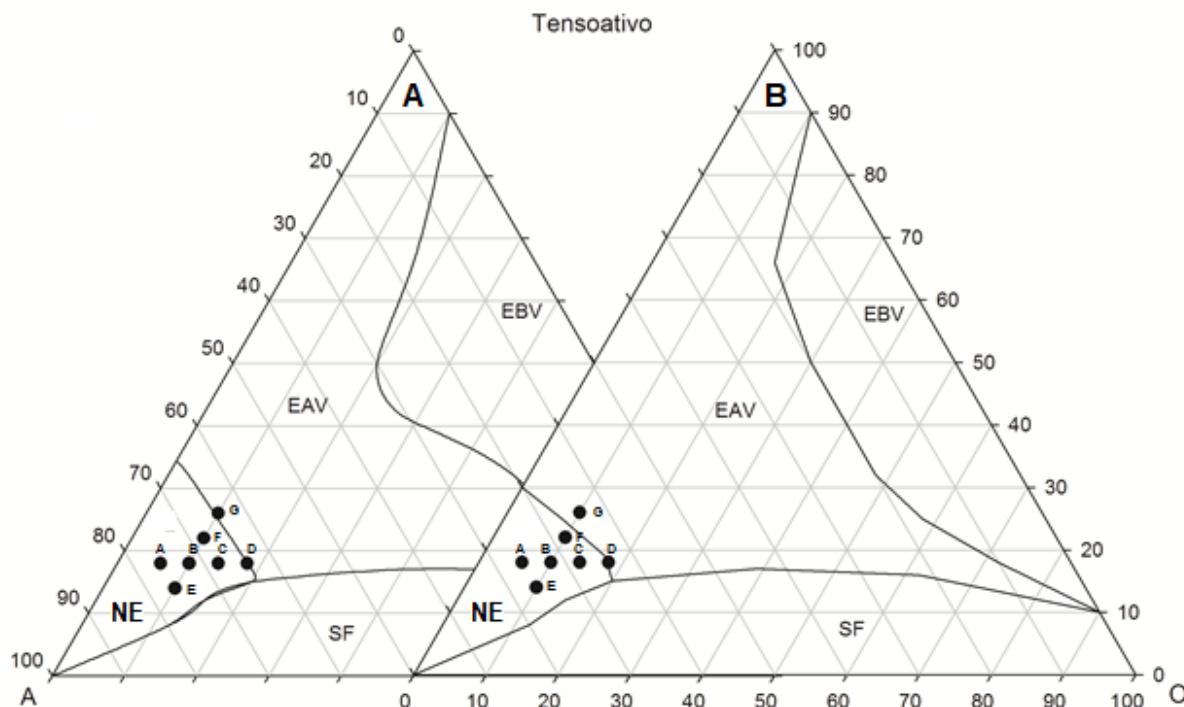
fases esteja ilustrado apenas com a intenção de descrever a região utilizada neste estudo, os resultados obtidos são muito interessantes e demonstram que as NEs existem em condições de diluição infinita com fase aquosa.

Tabela 20: Composição das NEs selecionadas para a sequência de trabalho.

NEs	Fase aquosa (%)	Fase oleosa (%)	Tensoativo (%)	O/T
A	76	6	18	0,33
B	72	10	18	0,56
C	68	14	18	0,78
D	64	18	18	1,00
E	76	10	14	0,71
F	68	10	22	0,45
G	64	10	26	0,38

Os pontos da Figura 13 representam as formulações A, B, C, D, E, F e G que apresentam diferentes proporções na razão óleo/tensoativo (O/T).

Figura 13: Diagrama de fases pseudo-ternário de sistemas contendo FS/Tw (Tensoativo), Captex® (Fase Oleosa) e sistema tampão (Fase Aquosa). Legenda: **(A)** Diagrama de fases dos sistemas na ausência de CEL; **(B)** Diagrama de fases dos sistemas contendo 30 mg/mL de CEL; **(NE)** Sistema nanoemulsionado; **(EAV)** Emulsão de alta viscosidade; **(EBV)** Emulsão da baixa viscosidade; **(SF)** Separação de fases. Os pontos marcados de A a G representam as composições da NEs utilizadas neste estudo.



Os dados do diagrama de fases (Figura 13) mostram que é possível verificou-se regiões transparentes no diagrama de fases dentro dos limites de 20% de fase oleosa e

acima de cerca de 65% de fase aquosa, sendo que, fora desses apresentaram-se opacos, apresentando regiões de transição para as emulsões convencionais.

Transições distintas de EAV para NE puderam ser observadas. Na ausência de CEL (Diagrama A) a área de domínio de NE foi pouco maior do que na presença do fármaco. Na presença de CEL (Diagrama B), a área de domínio de NE iniciou-se a partir de aproximadamente 70% de fase aquosa.

Sistemas nanoemulsionados convergem para o vértice dos diagramas de fases pseudo-ternários, nos quais predominam as fases aquosas, denotando sistemas em que a fase oleosa encontra-se dispersa na fase aquosa. A região restante dos diagramas de fases representados por sistemas opacos envolve emulsões convencionais de alta e de baixa viscosidades. Na presença de CEL (Diagrama B), a região de domínio EAV predomina sobre a região de EBV, o que deixa evidente que a presença do fármaco altera a viscosidade aparente do sistema, como mostram os estudos reológicos. Além disso, de acordo com os resultados de SAXS, a presença de CEL proporciona maior grau de ordenação do sistema, o que também favorece a alteração na viscosidade aparente do sistema.

A presença de sistemas emulsionados com alta viscosidade, em altas proporções de tensoativo e pequenas proporções de fases aquosa e oleosa, muito pode ser atribuída às propriedades gelificantes da fosfatidilcolina de soja a qual, devido à sua alta hidrofobicidade (EHL próximo de 4), é capaz de gelificar na presença de pequenas proporções de água (Cornell *et al.*, 1986; Trotta, 1999; Trotta *et al.*, 2002).

Entretanto, dependendo da proporção de tensoativo, o aumento da razão O/A claramente conduz à diminuição da viscosidade aparente dos sistemas emulsionados, passando por uma região de transição em direção a sistemas emulsionados de baixa viscosidade, principalmente em proporções de fase oleosa acima de 20%.

Considerando que a região de sistemas emulsionados de baixa viscosidade encontram-se principalmente na região de domínio da fase oleosa, podemos racionalizar que a variação da razão O/A nos diagramas de fase, claramente mostra a indução da inversão das fases dos sistemas emulsionados, passando de sistema O/A, em baixas proporções de fase oleosa para sistemas A/O em mais altas proporções, até o limite de aproximadamente de 90% de fase oleosa (Figura 13).

As NEs marcadas nos diagrama apresentam diferentes proporções de fase oleosa, fase aquosa e tensoativos, sendo selecionadas para a sequência do estudo e caracterizadas físico-quimicamente, com o objetivo de avaliar o efeito da variação da

proporção de tensoativo e de fase oleosa e, ainda, como estas variações interferem na organização estrutural dos sistemas.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NES

5.3.1 Análise do diâmetro médio das gotículas e Pdl por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O espalhamento dinâmico de luz é amplamente utilizado na caracterização de partículas, gotículas e moléculas dispersas ou dissolvidas num líquido. O movimento browniano das partículas ou moléculas em dispersão espalha a luz laser com intensidades diferentes. A análise das flutuações de intensidade num determinado ângulo vai determinar a velocidade do movimento browniano e, dessa forma, o diâmetro efetivo das partículas pode ser determinado através da equação de Stokes-Einstein (Formariz *et al.*, 2005).

O diâmetro das gotículas é um importante parâmetro na caracterização dos sistemas dispersos líquido-líquido pois, através dele, podemos determinar o tipo de formulação, como por exemplo, uma microemulsão farmacêutica, que tem diâmetro médio de gotículas de até cerca de 200 nm, nanoemulsões apresentam diâmetro na faixa entre 200 – 500 nm e as emulsões comuns com diâmetro em torno de 1000 nm (Aulton e Taylor, 2005).

O diâmetro das gotículas foi verificado através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dymanic Light Scattering-DSL*). Todas as formulações foram diluídas antes da análise, pois quando o sistema é concentrado e/ou polidisperso pode haver interações inter-gotículas e, assim, o número de gotículas por unidade de volume pode interferir na leitura levando a erros experimentais no tamanho das gotículas e no índice de polidispersidade (Lawrence e Rees, 2000).

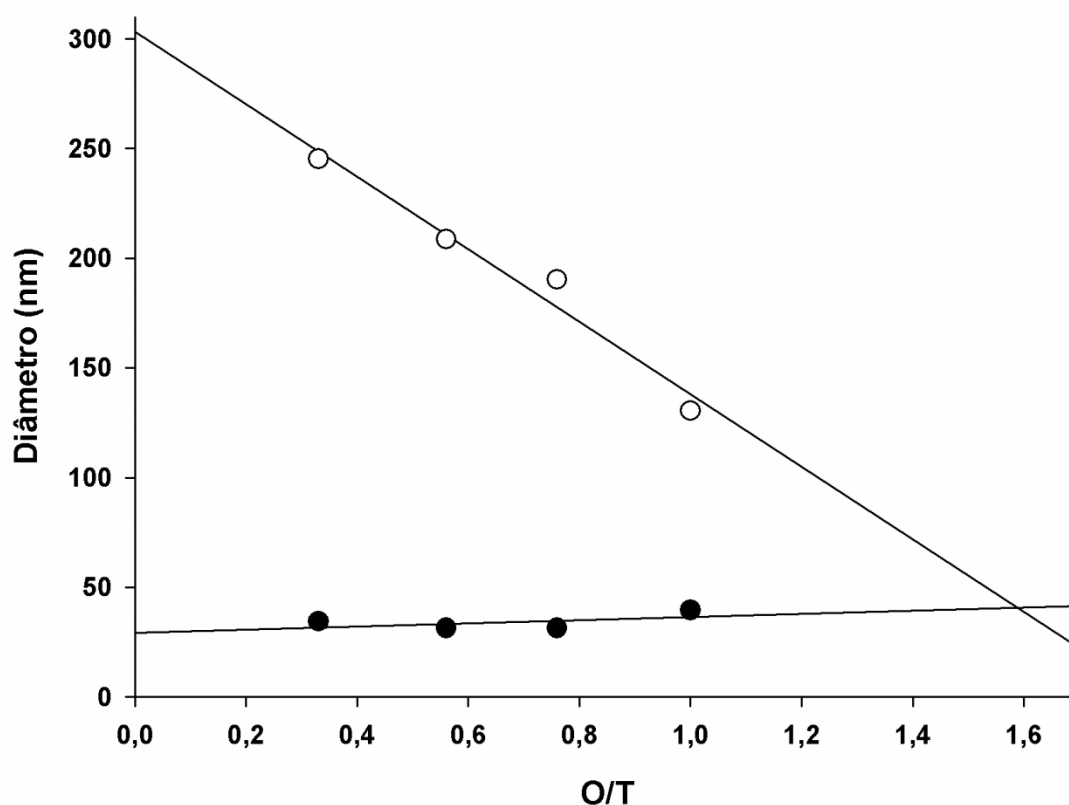
Os valores obtidos do diâmetro médio das gotículas e do Pdl estão na Tabela 21.

Tabela 21: Diâmetro das gotículas e índice de polidispersidade (Pdl) das NEs com variação da razão O/T na ausência e presença de 30 mg/mL de CEL.

NEs	O/T	Diâmetro médio das gotículas (nm)		Pdl	
		Ausência de	Presença de	Ausência de	Presença de
		CEL	CEL	CEL	CEL
A	0,33	34,35	245,30	0,225	0,741
B	0,56	31,37	208,70	0,186	0,442
C	0,78	31,35	190,30	0,125	0,188
D	1,00	39,50	130,40	0,212	0,281

Na Figura 14 estão representados os resultados que mostram a variação entre o diâmetro médio das gotículas em relação ao aumento da razão O/T nas NEs na ausência e na presença do celecoxibe.

Figura 14: Variação do diâmetro médio das gotículas em função do aumento da razão O/T. Legendas: (●) Nanoemulsão na ausência de CEL; (○) Nanoemulsão na presença de 30 mg/mL de CEL.



Os resultados da Figura 14 mostram que, na ausência de CEL, o aumento da razão O/T não provoca modificações significativas nos diâmetros das gotículas. Houve um pequeno aumento nos diâmetros médios das gotículas da ordem de 8 nanômetros

quando a razão O/T passou de 0,33 para 1, indicando uma pequena tendência de estresse físico do sistema pelo aumento da proporção de fase oleosa no sistema.

Os resultados da Tabela 21 e Figura 14, mostram que em baixa razão O/T (0,33) houve um aumento acentuado no diâmetro das gotículas provocado pela presença de CEL. De fato, a análise dos dados mostra que, na condição de mínima razão O/T (0,33), houve um crescimento no diâmetro das gotículas pelo fator aproximado de 8 vezes pela presença de CEL nas NEs.

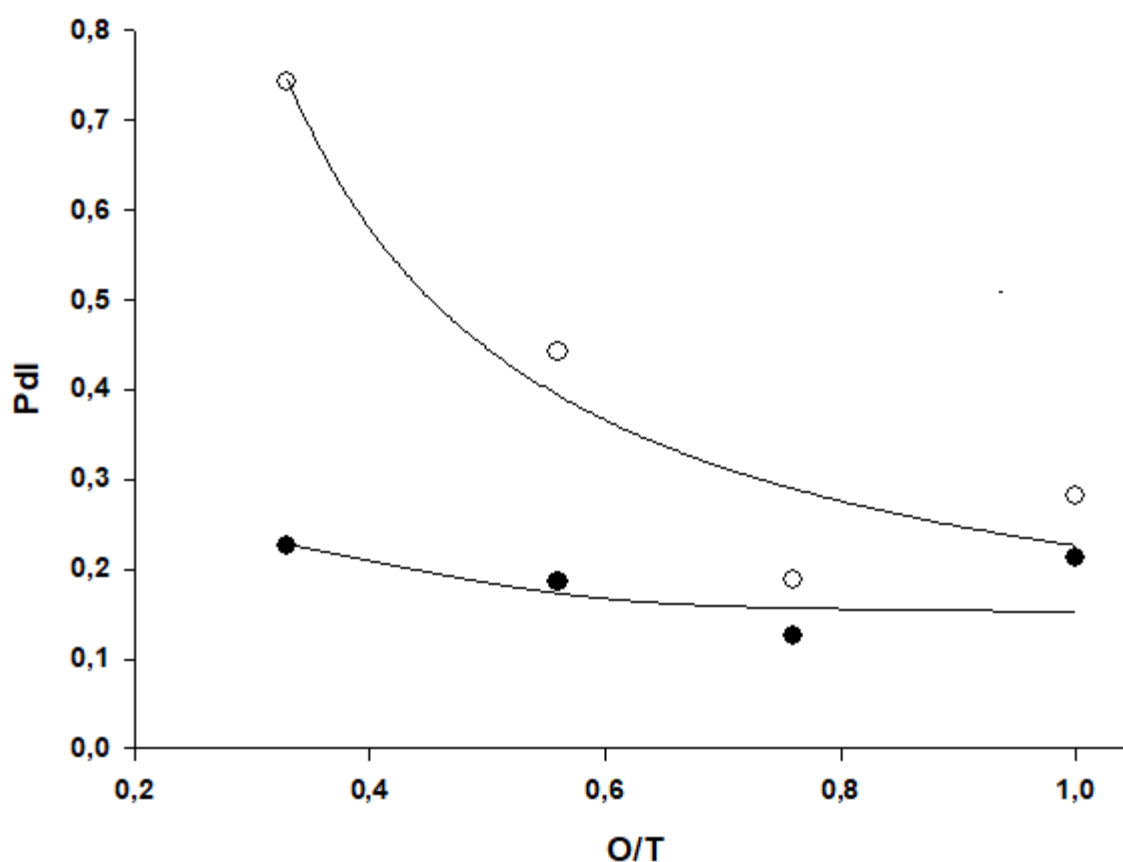
Esse fenômeno pode ser explicado desde que, na condição de mínima razão O/T houve a formação de número fixo de gotículas de fase oleosa por unidade de volume e a incorporação do CEL nas gotículas, provocou um aumento no volume local, aumentando o diâmetro.

Por outro lado, os dados da Figura 14 mostram que na ausência de CEL houve um aumento desprezível no diâmetro das gotículas com a razão O/T, indicando aumento no número de gotículas por unidade de volume.

Entretanto, na presença de CEL, houve uma diminuição acentuada no diâmetro das gotículas com a razão O/T, demonstrando que, na razão O/T de aproximadamente 1,6, os diâmetros das gotículas na ausência e na presença de CEL, são equivalentes e da ordem de aproximadamente 40 nanômetros. Esses resultados podem ser facilmente explicados, considerando-se que com o aumento do número de gotículas por unidade de volume disponibilizando maior número de sítios de incorporação para o CEL, com a consequente redução do volume local das gotículas iniciais e redistribuição das moléculas do CEL no interior das novas estruturas.

Através dos resultados da Tabela 21 e Figura 15 pode-se verificar que na ausência de CEL as NEs apresentam baixo índice de polidispersidade, variando entre 0,1 e 0,25, demonstrando que os sistemas nanoemulsionados apresentaram um comportamento unimodal e indicando ótima homogeneidade no diâmetro das gotículas.

Figura 15: Variação do Pdl em função do aumento da razão O/T. Legendas: (●) Nanoemulsões na ausência de CEL; (○) Nanoemulsões na presença de 30 mg/mL de CEL.



Na presença de CEL e em baixas razões de O/T as NEs mostraram altos índices de polidispersidade indicando um comportamento multimodal, concordante com o grande aumento do volume local das gotículas provocados pela incorporação do CEL nas mesmas condições experimentais. Entretanto, como o aumento da razão O/T foi acompanhado pelo aumento do número de gotículas por unidade de volume, houve uma distribuição mais homogênea dos diâmetros, acompanhada também pela diminuição da polidispersidade, a qual atingiu valores comparáveis aos das NEs na ausência de CEL, principalmente nas relações O/T acima de 0,6. A comparação dos resultados das Figuras 14 e 15 mostra que embora a extrapolação dos dados de diâmetro (Figura 14) mostrem que os diâmetros seriam comparáveis e suficientemente pequenos (40 nm) apenas na razão O/T 1,6, as informações da Figura 15 mostram que, a partir da razão O/T 0,8, os valores de Pdl já se encontram dentro da faixa de normalidade, em torno de 0,25.

5.3.2 Análise do Potencial Zeta

O Potencial Zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas/gotículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que afetam a estabilidade física das dispersões particuladas e coloidais. Esta medida fornece detalhes sobre as dispersões, emulsões e suspensões, como agregação ou floculação.

O equipamento utilizado foi o Zetasizer modelo Nano ZS (Malvern® Instruments). O Potencial Zeta foi determinado através da mobilidade eletroforética das amostras. A medição é baseada no efeito de Doppler, ou seja, a alteração da frequência sofrida pela luz dispersa por uma gotícula em movimento.

Gotículas em dispersão num meio polar podem apresentar carga de superfície se forem constituídas por moléculas contendo funções orgânicas dissociáveis ou pela adsorção de íons em sua superfície. Quando uma gotícula carregada se move na dispersão, ela carrega com ela os contra íons ligados, criando uma diferença de potencial (DDP) entre a sua superfície eletricamente carregada e um ponto infinito na dispersão. Essa DDP é conhecida como Potencial Zeta, o qual pode ser medido e expressa a capacidade da gotícula em ligar íons de carga de sinal contrário ou de repelir íons de mesma carga.

Sabe-se que uma boa estabilidade física das dispersões coloidais é garantida quando se obtém um valor de Potencial Zeta que reflete uma força repulsiva relativamente controlada, em torno de ± 30 mV, o que permite uma aproximação controlada das gotículas e evitam a agregação, em função das colisões ocasionais de gotículas adjacentes (Schaffazick *et al.*, 2003).

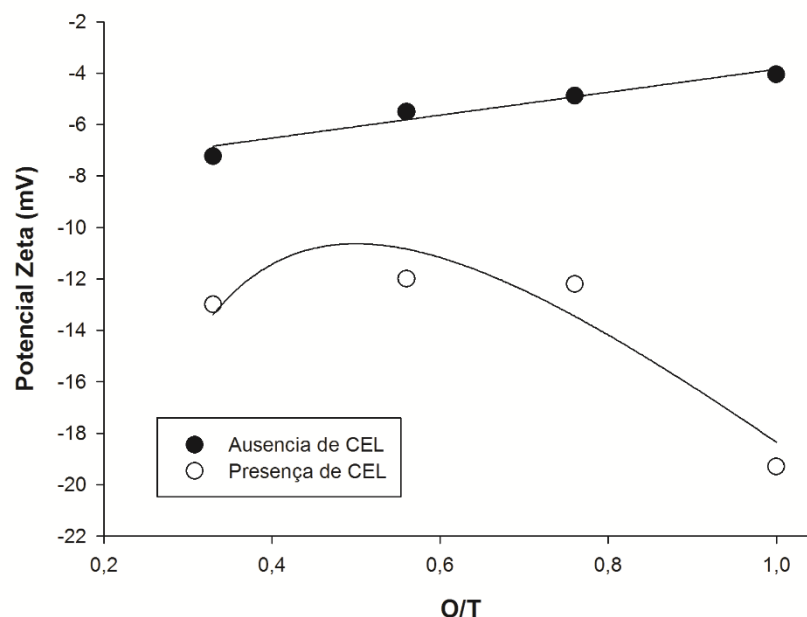
A Tabela 22 mostra os valores de Potencial Zeta obtidos nas NEs com variação da razão O/T na ausência e presença de CEL.

Tabela 22: Potencial Zeta das NEs com variação da razão O/T na ausência e presença de 30 mg/mL de CEL.

NEs	O/T	Potencial Zeta (mV)	
		Ausência de CEL	Presença de CEL
A	0,33	-7,24	-13,00
B	0,56	-5,50	-12,00
C	0,78	-4,88	-12,20
D	1,00	-4,06	-19,30

A Figura 16 mostra a variação do Potencial Zeta em função do aumento da razão O/T na ausência e presença de CEL.

Figura 16: Variação do Potencial Zeta em função do aumento da razão O/T. Legendas: (●) Nanoemulsões na ausência de CEL; (○) Nanoemulsões na presença de 30 mg/mL de CEL.



Na Figura 16 verifica-se que, com a variação da razão O/T, na faixa de 0,33 - 1,0, na ausência de CEL, o Potencial Zeta sofreu um pequeno aumento de valores, de -7,24 para -4,06 mV. Pela incorporação do CEL nas NEs, houve uma diminuição acentuada nos valores do Potencial Zeta, de -7,24 para -13,0 mV, no mínimo valor da razão O/T (0,33). Entretanto, como era de se esperar, como o aumento da razão O/T implica no aumento da fase oleosa no sistema, com favorecimento substancial da incorporação do CEL, também de caráter hidrofóbico, houve uma tendência de diminuição do Potencial Zeta no sistema, o qual foi reduzido de -13 para -19,30 mV indicando um aumento da carga negativa que colabora com a estabilidade do sistema.

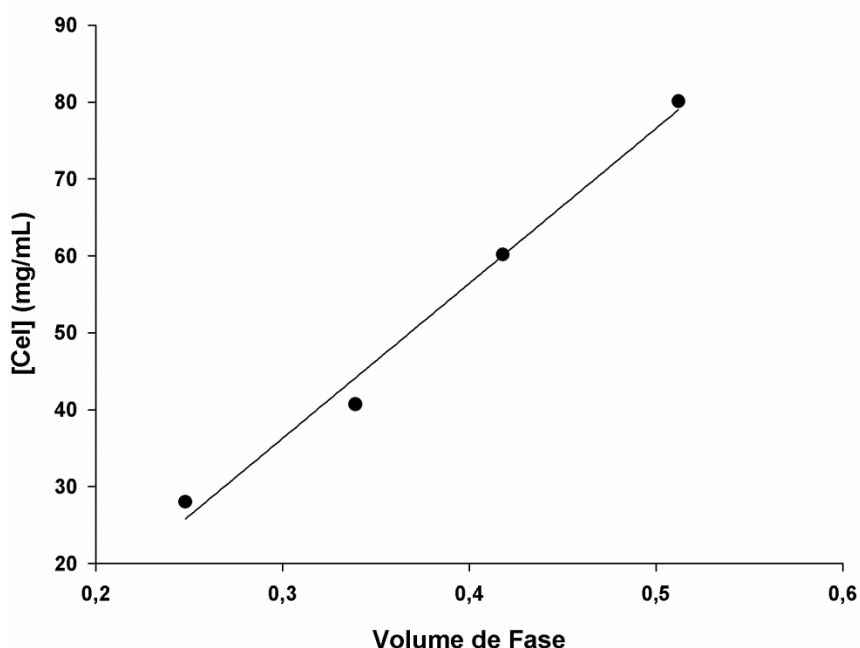
5.3.3 Incorporação do CEL nas NEs em função do volume de fase

A Tabela 23 e Figura 17 relacionam a incorporação do fármaco nas NEs com os volumes de fase interna. O volume de fase (ϕ) foi definido de acordo com a Equação 8 (Mackay, 1982).

Tabela 23: Valores referentes ao volume de fase das NEs e a solubilidade do CEL em cada formulação.

NEs	O/T	Volume de fase	Incorporação (mg/mL)
A	0,33	0,248	27,99
B	0,56	0,339	40,70
C	0,78	0,418	60,16
D	1,00	0,512	80,09

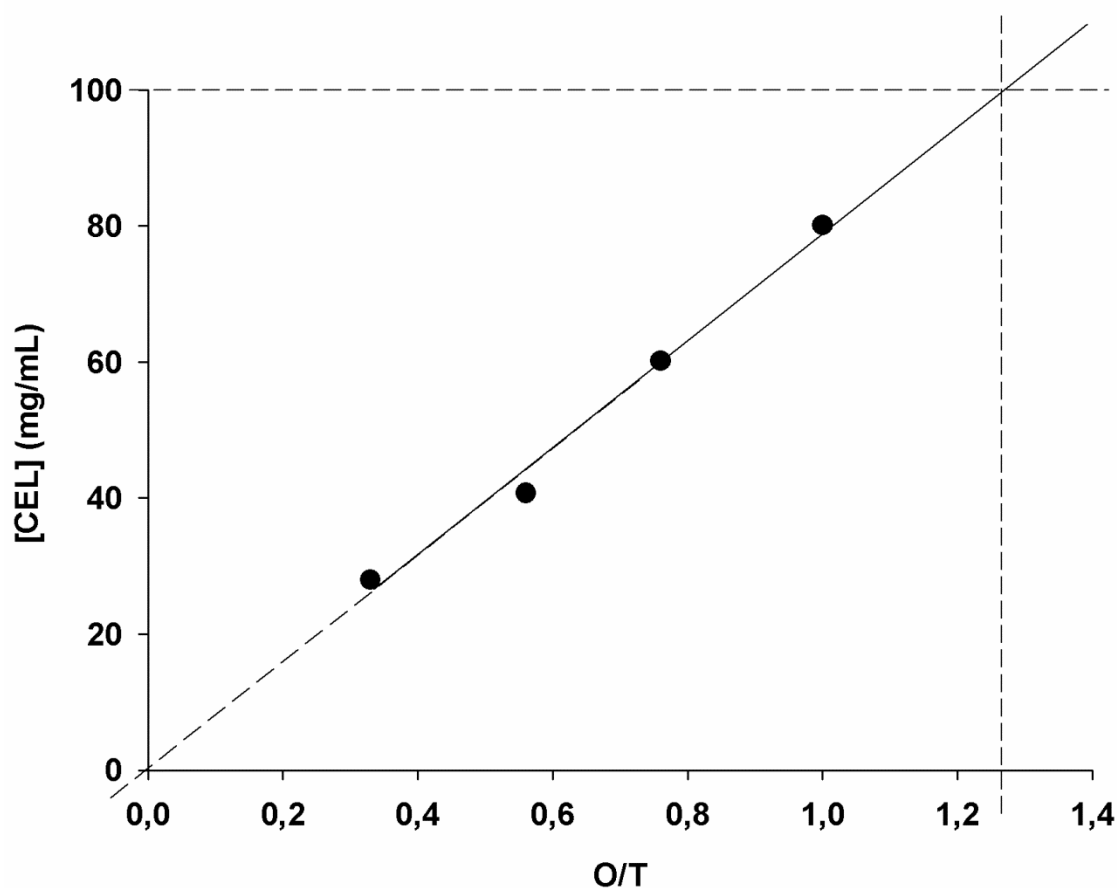
Figura 17: Efeito do volume de fase na incorporação do do CEL nas NEs.



Através dos valores de incorporação determinados neste experimento, observa-se que a solubilização do CEL é diretamente dependente da razão O/T.

Dessa forma, quando o volume de fase aumenta, a solubilidade aparente do CEL no meio é facilitada devido à característica hidrofóbica do fármaco. Da mesma forma, a incorporação do fármaco no sistema é favorecida quando a proporção de tensoativo aumenta no meio, já que este facilita a incorporação do fármaco no sistema.

Na Figura 18, é possível verificar que o perfil de incorporação é um fenômeno típico de associação de substâncias em agregados supramoleculares, cuja componente hidrofóbica da molécula exerce um efeito marcante no processo, como é o caso da incorporação do CEL em nanoemulsões neutras (Oliveira *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 1997).

Figura 18: Efeito da razão de O/T na incorporação do CEL nas NEs.

Considerando que a mistura dos tensoativos estabilizantes, fosfatidilcolina de soja/Tween® 20 (1:1 m/m), pode ser considerada formalmente neutra, a incorporação do CEL no sistema nanoemulsionado reflete diretamente a contribuição hidrofóbica da molécula na interação com a gotícula da fase interna do sistema. Da análise de regressão linear dos dados da curva de incorporação do CEL em função da razão O/T, verifica-se que essa incorporação é o resultado direto da solubilização do CEL no sistema nanoemulsionado dentro dos limites da razão O/T estudados. Embora os dados experimentais não tenham ultrapassado a razão O/T = 1, a extrapolação dos resultados mostra que 100 mg/mL de CEL solubilizado teriam sido atingidos com a razão O/T de cerca de 1,25.

5.3.4 Análise do comportamento reológico

O estudo reológico visa estabelecer razão entre o processo microestrutural e o comportamento macroscópico (Grassi *et al.*, 2006). Refere-se ao comportamento macroscópico de um material sob fluxo ou deformação e determina suas propriedades não-lineares. Consiste no estudo do escoamento ou deformação do material quando

submetido a uma tensão. O método é aplicável na caracterização de sistemas nanoemulsionados, pois o comportamento do fluido está relacionado com o tipo e grau de organização do sistema (Formariz *et al.*, 2005).

O reômetro funciona pelo princípio de rotação e oscilação, nos quais a amostra é cisalhada entre as paredes interna e externa do porta-amostra cuja geometria usual compreende cone e placa. A vantagem desta geometria é que não ocorre variação na tensão de cisalhamento através da amostra, porque a distância entre o cone e placa é pequena, fazendo com que a tensão de cisalhamento seja praticamente uniforme por toda a amostra (Tokumoto *et al.*, 2000).

A correlação entre tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento que define o comportamento de fluxo de um líquido é mostrada graficamente em diagramas chamados de curvas de fluxo ou reogramas. Os diferentes tipos de curva de fluxo têm seus correspondentes tipos de curva de viscosidade. As curvas de fluxo representam duas partes do experimento: a curva ascendente, que indica o aumento da taxa de cisalhamento e a curva descendente, quando a taxa de cisalhamento é reduzida continuamente (Schramm, 2006; Pestana, 2009).

O comportamento do fluxo pode ser Newtoniano, pseudo-plástico, plástico, dilatante, tixotrópico ou reopético.

Os fluidos podem ser classificados como Newtonianos e não-Newtonianos. Os Newtonianos são aqueles em que a viscosidade não é afetada por mudanças da taxa de cisalhamento. Para um fluido Newtoniano ideal, a tensão de cisalhamento é uma função linear da taxa de cisalhamento e a constante de proporcionalidade para esta relação η é chamada de viscosidade Newtoniana (Schramm, 2006).

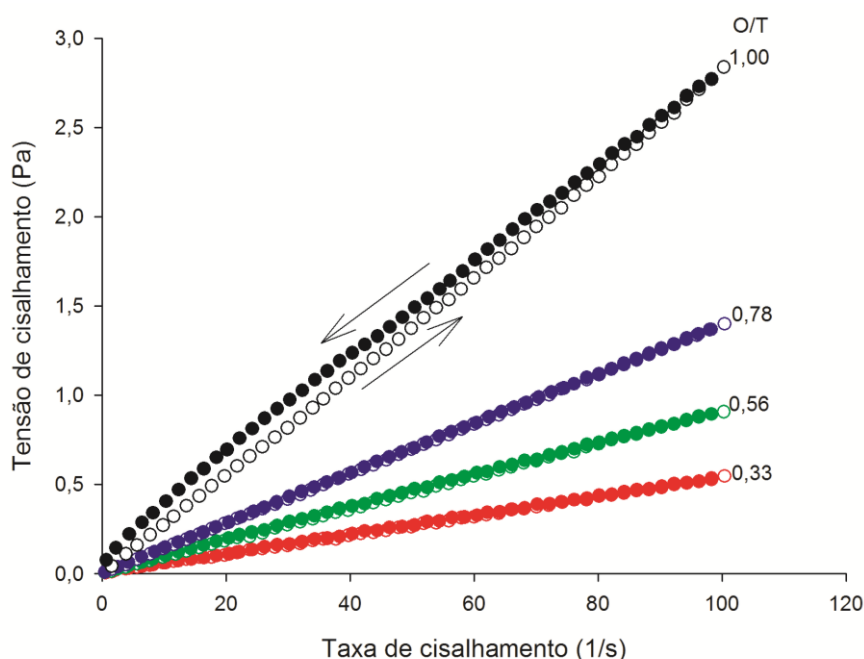
Os outros fluidos que não apresentam esse comportamento são chamados de não-Newtonianos. Os não-Newtonianos podem ser divididos em pseudo-plásticos, onde a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento e sua estrutura volta ao estado original quando a taxa de cisalhamento retorna a zero, e dilatante, em que a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento (Schramm, 2006).

Materiais tixotrópicos e reopéticos, exibem, respectivamente, diminuição e aumento na tensão de cisalhamento (e viscosidade aparente) sob tempo e taxa de cisalhamento fixo. Ambos os fenômenos podem ser irreversíveis, reversíveis ou parcialmente reversíveis. Há uma concordância geral que o termo tixotropia refere-se ao decréscimo da viscosidade tempo-dependente, devido ao cisalhamento e subsequente recuperação da viscosidade quando o cisalhamento é interrompido (Schramm, 2006).

A Figura 19 mostra a influência da razão O/T sobre o comportamento reológico das NEs na ausência do fármaco à 25°C. Em todas as relações O/T estudadas, as curvas ascendentes (símbolos vazios) mostraram comportamento Newtoniano, pois a tensão de cisalhamento foi diretamente proporcional ao gradiente de cisalhamento. Estes resultados sugerem que as gotículas presentes no sistema não apresentam interações com as vizinhanças, ou seja, encontram-se isoladas uma das outras. Estes aspectos estruturais são independentes do aumento da razão O/T.

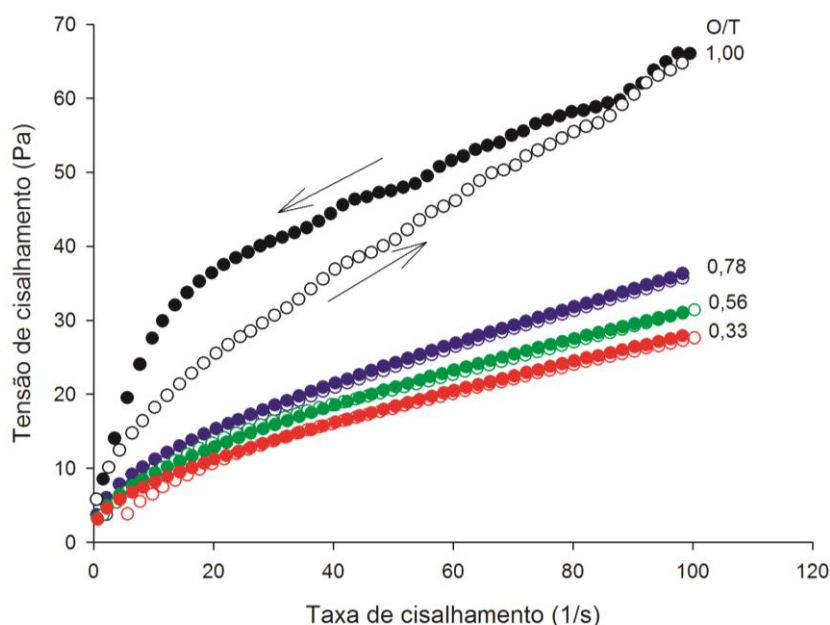
Para os sistemas preparados com razão O/T acima de 0,78 entretanto, o reograma revela a presença de um laço de histerese entre as curvas ascendente e descendente, típica de sistemas com comportamento anti-tixotrópico, que é mais pronunciado na NE com razão O/T igual a 1,00.

Figura 19: Perfil reológico das NEs em função da razão O/T na ausência de CEL.



A Figura 20 mostra o comportamento reológico das NEs na presença de 30 mg/mL do fármaco em função da razão O/T. Observa-se que, independentemente da quantidade de fase oleosa, o comportamento do fluxo tem características pseudo-plásticas; portanto, revela que a incorporação do CEL induz à interação entre as gotículas; porém, ao diminuir a viscosidade, estas gotículas não apresentam mais interações entre si.

Figura 20: Perfil reológico das NEs em função da razão O/T na presença de 30 mg/mL de CEL.



Com base nos dados obtidos no estudo reológico e utilizando o modelo de lei de potência (Equação 9), calculou-se o valor de n para caracterizar o comportamento de fluxo (Newtoniano, pseudo-plástico, plástico ou dilatante) e k (índice de consistência) para caracterizar a viscosidade do material (Schramm, 2006).

$$\tau = k \times (\dot{\gamma})^n \quad (\text{Equação 9})$$

Onde:

τ = taxa de cisalhamento;

k = índice de consistência;

$\dot{\gamma}$ = tensão de cisalhamento;

n = índice de comportamento do fluxo.

Este modelo retrata o desvio em relação ao comportamento Newtoniano, portanto $n > 1$ representa um fluido dilatante ou reopético, $n < 1$ representa um fluido pseudo-plástico, tixotrópico ou anti-tixotrópico e $n = 1$ representa um fluido newtoniano.

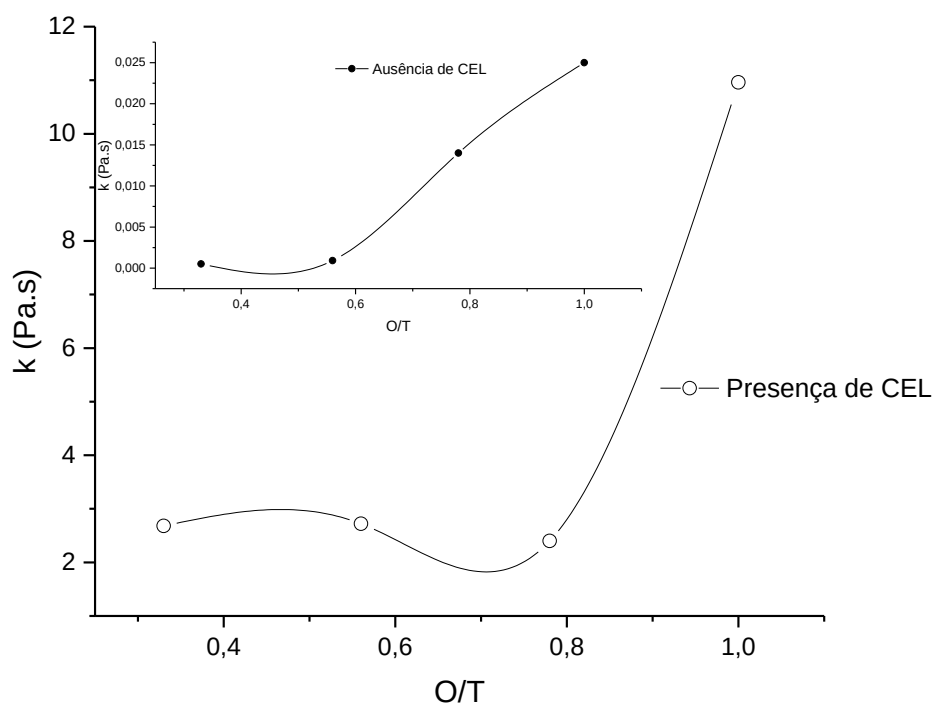
Para todas as NEs, na ausência do fármaco, os valores de n foram próximos de 1, confirmando o comportamento Newtoniano das amostras. E para todas as NEs na presença do CEL, os valores de n são próximos a 0,5 confirmando o comportamento pseudoplástico. Os valores de n e k estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24: Índice do comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (k) em relação à razão O/T para as NEs preparadas na ausência e na presença de 30 mg/mL de CEL.

NEs	O/T	Ausência de CEL		Presença de CEL	
		k	n	k	n
A	0,33	0,005	1,00	2,680	0,52
B	0,56	0,009	1,00	2,720	0,55
C	0,78	0,014	0,99	2,400	0,52
D	1,00	0,025	1,02	10,960	0,38

A Figura 21 apresenta o índice de consistência (k) para as NEs na presença e ausência do fármaco, em função da relação à razão O/T .

Figura 21: Índice de consistência (k) para NEs na ausência e presença de 30 mg/mL do fármaco em relação à razão O/T .



A Figura 21 mostra que os valores de k aumentam conforme aumenta a razão O/T , cerca de 5 vezes (de 0,005 para 0,025 Pa.s) na ausência do CEL e cerca de 4 vezes (de 2,68 para 10,96 Pa.s), em sua presença. A incorporação do fármaco promoveu um aumento da viscosidade do sistema, porém, para a NE com maior razão O/T , este aumento foi significativamente maior. Estes efeitos podem ser explicados pela formação de microestruturas mais volumosas provocada pelas interações do CEL com a fase oleosa, o que sugere que o fármaco promove um aumento da distância entre as gotículas, reduzindo o volume de fase que altera a viscosidade do sistema (Formariz *et al.*, 2006).

Tipicamente, a viscosidade de sistemas óleo-água aumenta com a fração de volume de fase. Esse comportamento pode ser descrito por modelos teóricos baseados na hipótese de esferas rígidas dispersas em que o diâmetro considera, também, a presença da camada de tensoativo ao redor do núcleo oleoso. De fato, a fase dispersa ocupa um volume maior que o volume real da fase oleosa (Grassi *et al.*, 2006; Pestana, 2009).

A fração volumétrica da fase interna (Φ) e o diâmetro das gotículas podem exercer forte influência sobre a viscosidade das nanoemulsões. Valores baixos a moderados de volume de fase interna ($\Phi < 0,6$), favorece os sistemas que exibem comportamento Newtoniano e, com isto, o tamanho das gotículas não exerce influência sobre sua viscosidade. Entretanto, para $\Phi > 0,6$, as nanoemulsões apresentam comportamento pseudo-plástico. Com isto, a viscosidade nestas condições é fortemente influenciada pelo tamanho das gotículas (Pal Kaur e Kanwar, 2002; Pestana, 2009).

No caso das NEs estudadas neste trabalho, o volume de fase (Φ) variou entre 0,24 a 0,51, para sistemas na ausência de CEL (Tabela 23). A fase externa é predominante em relação à fase interna, determinando que as gotículas formadas sejam “diluídas” no meio dispersante, sem haver interações significativas com a vizinhança, justificando assim o comportamento Newtoniano observado.

Em testes de oscilação, as amostras viscoelásticas são submetidas a tensões de oscilação senoidais. Em um teste de oscilação, uma tensão de cisalhamento/ tensão senoidal variada de um período fixo ou variável é aplicado à amostra, e o estresse senoidal resultante é medido, fornecendo informações sobre os tipos de resposta, elástica ou viscosa, do sistema. A partir da razão destas duas grandezas, obtém-se o módulo elástico complexo G^* (Schramm, 2006).

Tokumoto *et al.* (2000) relatam que a componente real do módulo elástico, G' , é denominada de módulo de armazenagem, porque representa a energia armazenada durante a deformação. Neste tipo de análise, pode-se medir o caráter sólido da amostra. A parte imaginária do módulo G'' , deve-se ao elemento viscoso que não pode armazenar energia, denominada de módulo de perda, porque a tensão aplicada é dissipada na forma de deformação irreversível. Neste tipo de análise, pode-se medir o caráter líquido do material.

A evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' das NEs na ausência do CEL estão apresentados nas Figuras 22 a 25.

Figura 22: Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da NE com razão O/T 0,33, onde G' corresponde aos símbolos vazios e o G'' aos símbolos cheios.

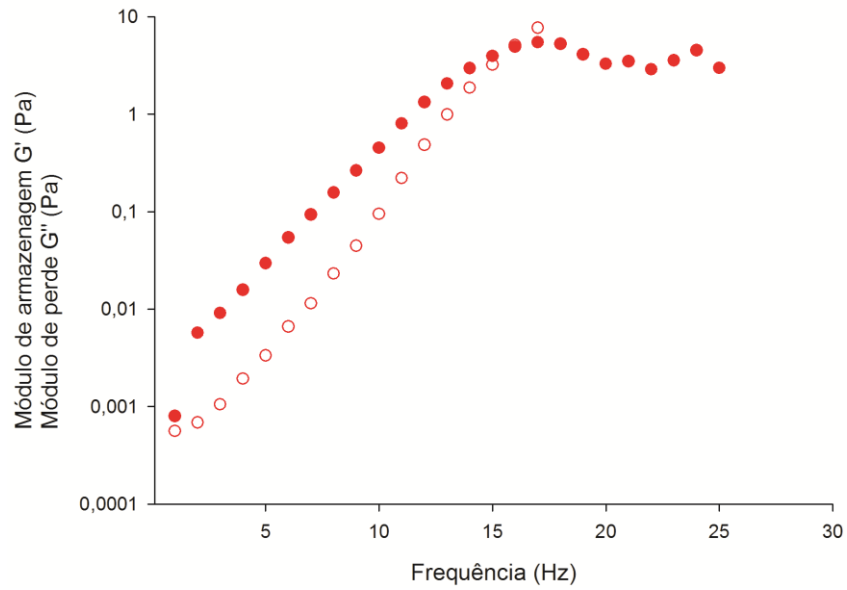


Figura 23: Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da NE com razão O/T 0,56, onde G' corresponde aos símbolos vazios e o G'' aos símbolos cheios.

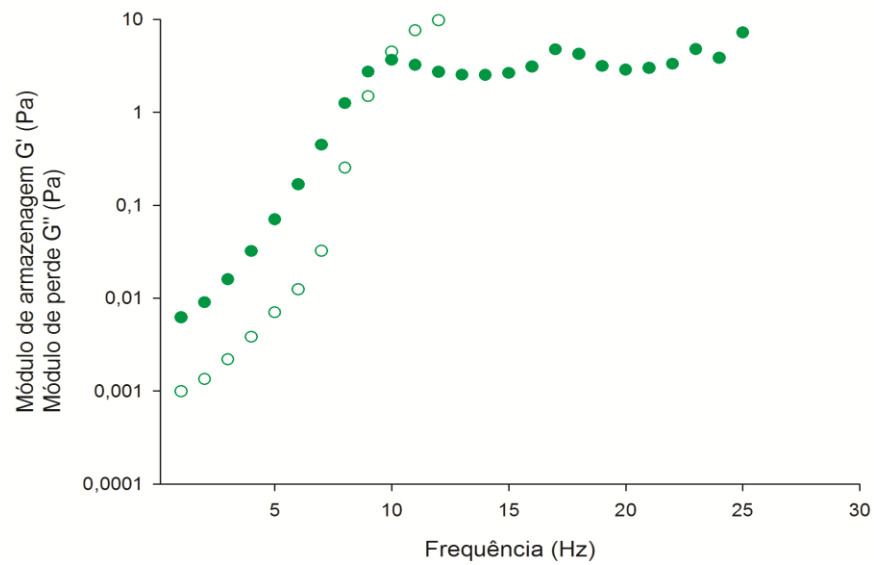


Figura 24: Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da NE com razão O/T 0,78, onde G' corresponde aos símbolos vazios e o G'' aos símbolos cheios.

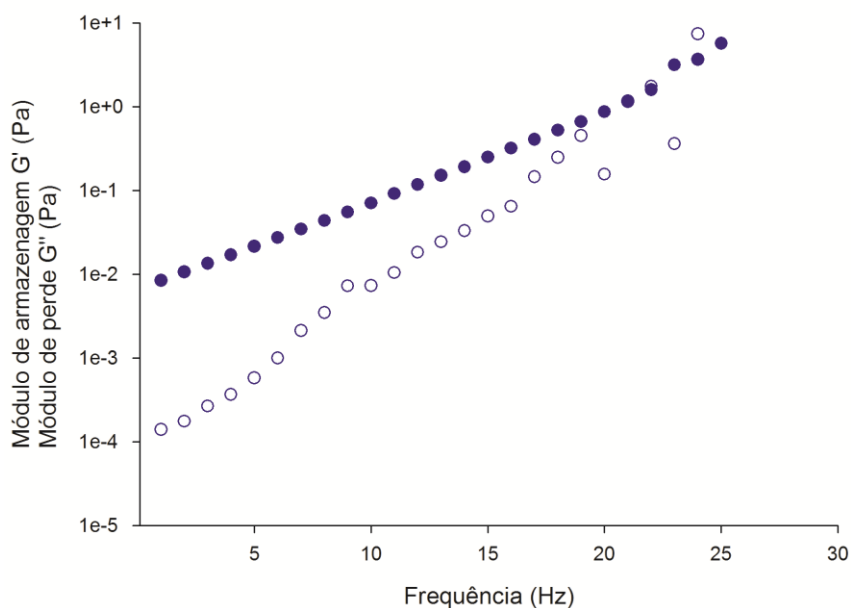
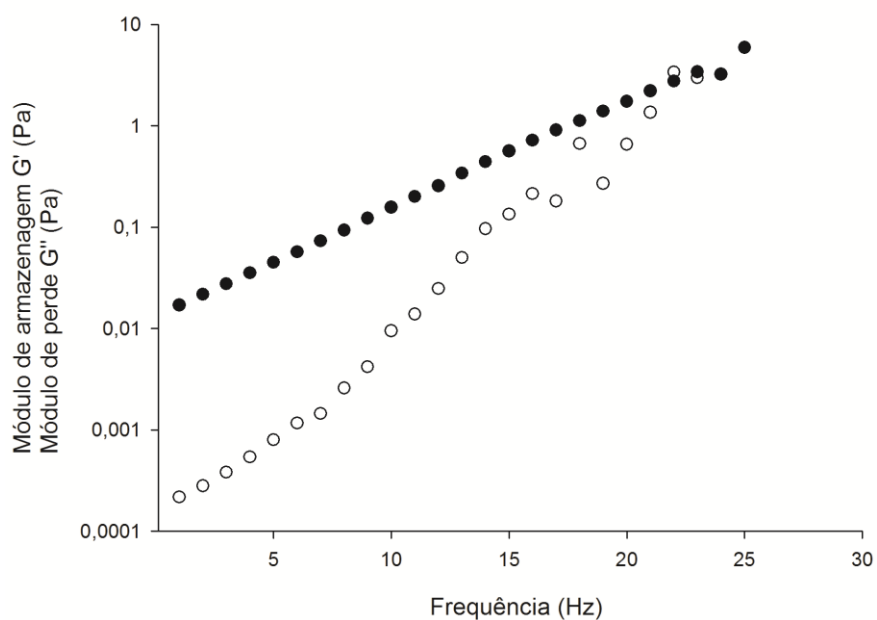


Figura 25: Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da NE com razão O/T 1,00, onde G' corresponde aos símbolos vazios e o G'' aos símbolos cheios.



Pode-se observar que para todas as NEs há a predominância de G'' sobre G' indicando que essas amostras se comportam praticamente como sistemas líquidos, essencialmente viscosos, constituído de uma rede fracamente estruturada, ou seja, apresentam propriedades viscoelásticas.

As Figuras 26 a 29 mostram que, com a incorporação de 30 mg/mL do fármaco, G' predomina sobre G'' , fazendo com que as NEs apresentem predominância de características sólidas. Assim, pode-se sugerir que quando o CEL é adicionado à NE, este favorece a formação de agregados, alterando a viscosidade do sistema.

A única exceção é a NE com razão O/T 0,78 que permanece com a predominância da sua característica líquida ($G'' > G'$) sendo favorável para aplicações injetáveis.

Figura 26: Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da NE com razão O/T 0,33, onde G' corresponde aos símbolos vazios e o G'' aos símbolos cheios.

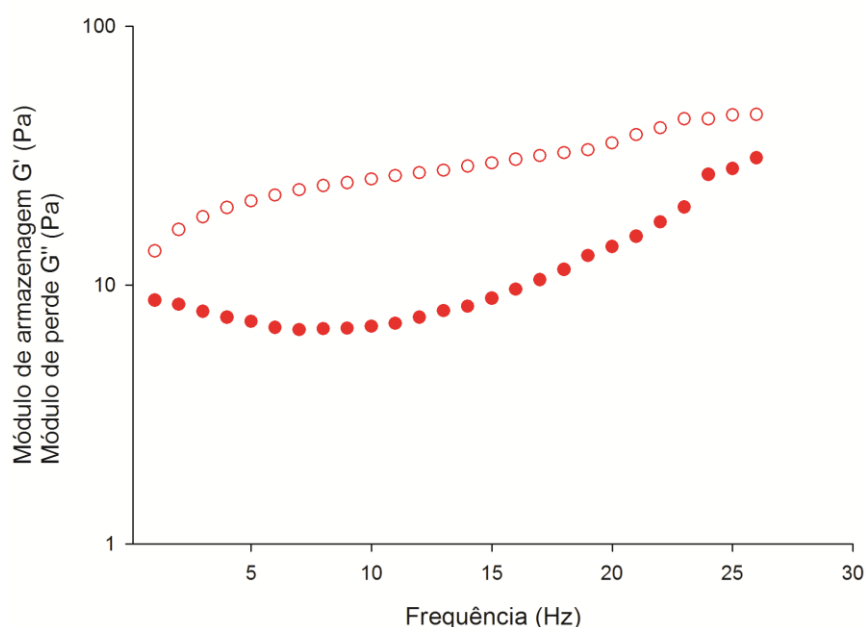


Figura 27: Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da NE com razão O/T 0,56, onde G' corresponde aos símbolos vazios e o G'' aos símbolos cheios.

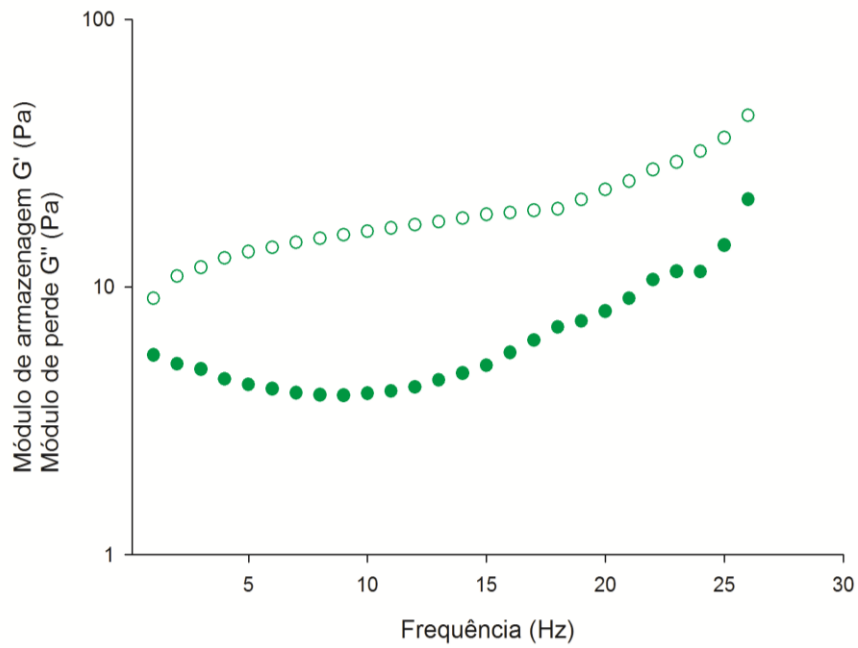


Figura 28: Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da NE com razão O/T 0,78, onde G' corresponde aos símbolos vazios e o G'' aos símbolos cheios.

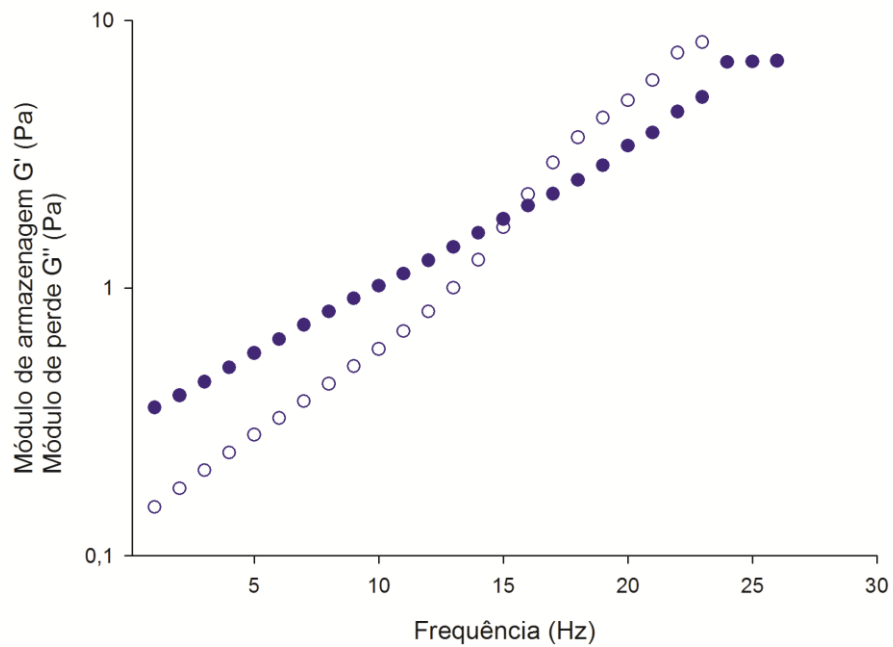
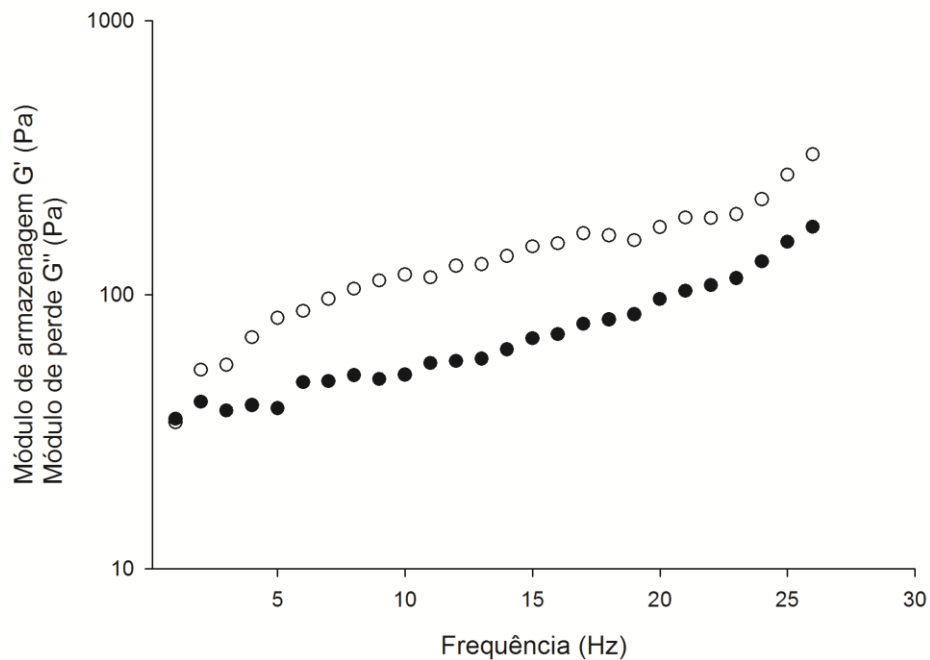


Figura 29: Evolução dos módulos de armazenagem G' e de perda G'' da NE com razão O/T 1,00, onde G' corresponde aos símbolos vazios e o G'' aos símbolos cheios.

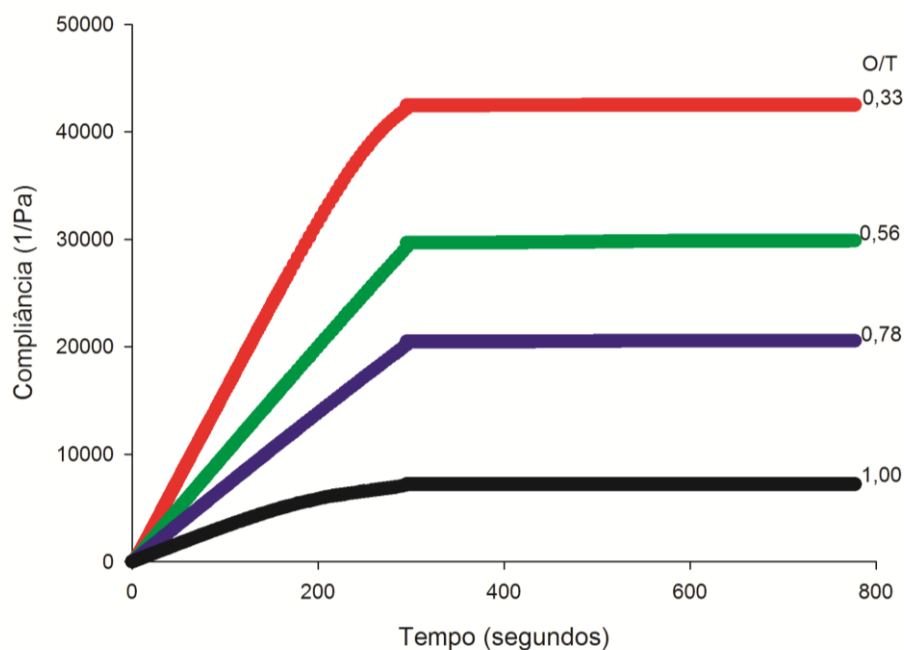


Os métodos estáticos são testes de fluência ou testes constantes de estresse ou de relaxamento sob tensão constante. O teste de fluência é usado com muito mais frequência do que o teste de relaxamento. No teste de fluência, uma tensão constante é aplicada e a tensão da amostra é determinada em função do tempo. No teste de relaxamento, a amostra é submetida a uma deformação pré-determinada e o estresse necessário para manter essa tensão é medido em função do tempo (Schramm, 2006).

Em outras palavras, os testes de fluência e relaxação (também chamados de ensaios de compliância) são definidos pela razão da deformação pela tensão onde pode-se observar as propriedades de um corpo ou de uma substância de permitir que ocorra uma alteração em sua forma.

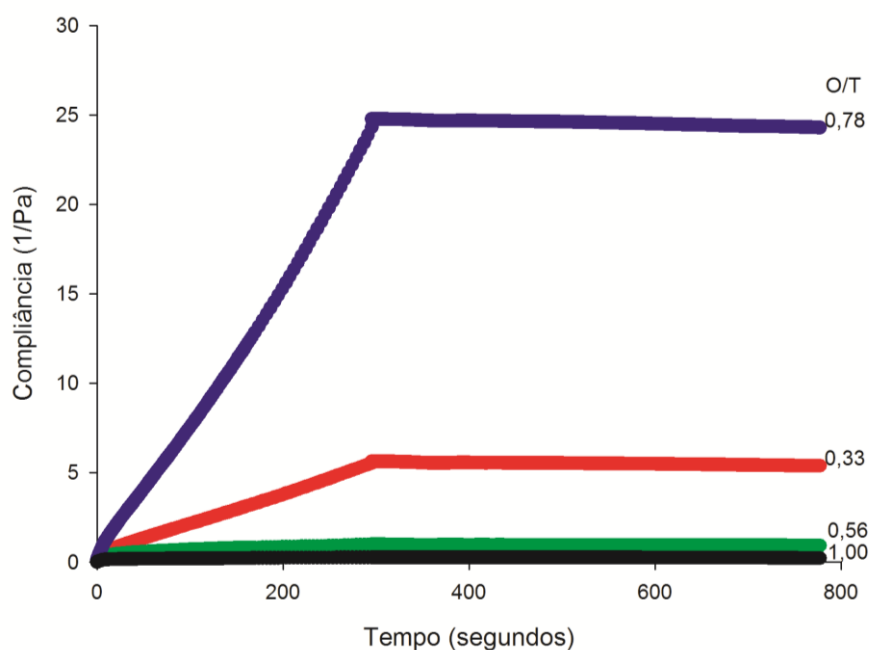
A evolução das curvas de fluência-relaxação das NEs sem CEL são mostradas na Figura 30. Nas NEs com baixa razão O/T observa-se pequenos desvios da linearidade indicando um comportamento típico de sistemas viscosos, nos quais a componente elástica é desprezível. Com o aumento da razão O/T observa-se um maior desvio da linearidade nas curvas de deformação, seguida de uma relaxação pouco acentuada, o que caracteriza o comportamento típico de sistemas sólidos elásticos.

Figura 30: Evolução temporal da compliância das NEs na ausência do fármaco.



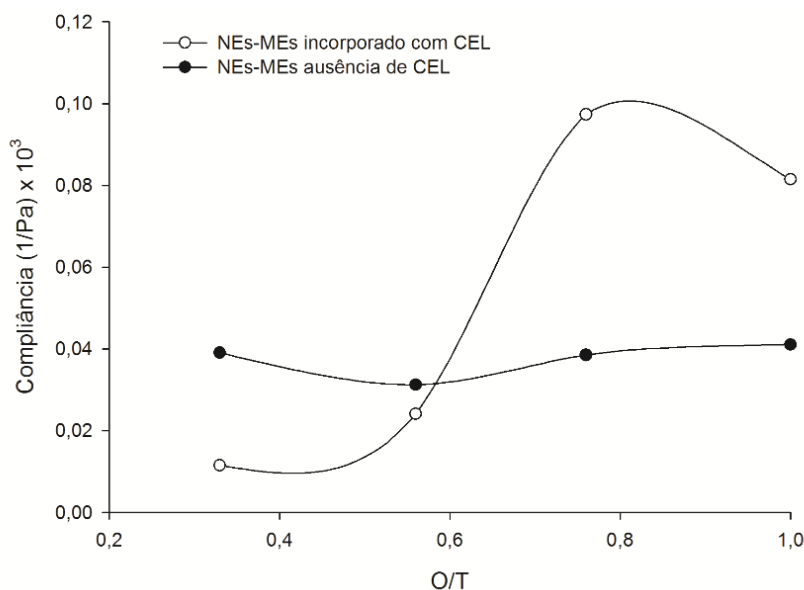
A Figura 31 nos mostra que, com a incorporação do fármaco às NEs, o único sistema que não apresenta grandes desvios de linearidade na curva de deformação é com a razão O/T 0,78, apresentando comportamento típico de sistemas viscosos do tipo Newtoniano.

Figura 31: Evolução temporal da compliância das NEs na presença de 30 mg/mL do fármaco.



A Figura 32 apresenta os valores de compliância extraídos no tempo de 200 s da etapa de fluência para as NEs na presença e ausência de CEL.

Figura 32: Valores de compliância a 200s (etapa de fluência) das NEs em função da razão O/T.

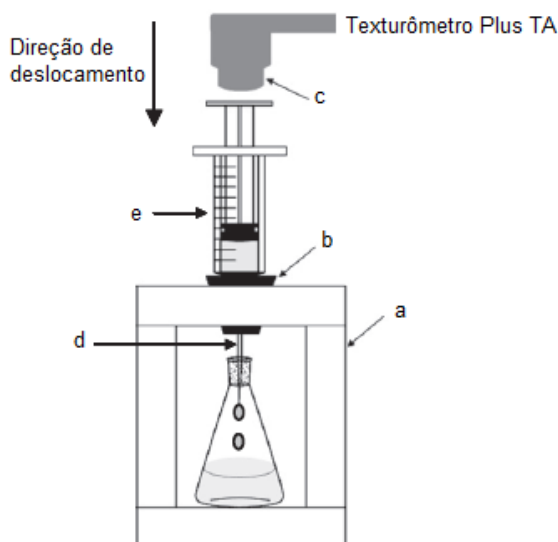


Os resultados da Figura 32 mostram que a compliância se mantém constante em todo o aumento da razão O/T, nos sistemas na ausência do fármaco incorporado.

Com a incorporação do CEL às NEs, os valores de compliância se mostraram menores do que para as NEs na ausência de fármaco até o limite da razão O/T 0,56, indicando que a presença do fármaco favorece o aumento da visco-elasticidade do sistema, sendo mais favorável com a presença de CEL no sistema formando estruturas com mobilidade menor.

5.3.5 Análise da seringabilidade

A seringabilidade das NEs foi estudada usando a força exercida no êmbolo da seringa para injetar as NEs e foram avaliadas pelo dispositivo acoplado ao analisador de textura (texturômetro modelo Plus, TA® Instruments) em modo de compressão. O princípio consiste em aplicar uma taxa de deslocamento no êmbolo da seringa cheia com a NE e medir a força resultante (N). O dispositivo para realizar os estudos está descrito no esquema I (Burckbuchler *et al.*, 2010).



Esquema I: Configuração do equipamento utilizado para a medição experimental da força de seringabilidade desenvolvida durante a injeção das NEs: a) suporte metálico, b) anel de fixação de plástico, c) transdutor de força, d) agulha e e) seringa.

A seringabilidade de uma formulação é um fator importante a ser considerado quando a via de administração necessita de uma injeção, como é o caso da via de administração intravítrea. A seringabilidade é a pressão ou a força necessária para a injeção desta formulação em uma determinada taxa de velocidade passe através de uma agulha de calibre pré-determinado (Burckbuchler *et al.*, 2010).

Na tabela a seguir está apresentado os dados das NEs com e sem fármaco variando a razão O/T (Tabela 25). Os resultados são mostrados através da relação F.mm (força (N) x distância (mm)).

Tabela 25: Dados de F.mm das NEs com variação da razão O/T correlacionando com os dados obtidos do índice de consistência (k).

NEs	O/T	Ausência de CEL		Presença de CEL	
		k	F.mm	k	F.mm
A	0,33	0,005	47,780	2,680	108,506
B	0,56	0,009	49,760	2,720	108,706
C	0,78	0,014	46,740	0,560	66,266
D	1,00	0,025	52,262	10,960	253,987

Como se pode observar, para as formulações que apresentam índices de consistência semelhantes, como é o caso das NEs sem CEL, a força necessária para injetar a NE através da seringa também é semelhante. Conforme aumenta a viscosidade do sistema, incorporando o fármaco, o índice de consistência aumenta, o que acaba levando a um aumento também da força necessária para realizar a injeção.

A formulação com melhor resultado foi a NE C com razão O/T 0,78 que, mesmo após a incorporação do CEL, permaneceu com valor de força abaixo das demais formulações.

5.3.6 Microscopia de luz polarizada

Uma das maneiras de classificar as fases líquido-cristalinas é determinar sua isotropia óptica, através da técnica de microscopia de luz polarizada. Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar a luz. Mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicas, enquanto as cúbicas e nanoemulsões são isotrópicas (Norling *et al.*, 1992; Brinon *et al.*, 1999; Hyde, 2001; Pestana, 2009).

O microscópio de luz polarizada é um microscópio no qual, junto ao condensador, existe um polarizador, que orienta as ondas luminosas provenientes da fonte de luz em uma só direção, em um só plano. As alterações que uma substância birrefringente provoca na direção da propagação da luz, em um equipamento desse tipo, são feitas graças ao analisador, um segundo sistema de polarização, junto à ocular. O máximo de luz é obtido quando o polarizador e analisador estão com eixos em paralelo e, ao contrário, a luz extingue quando são perpendiculares (Abramowitz *et al.*, 2006).

A Figura 33 mostra as fotomicrografias das NEs sem fármaco contendo proporções crescentes da razão O/T. Verifica-se que, em relações O/T abaixo de 0,78, as formulações apresentaram campo escuro. Já a formulação com razão O/T = 1,00 que, apresenta elevada concentração de fase oleosa (18%) e se encontra no limite da região delimitada para nanoemulsões, de acordo com o diagrama de fases pseudo-ternário da Figura 12, a fotomicrografia apresentou raras presenças de cruz de malta (característica de estrutura de fase lamelar).

Figura 33: Fotomicrografias dos sistemas preparados com proporções crescentes da razão O/T. Aumento de 40x.



Assim, analisando o fato de que conforme aumenta-se a razão O/T ocorre o aumento na organização estrutural do sistema sendo possível observar o aparecimento de cruz de malta na razão $O/T = 1,0$, o que indica uma transição de fases do domínio da existência de nanoemulsões para o domínio da existência de cristais líquidos (Gabboun *et al.*, 2001). Estes dados estão de acordo com o estudo reológico que mostra um aumento do índice de consistência das formulações com o aumento da razão O/T como resultado da estruturação interna e do aumento no grau de empacotamento das gotículas.

5.3.7 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

A utilização da técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) na caracterização de sistemas é explicada pela possibilidade de se determinar o tamanho médio e a distância entre os objetos espalhadores, como gotículas, micelas ou estruturas cristalinas. Além disso, essa técnica permite avaliar a estrutura de objetos

espalhadores mesmo que eles não estejam organizados de forma ordenada (Carvalho, 2008).

Ao irradiar uma amostra bifásica com a forma de uma plaqueta relativamente fina, com um feixe monocromático (luz visível, raios-X, nêutrons, elétrons), observa-se o espalhamento da radiação na vizinhança angular próxima a do feixe transmitido. No caso dos raios-X a baixo ângulo, o espalhamento deve-se às heterogeneidades na densidade eletrônica do sistema. A dependência angular da intensidade espalhada está diretamente relacionada à densidade eletrônica através da transformada de Fourier. Considerando uma gotícula de tamanho e forma variada, a intensidade espalhada $I(q)$ é proporcional ao fator de forma $P(q)$ desta gotícula: $I(q) \propto P(q)$ (Als-Nielsen, 1994).

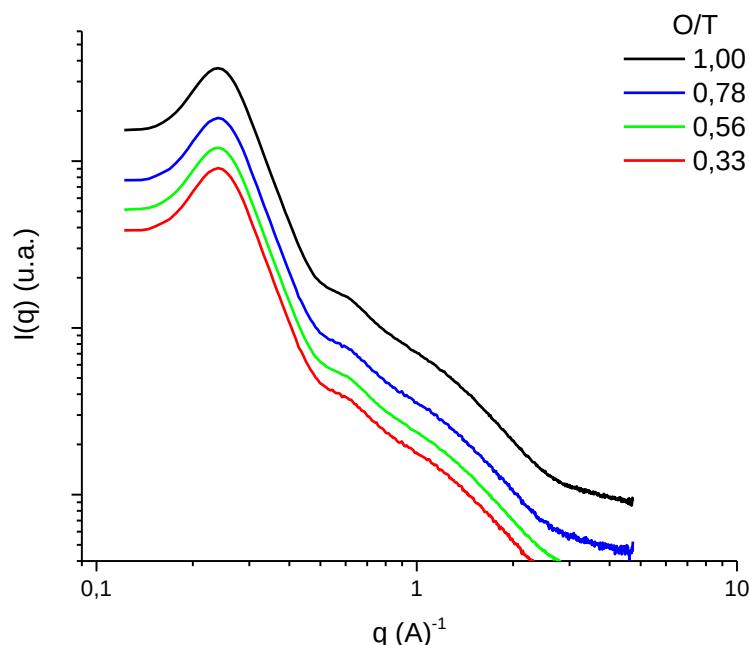
Modificações na composição dos sistemas podem promover mudanças estruturais e, conseqüentemente, podem restringir a mobilidade das moléculas dissolvidas no sistema. Sabe-se que as NEs são sistemas menos ordenados com baixa viscosidade, enquanto que sistemas mais ordenados, como fase lamelar, hexagonal e cúbica apresentam propriedades elásticas de sólidos. A mobilidade das moléculas é maior em líquidos do que em sólidos, e as modificações estruturais podem alterar o perfil de liberação de fármacos (Formariz *et al.*, 2007; Pestana, 2009; Silva, 2013).

A mistura de óleo, água e tensoativo é capaz de formar uma grande variedade de estruturas, incluindo as estruturas não cristalinas, como nanoemulsões e emulsões e estruturas cristalinas, como fases lamelares, cúbicas e hexagonais (Hyde, 2001).

A técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) tem sido utilizada para a obtenção de informação sobre a estrutura tridimensional de sistemas. As medidas de SAXS associadas à microscopia de luz polarizada permitem estudar as fases formadas resultantes das diferentes proporções de tensoativo e fase oleosa (Pestana, 2009).

Os resultados das Figuras 34 e 35 mostram as curvas de intensidade de espalhamento $I(q)$ em função do vetor de espalhamento (q), em relação à razão O/T

Figura 34: Curvas de SAXS das NEs em relação à razão O/T na ausência de CEL.



A Figura 34 mostra as curvas de SAXS das NEs com a variação da razão O/T na ausência do fármaco. A presença de um pico acentuado com um braço ligado a este pico é, provavelmente, um pico de interação do fator estrutural, indicando interações inter-gotículas fortes e uma possível transição de fase de um sistema menos organizado para um sistema mais organizado (Podlogar *et al.*, 2004; Lidich *et al.*, 2016).

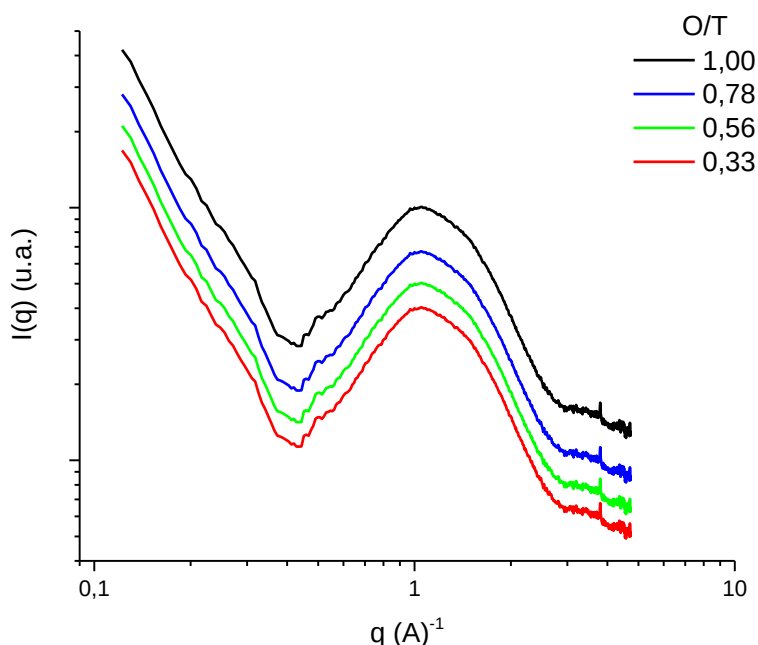
Sabe-se que altas concentrações de tensoativos podem causar um aumento de estruturas de dispersão auto-organizadas na amostra e, ao utilizar o co-tensoativo, como por exemplo, o Tween® em uma NE O/A, é esperado que as cadeias hidrofílicas do surfactante não iônico estejam altamente hidratadas e conectadas por ligações de hidrogênio da fase aquosa e permitindo uma forte interação entre elas, formando nanoestruturas (Podlogar *et al.*, 2004; Lidich *et al.*, 2016).

Sistemas micelares apresentam curvas de SAXS com ampla banda ou picos muito largos associados com a correlação espacial de curto alcance 3D das micelas ou das gotículas da NE (Beaucage *et al.*, 1995).

Assim, as formulações podem ser classificadas como micro ou nanoemulsões, como pôde ser observado também através da microscopia de luz polarizada, onde estas formulações apresentaram campo escuro, indicando isotropia e o diâmetro das gotículas variou de 28 a 40 nm indicando, ainda, diâmetro médio coerente com estas estruturas.

A Figura 35 mostra as curvas de SAXS das NEs com a variação da razão O/T na presença de 30 mg/mL do fármaco.

Figura 35: Curvas de SAXS das NEs em relação à razão O/T na presença de 30 mg/mL de CEL.



De acordo com a Figura 35 e a Tabela 26, é possível observar uma proximidade dos objetos espalhadores, visto que houve um aumento do volume local das gotículas (aumento de diâmetro) quando o fármaco é incorporado na NE.

É possível inferir que, ao adicionar o fármaco nas NEs, houve um grau de ordenação maior no sistema, favorecendo o aparecimento de propriedades elásticas de sólidos como, também, pôde ser visto na análise reológica.

Pode-se calcular uma distância média, entre duas gotículas ou planos vizinhos, a partir do valor da posição do vetor de espalhamento quando a intensidade é máxima, empregando a relação:

$$D = 2\pi / q_{\text{máx}} \quad (\text{Equação 10})$$

Onde:

D = distância dos objetos espalhadores;

$q_{\text{máx}}$ = intensidade máxima do pico.

Os valores de $q_{\text{máx}}$ determinados para as amostras estão na Tabela 26.

Tabela 26: Valores de $q_{\text{máx}}$ (Å) para as NEs relação à razão O/T na ausência e presença de 30 mg/mL de CEL.

NEs	O/T	Valores de $q_{\text{máx}}$ (Å ⁻¹)			Distância das gotículas (Å)		
		Ausência de CEL	Ausência de CEL	Presença de CEL	Ausência de CEL	Ausência de CEL	Presença de CEL
		(q1)	(q2)		(q1)	(q2)	
A	0,33	0,247	0,608	1,075	25,425	10,328	5,8448
B	0,56	0,247	0,608	1,075	25,425	10,328	5,8448
C	0,78	0,247	0,608	1,075	25,425	10,328	5,8448
D	1,00	0,247	0,608	1,075	25,425	10,328	5,8448

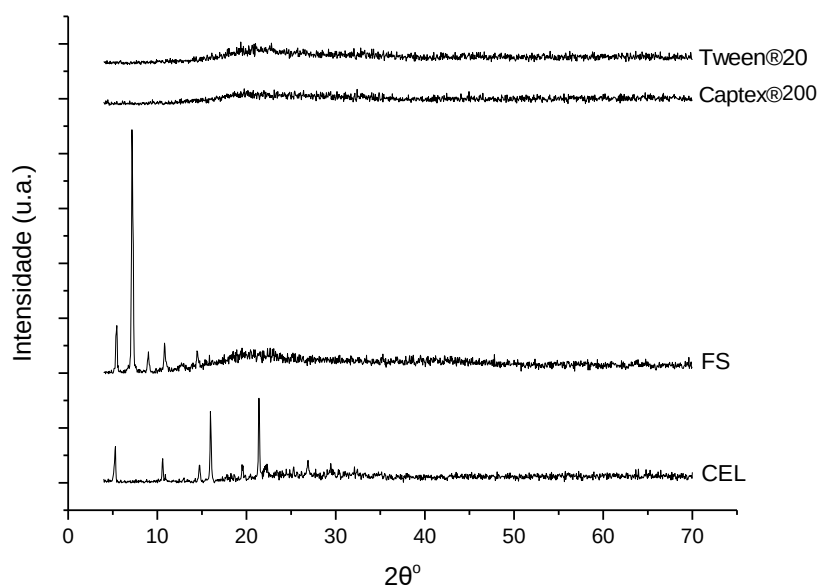
A distância das gotículas para as NEs com variação da razão O/T sem o fármaco é de 25,82 Å e, com a presença do fármaco, é de 5,84 Å. Essa diminuição da distância entre as gotículas indica uma mudança no deslocamento entre os objetos espalhadores, ou seja, uma mudança da distância entre as gotículas.

5.3.8 Difração de raios-X

Os raios-X são radiações eletromagnéticas que podem ser polarizadas, difratadas ou refletidas. A difração de raios-X é fundamentada na condição de interferência construtiva estabelecida pela lei de Bragg (Maradudin e Mills, 1975). A condição para interferência construtiva da radiação X refletida pelos planos cristalinos de um cristal é que, para um determinado comprimento de onda, o raio refletido emergirá apenas nos ângulos satisfatórios. Cada pico de difração é produzido por um conjunto de planos. Conjuntos semelhantes estão dispostos no cristal de acordo com a sua simetria; assim o arranjo dos pontos reflete a simetria do cristal, permitindo a identificação dos compostos cristalinos (Silva, 2013).

Na figura 36 estão representados os difratogramas de todos os componentes das NEs.

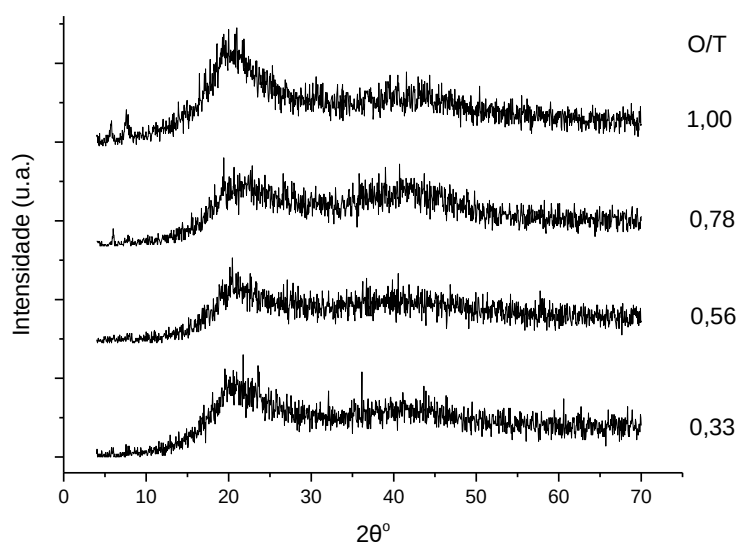
Figura 36: Difratomogramas dos componentes isolados: Tween®20, Captex®200, FS e CEL.



Pode-se observar que o Tween®20 e o Captex®200 apresentam estruturas amorfas, enquanto que a FS e o CEL apresentam evidentes picos de cristalinidade.

Na figura 37 estão apresentados os difratogramas da mistura física dos componentes das NEs, acumulados em função das razões O/T das NEs.

Figura 37: Difratomogramas da mistura física dos componentes das NEs.



Na comparação dos resultados das Figuras 36 e 37, ficou evidente que, mesmo nas misturas físicas, as cristalinidades do CEL e também da FS foram bastante minimizadas, quase que suprimidas, mesmo não existindo organização estrutural dos componentes das NEs.

Independentemente da presença de CEL, os difratogramas apresentados nas Figuras 38 e 39 mostram que, após a irradiação de ultrassom e formação das NEs, todas as amostras apresentaram estruturas amorfas, com ausência de picos de cristalinidade, sendo os cristalogramas muito semelhantes entre si.

É possível ressaltar que a organização estrutural da NEs exerceu um papel extremamente importante na supressão da cristalinidade dos componentes das formulações, independentemente da presença de CEL.

Figura 38: Difratogramas das NEs na ausência do fármaco.

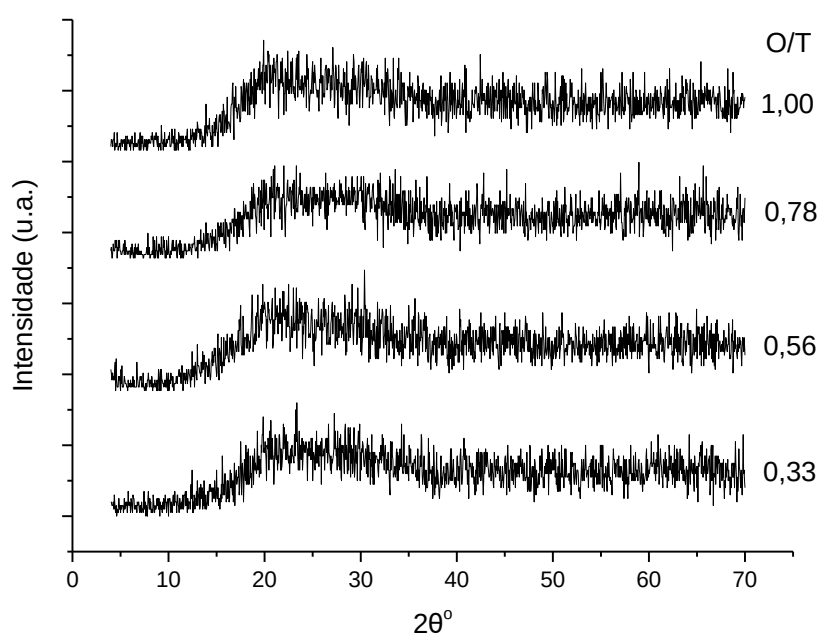
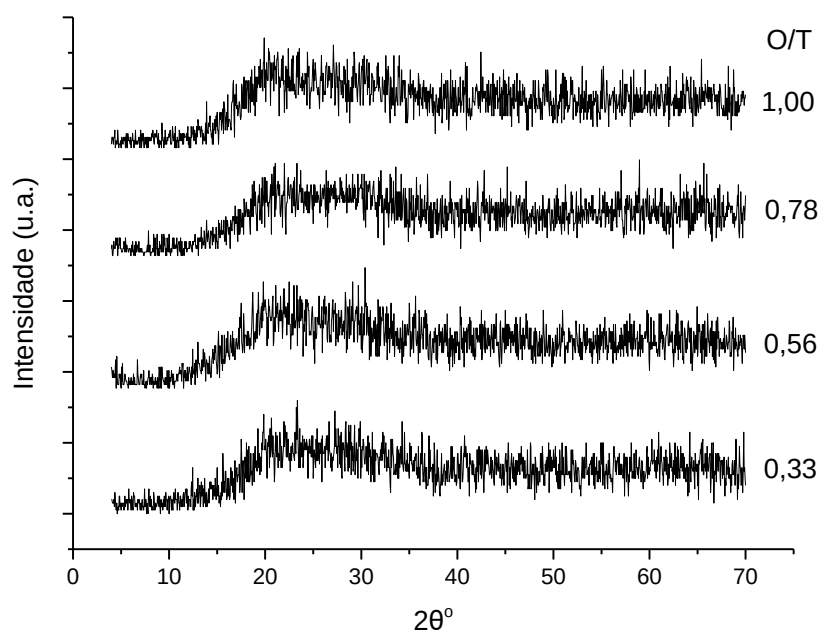


Figura 39: Difratomogramas das NEs na presença de 30 mg/mL do fármaco.



Este conjunto de dados associados ao caráter líquido das nanoemulsões revela a característica amorfa dos sistemas, um perfil altamente desejável para sistemas nanoemulsionados e emulsionados, principalmente em se tratando de medicamentos injetáveis (Silva *et al.*, 2014).

5.3.9 Determinação da estabilidade física das NEs

A literatura relata que, quando se modifica progressivamente a composição de uma mistura de solventes imiscíveis, as mudanças que produzirão na dispersão coloidal podem ser traduzidas por importantes variações nas propriedades termodinâmicas dos componentes que a compõem (Oliveira *et al.*, 2004)

Dessa forma, a caracterização através do diâmetro médio das gotículas, Pdl e do Potencial Zeta pode ser uma ferramenta importante para avaliar as nanoemulsões.

Os resultados apresentados nas Figuras 40 a 43 foram determinados utilizando técnica de espalhamento dinâmico de luz e Potencial Zeta e mostram a estabilidade das NEs em função do tempo. A análise estatística foi realizada por ANOVA com pós teste de Tukey e barras de erro são médias $\pm$ DPR, * $p < 0,05$.

Figura 40: Estabilidade da NE A (O/T 0,33).

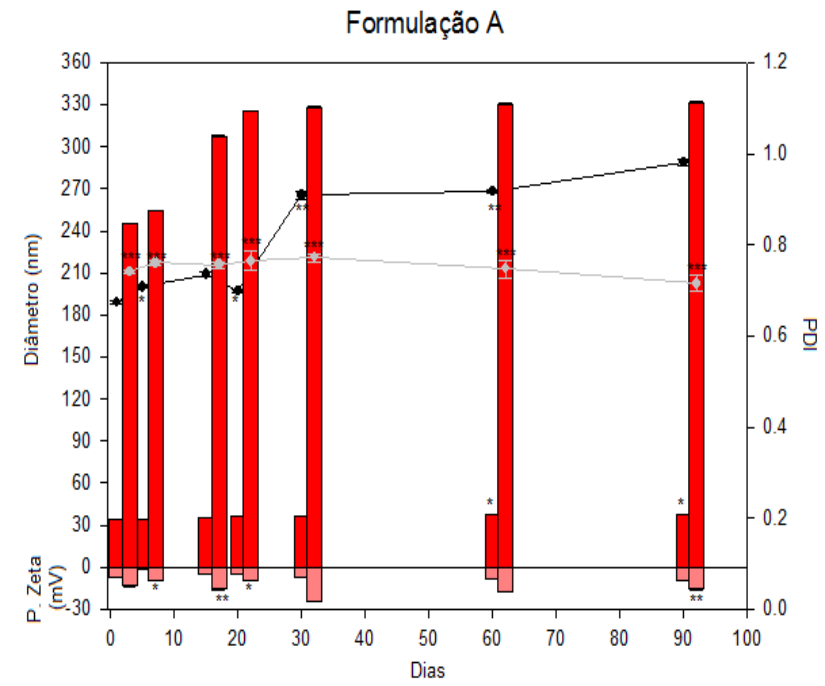


Figura 41: Estabilidade da NE B (O/T: 0,56).

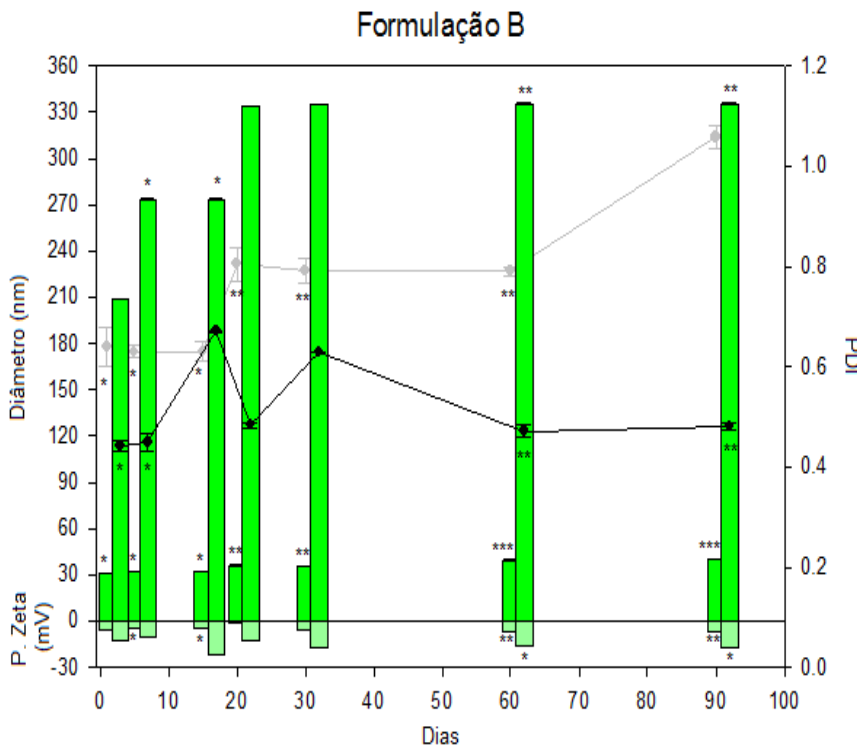
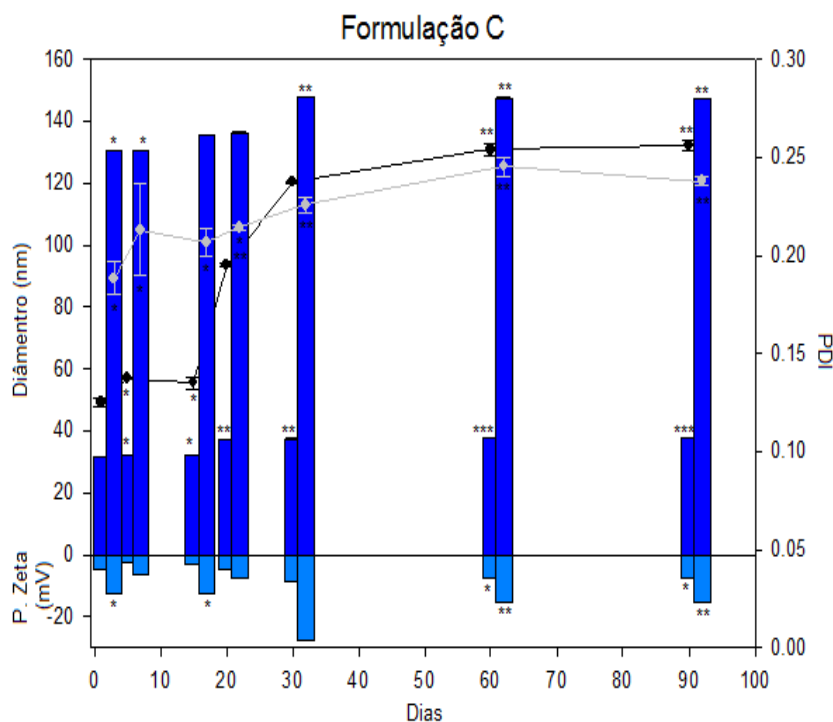
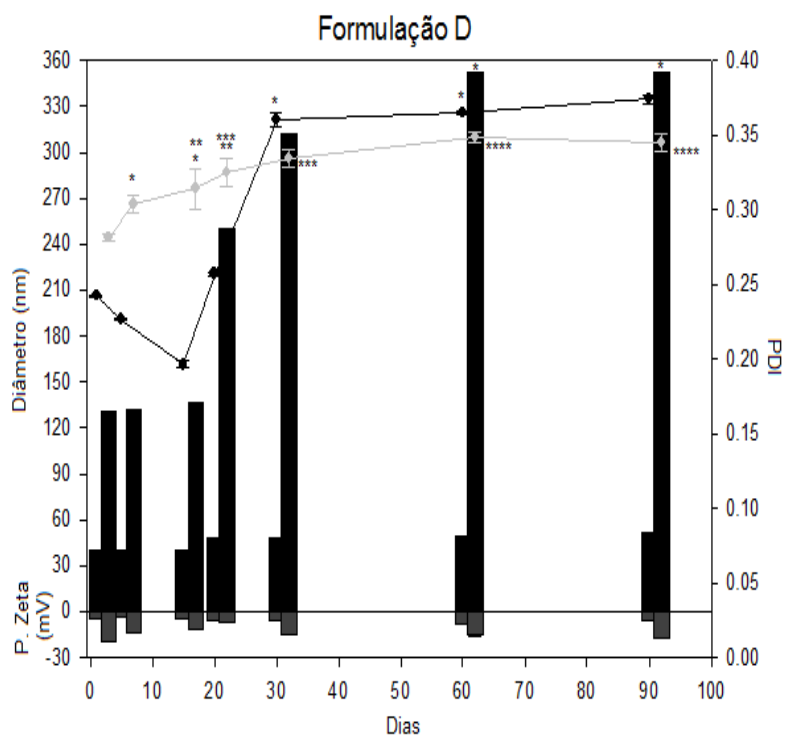


Figura 42: Estabilidade da NE C (O/T: 0,78).**Figura 43: Estabilidade da NE D (O/T: 1,00).**

Nota: nas Figuras 40 a 43 as barras ascendentes menores representam o diâmetro médio da gotícula nos sistemas antes da incorporação do CEL e as barras ascendentes maiores com o fármaco já adicionado. A linha preta representa o Pdl das NEs sem o CEL e a linha cinza as NEs com o CEL. As barras descendentes menores representam o Potencial Zeta dos sistemas sem o fármaco e as barras descendentes maiores com o CEL incorporado ao sistema.

Da análise dos resultados da Figura 40, é possível observar que, na ausência de CEL, a NE A (razão O/T = 0,33) apresentou estabilidade do diâmetro médio da gotícula e do Potencial Zeta durante todo o tempo experimental. A análise do Pdl mostra que somente na ausência de fármaco, a formulação apresentou-se estável. Na presença de CEL a formulação apresentou aumento do índice de polidispersidade a partir do 1º mês, sugerindo uma população bimodal dos agregados supramoleculares.

Na Figura 41, observa-se que a NE B (razão O/T = 0,56) na ausência e na presença do fármaco, apresentou estabilidade do diâmetro médio tanto da gotícula como do Potencial Zeta. A partir do 20º dia, ambas as formulações, contendo ou não CEL, não apresentaram estabilidade devido, ao alto valor do Pdl e ao aumento do diâmetro médio das gotículas.

É possível observar na Figura 42, a formulação C (razão O/T = 0,78) apresentou estabilidade em todos os parâmetros avaliados. Ambas as formulações ausente de CEL e incorporada, mostraram bons resultados durante todo o tempo de análise: o diâmetro médio das gotículas se manteve em torno de 40 e 140 nm com Pdl na faixa de 0,25, respectivamente.

A Figura 43 representa os resultados de estabilidade da NE D e nos mostra que todos os parâmetros não apresentaram correlação durante o tempo determinado de teste.

Todos os sistemas, independente da presença de fármaco, tiveram aumento do diâmetro médio das gotículas, que foi estabilizado a partir do 2º mês, o que pode ser observado através dos asteriscos (*), os quais indicam que as medidas não tiveram diferenças significativas entre si. Este resultado está diretamente relacionado à termodinâmica do sistema, uma vez que foi fornecida energia às amostras, através do uso do ultrassom para a obtenção dos sistemas nanoemulsionados. Assim, as amostras provavelmente estão entrando em equilíbrio termodinâmico pois, ainda há energia livre na interface óleo/água, levando ao aumento do diâmetro médio das gotículas até a sua completa estabilização (Franzini, 2006).

Por fim, diante dos resultados apresentados, a NE C demonstrou ter melhor estabilidade física durante os 3 meses de ensaio.

5.4 ANÁLISE DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* E MODELOS CINÉTICOS

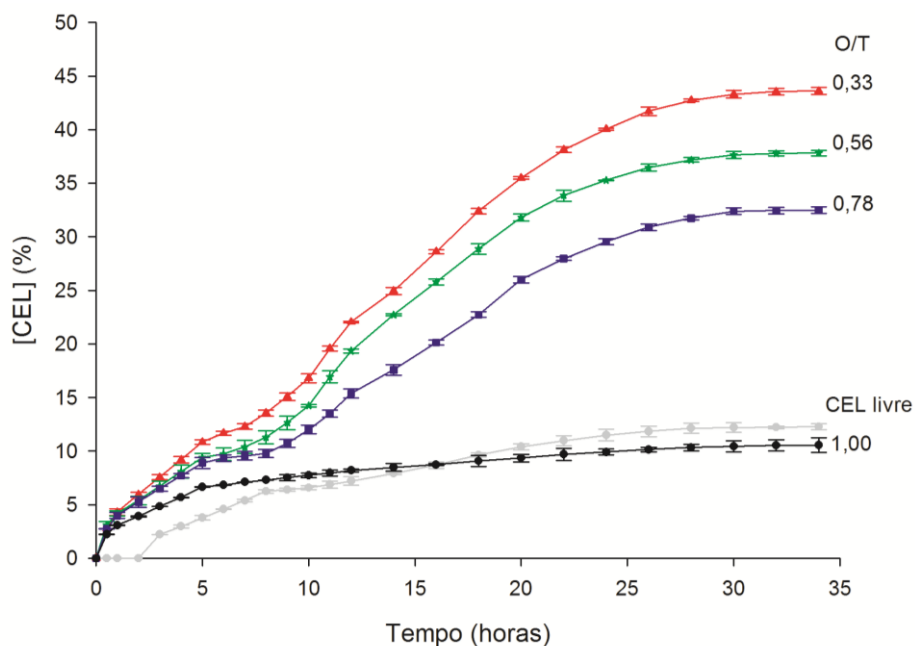
O estudo da liberação *in vitro* de fármacos a partir de sistema coloidais não é uma tarefa trivial. Para isso, existem poucos métodos para avaliar a liberação de fármacos,

entre os quais a técnica que utiliza membranas de difusão e o método *in situ*. Este último apresenta desvantagens, já que a formulação é colocada num compartimento (geralmente meio aquoso) com consequente diluição, o que dificulta a manutenção de sua estrutura original. Ao contrário, o método que utiliza membrana de difusão, evita essas variações na estrutura (Grassi *et al.*, 2006).

Para avaliar a liberação *in vitro* foi utilizado o modelo de difusão através da membrana. No ensaio, inicialmente o meio receptor encontra-se totalmente livre de fármaco. Nos tempos iniciais de liberação (C_0) o fármaco deve estar predominantemente contido nas gotículas da fase oleosa, ou seja, na fase interna das NEs. Nas fases posteriores, o fármaco inicia sua saída das gotículas e se acumula na superfície da membrana gerando um gradiente de concentração para a difusão. Nesta etapa, o CEL é liberado das gotículas de fase oleosa para fase aquosa externa das NEs e acumula na membrana. Na sequência, o CEL deve difundir através da membrana de acetato de celulose para o meio receptor, de onde deve ser coletado e quantificado (Silva, 2013).

Na escolha do meio receptor para formas de liberação prolongada de fármacos pouco solúveis, pode-se utilizar um agente solubilizante como, por exemplo, uma substância tensoativa para acelerar o processo de liberação. Para garantir que o processo de liberação do CEL, a partir das NEs, não fosse influenciado pela baixa solubilidade do fármaco no meio externo, utilizou-se o laurilsulfato de sódio a 0,15% (m/v) no meio receptor.

A Figura 44 mostra o perfil de liberação do CEL nas NEs com variação da razão O/T.

Figura 44: Perfil de liberação do CEL nas NEs com variação da razão O/T

Estudos mostraram que a farmacocinética do celecoxibe em suspensão depois de uma administração periocular em ratos, o tempo de meia vida do fármaco na retina foi de 6 horas e a principal via de eliminação foi a circulação periocular e linfática (Amrite *et al.*, 2010).

Outro estudo farmacocinético observou que a administração intravítrea em coelhos de uma solução do CEL em DMSO apresentou tempo de meia vida do fármaco no humor vítreo e na retina de 24 horas (Kim *et al.*, 2014); e nesse tipo de administração, o fármaco é eliminado pela via anterior ou pela via posterior. A rota anterior envolve a difusão do fármaco através do vítreo para o humor aquoso através de espaços zonulares seguidos de eliminação através de troca aquosa e fluxo sanguíneo uveal. A via posterior envolve a permeação dos fármacos através da barreira hemato-retiniana, exigindo ótima permeabilidade passiva ou mecanismos de transporte ativo. Como resultado, a lipofilicidade e uma alta massa molecular tendem a aumentar a meia vida dos fármacos no humor vítreo (Urtti, 2006).

Assim, a liberação do CEL na retina pode ser sustentada por períodos prolongados através do uso de sistemas nanoemulsionados, os quais a liberação do fármaco do seu veículo ocorre lentamente após a sua administração e uma vez liberado, o fármaco, por ser lipofílico, não se dissolve no humor vítreo, vindo a precipitar e a manter suas concentrações terapêuticas na retina.

Verifica-se que a liberação *in vitro* do CEL livre (não nanoemulsionado) seguiu um perfil descrito por uma curva de saturação com liberação inicial lenta e liberando após 3 horas de ensaio para atingir um patamar no espaço de tempo de 30 horas de acompanhamento do experimento. Entretanto, na presença de nanoemulsão, esse perfil foi modificado devido à inclusão do CEL nas gotículas de fase oleosa. Esse procedimento prolonga a meia vida do fármaco, permitindo a sua atuação no local da doença (Lee *et al.*, 1995).

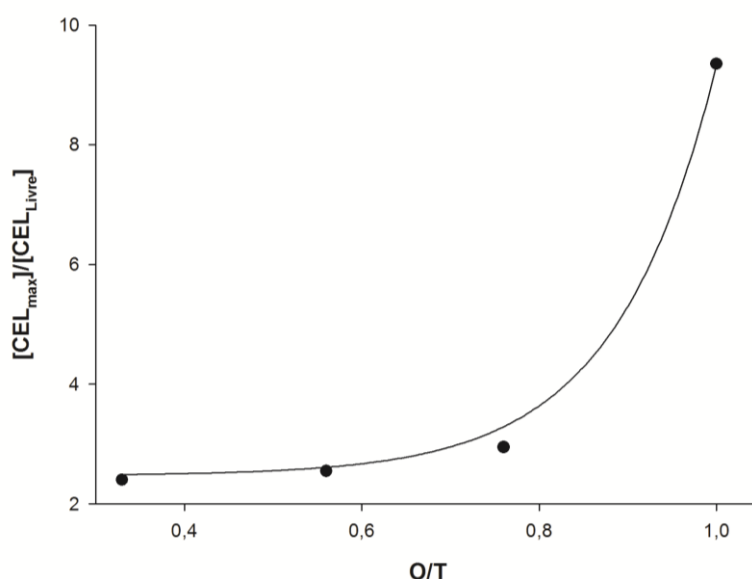
Independentemente do volume da fase no sistema, o perfil de liberação do CEL, apresentou curvas de saturação com pouco efeito inicial e aumento subsequente até atingir uma região de platô, onde temos liberação máxima do fármaco devido ao efeito solubilizante do próprio tensoativo na interface das gotículas oleosas com o meio dispersante.

Também se pode notar que, com o aumento da razão O/T, há uma diminuição da taxa de liberação, indicando claramente maior dificuldade de saída do CEL das gotículas de fase oleosa devido ao aumento da interação do fármaco com as gotículas da fase oleosa. A formulação com maior razão O/T liberou 10,54% ao final do ensaio enquanto que a formulação de menor razão O/T liberou 43,60%.

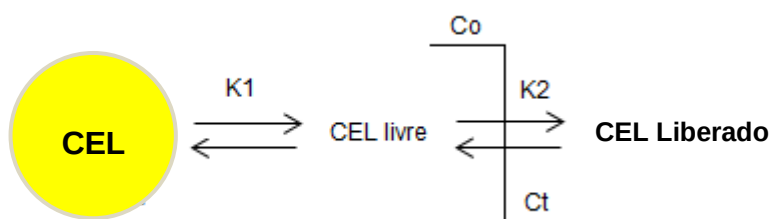
A ausência de efeito *burst* é desejável e é devido à interação do fármaco lipofílico com a fase interna das NEs, possibilitando que o CEL fique retido nas gotículas devido à maior estabilidade termodinâmica na fase oleosa.

Para uma melhor visualização do efeito que as variações da razão O/T exercem nas NEs, a Figura 45 mostra a liberação máxima obtida no tempo de 30 horas.

Figura 45: Efeito da razão O/T na relação entre a quantidade máxima de CEL incorporada nos sistemas nanoemulsionados e do CEL livre.



O processo global de liberação do CEL, a partir do sistema nanoemulsionado, pode ser sumarizado através do Esquema II.



Esquema II: C_0 refere-se à concentração inicial de fármaco na membrana (tempo zero) e C_t refere-se à concentração de fármaco liberado num tempo t . K_1 refere-se à constante de liberação do fármaco das gotículas para o meio externo da nanoemulsão e K_2 refere-se à constante de permeação do fármaco através da membrana.

Do esquema II, pode-se constatar que o processo de liberação *in vitro* deve ocorrer em duas etapas, governadas pelas constantes de equilíbrio K_1 e K_2 . A constante K_1 refere-se à etapa de saída do CEL das gotículas de fase oleosa da NE, gerando a forma livre do fármaco e a constante K_2 está relacionada com a permeação do CEL através da membrana de acetato de celulose, a qual vai gerar a forma liberada do CEL no compartimento receptor do equipamento de liberação. Desta forma, se a constante $K_1 < K_2$, a etapa de saída do CEL das gotículas da fase oleosa da NE será lenta, de forma que o acúmulo do CEL livre na superfície da membrana será lento e, então o processo global de liberação deverá ser controlado pelo sistema de liberação.

Ao contrário, se $K_1 > K_2$, a saída do fármaco do interior das gotículas de fase oleosa será mais rápida e o acúmulo de CEL livre na superfície da membrana também será rápido, criando um gradiente de concentração na membrana suficiente para que ocorra a difusão do CEL livre através da membrana. Dessa forma, o processo global de liberação será dependente exclusivamente do coeficiente de difusão da membrana e o sistema de liberação não terá influência na formação do CEL liberado.

Nestas condições esses parâmetros podem ser usados como meios eficazes para o controle da velocidade de liberação de fármacos hidrofóbicos, a partir de nanoemulsões O/A, evidenciando a característica de sistemas reservatórios das NEs, permitindo uma liberação lenta e proporcionando um efeito prolongado (Oliveira *et al.*, 2004; Grassi *et al.*, 2006)

Foram aplicados modelos matemáticos nos perfis de liberação, com o objetivo de descrever o mecanismo de liberação a partir de cada formulação. Um método utilizado para escolher o melhor modelo de liberação de fármacos é o coeficiente de correlação r^2 . O modelo matemático que melhor descreve o perfil de liberação é aquele que apresenta o melhor coeficiente de correlação e que se ajuste ao perfil de liberação obtido (Costa e Lobo, 2001).

Os modelos matemáticos utilizados foram: o modelo de Korsmeyer-Peppas, Higuchi, Hixson/Crowell e Weibull (Singhvi e Singh, 2011).

Korsmeyer *et al.* (1983) derivaram uma relação simples que descrevia a liberação de fármacos de um sistema polimérico. Para descobrir o mecanismo de liberação de medicamentos, os primeiros dados da liberação de 60% do princípio ativo foram adicionados no modelo de Korsmeyer-Peppas através da Equação 11 (Korsmeyer *et al.*, 1983).

$$M_t / M_\infty = K \times t^n \quad (\text{Equação 11})$$

Onde:

M_t/M_∞ = fração do fármaco liberado no tempo t ;

K = taxa (velocidade) de liberação;

n = expoente difusional.

O valor de n é utilizado para caracterizar diferentes mecanismos de liberação. Valor de $n = 0,45$ significa que a liberação é uma difusão Fickiana; valores de n maiores que 0,45 e menores que 0,89 significam difusão não-Fickiana (processos de

difusão e intumescimento estão envolvidos neste tipo de liberação); valor de $n = 0,89$ significa que os processos de intumescimento e/ou relaxamento são limitantes da liberação. E, por fim, valores de n maiores que 0,89 significam um alto grau de mobilidade das cadeias poliméricas ou erosão (Singhvi e Singh, 2011).

Idealmente, sistemas controlados de liberação de medicamentos deve liberar o fármaco a uma taxa controlada ao longo de uma duração desejada. O objetivo primário dos sistemas de liberação controlada de medicamentos deve garantir a segurança e melhorar eficácia dos medicamentos, bem como melhorar a conformidade do paciente (Singhvi e Singh, 2011).

Há mais de cinquenta anos Higuchi publicou a derivação de uma equação que permitiu a quantificação da liberação do fármaco a partir de filmes finos de pomada, contendo fármaco finamente disperso em uma pele perfeita, relacionando a taxa de liberação do fármaco com constantes físicas baseadas em simples leis de difusão (Higuchi, 1961). A taxa de liberação para ambas as superfícies, como planar e esférica foi considerada. A análise sugeriu que, no caso de gotículas esféricas, o tempo necessário para liberar 50% do fármaco era normalmente esperado 10% do tempo necessário para dissolver o último traço de fármaco sólido no centro da gotícula (Higuchi, 1961; Singhvi e Singh, 2011).

Higuchi foi o primeiro a derivar a equação para descrever a proporcionalidade direta entre a quantidade cumulativa do fármaco liberado e a raiz quadrada do tempo baseado em difusão Fickiana, como pode ser visto na Equação 12 (Higuchi, 1961; Singhvi e Singh, 2011).

$$Q_t = k_H \times t^{0,5} \quad (\text{Equação 12})$$

Onde:

Q_t = quantidade do fármaco liberado no tempo t ;

k_H = taxa de liberação constante para o modelo de Higuchi.

Hixson e Crowell (1931) reconheceram que o área regular das partículas é proporcional à raiz cúbica do seu volume e, assim, eles derivaram a equação:

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = k \times t \quad (\text{Equação 13})$$

Onde:

W_0 = quantidade inicial do fármaco na forma farmacêutica;

W_t = quantidade remanescente do fármaco na forma farmacêutica no tempo t ;

k = constante incorporando a relação superfície-volume.

t = tempo

A equação descreve a liberação de sistemas onde há uma mudança na superfície de área e diâmetro das partículas ou gotículas. Para estudar a cinética de liberação, dados obtidos dos estudos de liberação *in vitro* de fármacos foram plotados como raiz cúbica da porcentagem do fármaco restante na matriz *versus* tempo (Dash *et al.*, 2010).

O modelo de Weibull descreve perfis de liberação onde o fármaco encontra-se acumulado no meio e pode ser descrito pela Equação 14:

$$M_t / M_\infty = 1 - \exp(-K \times t^b) \quad (\text{Equação 14})$$

Onde:

M_t/M_∞ = fração do fármaco liberado no tempo t ;

K = taxa (velocidade) de liberação;

b = expoente difusional.

t = tempo

O valor de b é utilizado para caracterizar diferentes mecanismos de liberação, onde, para valores de $b < 0,75$, a liberação segue o modelo de difusão Fickiana. Para a difusão Fickiana, o aumento de valores de b reflete a diminuição da desordem do meio. Para valores de $0,75 < b < 1,00$ significa que há uma combinação de mecanismos e uma liberação que segue o modelo de difusão não-Fickiana. E valores de $b > 1,00$ indica que o mecanismo de liberação é complexo, podendo ser difusão, intumescimento e/ou erosão (Papadopolou *et al.*, 2006).

Nas Tabelas 27 e 28 é possível analisar que o modelo matemático que apresentou uma boa correlação foi o modelo de Weibull, mostrando um r^2 maior que 0,99. Ao observar os gráficos fitados na Figura 46 nota-se o ajuste do modelo de Weibull à liberação das NEs.

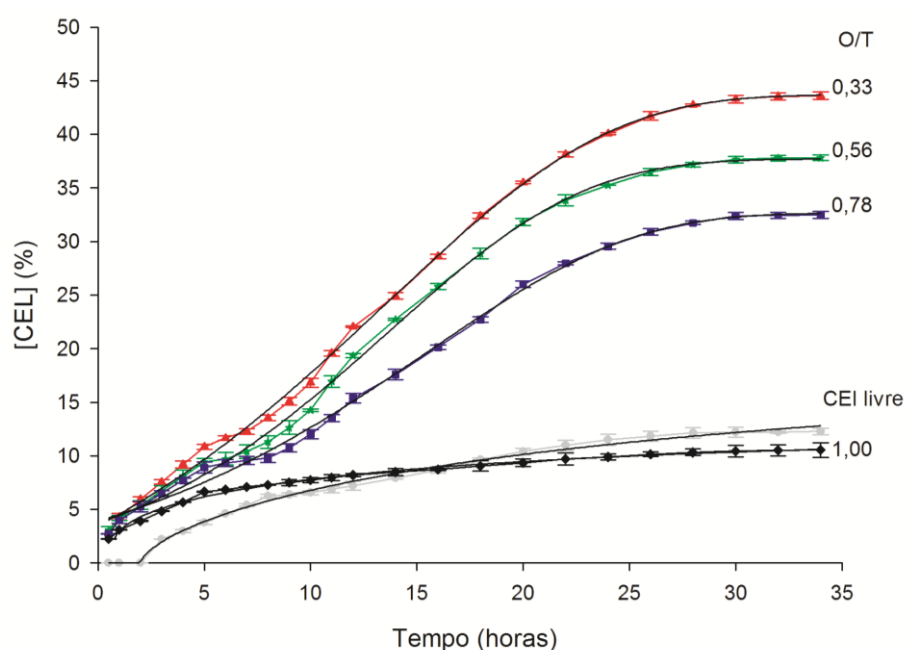
Tabela 27: Dados dos modelos matemáticos de Korsmeyer-Peppas e Higuchi para caracterizar a cinética de liberação das NEs.

NEs	O/T	Modelos cinéticos				
		Korsmeyer-Peppas			Higuchi	
		r^2	k	n	r^2	k
CEL livre	-	0,9631	1,4307	0,6394	0,9338	2,1616
A	0,33	0,9789	3,2712	0,7644	0,9022	7,1963
B	0,56	0,9701	2,8940	0,7612	0,8950	6,3047
C	0,78	0,9772	2,4130	0,7636	0,9070	5,2978
D	1,00	0,9797	3,6519	0,3137	0,7819	2,1260

Tabela 28: Dados dos modelos matemáticos de Hixson/Crowell e Weibull para caracterizar a cinética de liberação das NEs.

NEs	O/T	Modelos cinéticos				
		Hixson/Crowell			Weibull	
		r^2	k	r^2	k	b
CEL livre	-	0,8563	0,0016	0,9951	18,6757	0,6803
A	0,33	0,9710	0,0061	0,9984	52,7858	0,8425
B	0,56	0,9583	0,0052	0,9979	38,3833	0,7617
C	0,78	0,9505	0,0043	0,9966	34,9496	0,2425
D	1,00	0,0000	0,0015	0,9947	10,1871	0,6105

Figura 46: Curvas de liberação das NEs com variação da razão O/T fitados com o modelo de Weibull.



Essa boa correlação entre o modelo cinético e as curvas de liberação pode ser explicada conforme a razão O/T diminui, aumenta também a taxa de liberação (valor de k) e este dado é compatível porque o aumento da velocidade de liberação está relacionado com a diminuição do número de gotículas por unidade de volume, o que

indica um volume de fase reduzido. Assim, nas formulações que apresentam um volume de fase menor, o número de gotículas pode não ser suficiente para associar todas as moléculas de CEL, favorecendo sua liberação.

5.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI-ANGIOGÊNICA DO CEL UTILIZANDO MODELO ANIMAL PEIXE-ZEBRA.

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de células endoteliais e musculares lisas (formam o revestimento interno e externo dos vasos) que crescem em resposta a sinais específicos ou fatores (Hanahan e Weinberg, 2011). Este processo é fundamental em muitas condições patológicas como o câncer, inflamação e formação de metástases (Pesca *et al.*, 2012). A angiogênese é um processo funcionalmente relacionado, pois ambos envolvem etapas fisiopatológicas como mobilidade celular, proteólise tecidual e proliferação celular, levando à formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes (Stockmann *et al.*, 2014).

Os ensaios de angiogênese são utilizados com objetivo de testar a eficácia dos agentes pró-angiogênicos (fator de crescimento endotelial vascular - VEGF) e anti-angiogênicos (endostatinas) (Tarallo *et al.*, 2011). Dentre as inúmeras moléculas indutoras da angiogênese, se destaca o VEGF, que se constitui em uma família de moléculas mitogênicas endoteliais, com participação central na regulação da proliferação vascular, podendo ter sua expressão induzida ou reprimida conforme a oxigenação tecidual (Oliveira *et al.*, 2010).

Estudos anteriores nos mostram que o CEL tem sido investigado para o tratamento de DMRI, RD e OVR. Sendo assim, para verificar se o CEL livre e incorporado à nanoemulsão alteraria o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos nos olhos, realizou-se um exame farmacológico no peixe-zebra (Lawson e Weinstein, 2002).

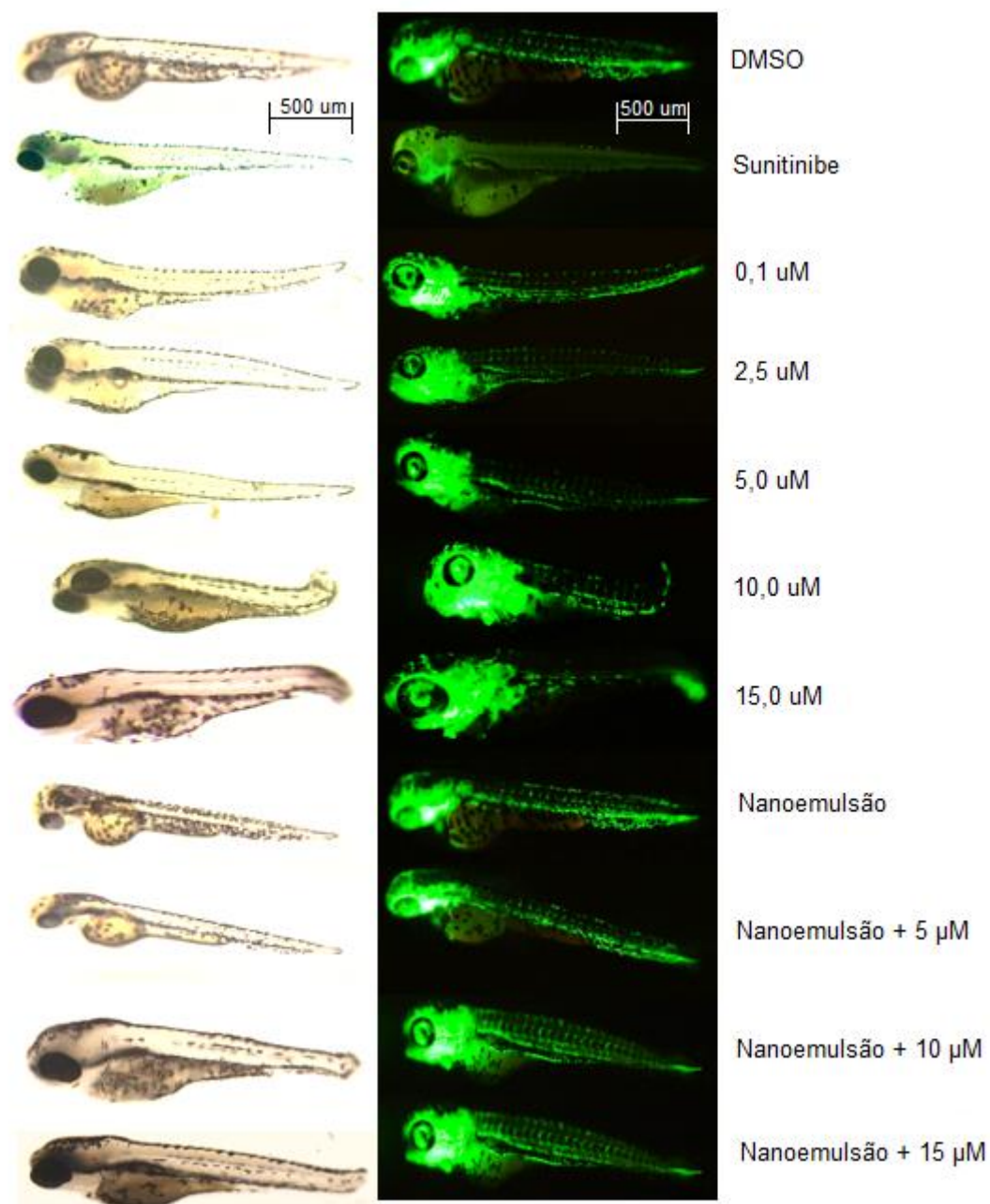
O modelo animal de experimentação científica, o *Danio rerio*, conhecido como *zebrafish* ou peixe-zebra que é uma das espécies de vertebrados que mais tem sido utilizada em estudos relacionados a diversos campos científicos, como na investigação do câncer e em doenças onde o VEGF está elevado. As características como a fácil manutenção e reprodução, alta fecundidade (200-500 ovos/acasalamento), desenvolvimento rápido, e homologia com os mamíferos são as principais razões para o interesse do meio científico no *zebrafish* (Esch *et al.*, 2012; Karthik *et al.*, 2014).

O *zebrafish* provou ser um excelente modelo para estudar a visão por muitas razões. Primeiro, os mecanismos do desenvolvimento do olho é bem conservado. Em segundo lugar, a anatomia e composições funcionais dos sistemas visuais do peixe-zebra são semelhantes aos humanos. A retina do peixe-zebra contém o clássico arranjo de fotorreceptores, neurônios de primeira e segunda ordem, e glia, bem como o epitélio pigmentado da retina (RPE) e vasculatura retiniana. Embora as retinas de peixe-zebra não possuam mácula e apresentem arranjo mosaico altamente organizado de fotorreceptores, eles são, como nos humanos, rico em cone e otimizado para a atividade diurna. Em terceiro lugar, o sistema visual desenvolve-se rapidamente e são funcionais em 5 dias após a fertilização (dpf) nos peixe-zebra (Blanco-Sánchez *et al.*, 2017).

Ao analisar o desenvolvimento dos vasos sanguíneos intersegmentais das larvas Tg(fli1:EGFP), que expressam especificamente EGFP em todos os vasos sanguíneos, nota-se que independente da dose utilizada e do fármaco estar livre e incorporado à NE, o CEL não inibe o crescimento dos vasos, com exceção do fármaco livre com concentrações de 10 e 15 uM como pode ser visto na Figura 47 e 48.

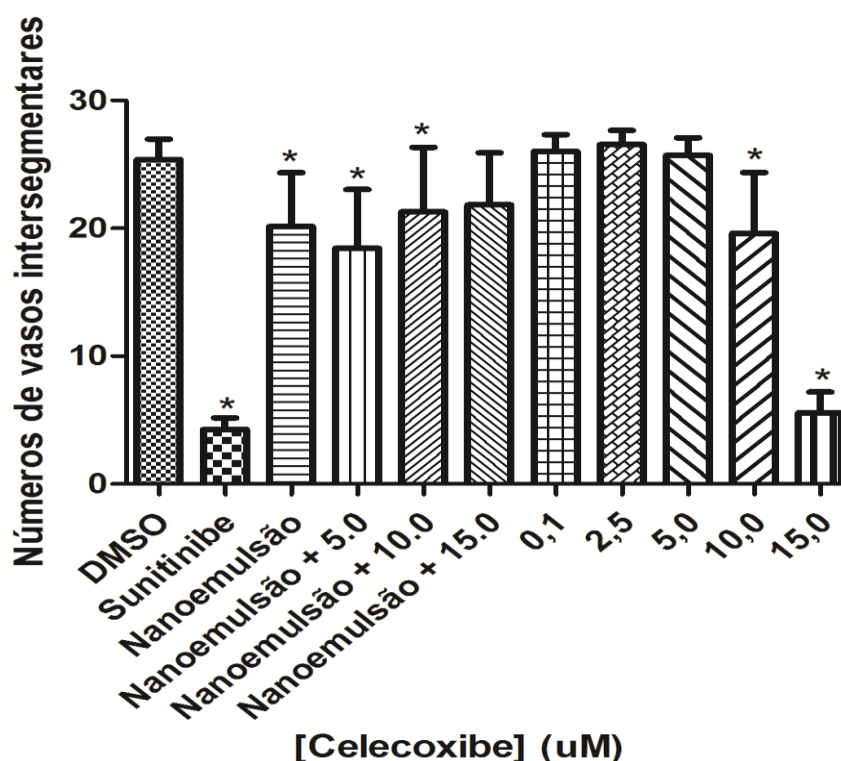
Porém, não podemos afirmar que de fato o CEL nessas concentrações promova uma inibição do crescimento vascular intersegmental pois, ao analisar as larvas no campo claro do microscópio, vimos que estas não apresentam um bom desenvolvimento físico incluindo edema, eixo do corpo dobrado e anomalias craniofaciais, o que sugere que o fármaco em altas concentrações pode ser tóxico para o peixe e causar más formações e isto irá interferir no crescimento dos vasos sanguíneos.

Figura 47: Imagens fluorescentes mostrando a integridade dos vasos sanguíneos intersegmentais GFP-positivos a 2 dpf em larvas tratadas com CEL livre e incorporado à NE e controles tratados com DMSO e Sunitinibe.



A análise global do total de larvas sugere que o tratamento anti-VEGF com CEL não tem efeito significativo nos vasos inter-segmentares ou do tronco, que se desenvolvem mais cedo do que a vasculatura hialoide ocular (Figura 49) (Lawson e Weinstein, 2002).

Figura 48: Gráfico hierárquico da bioatividade das amostras em uma concentração de 0,1 a 15,0 μM do CEL livre e incorporado às NEs e controles tratados com DMSO e Sunitinibe para inibir a angiogênese do desenvolvimento usando peixe-zebra Tg(fli1: EGFP).

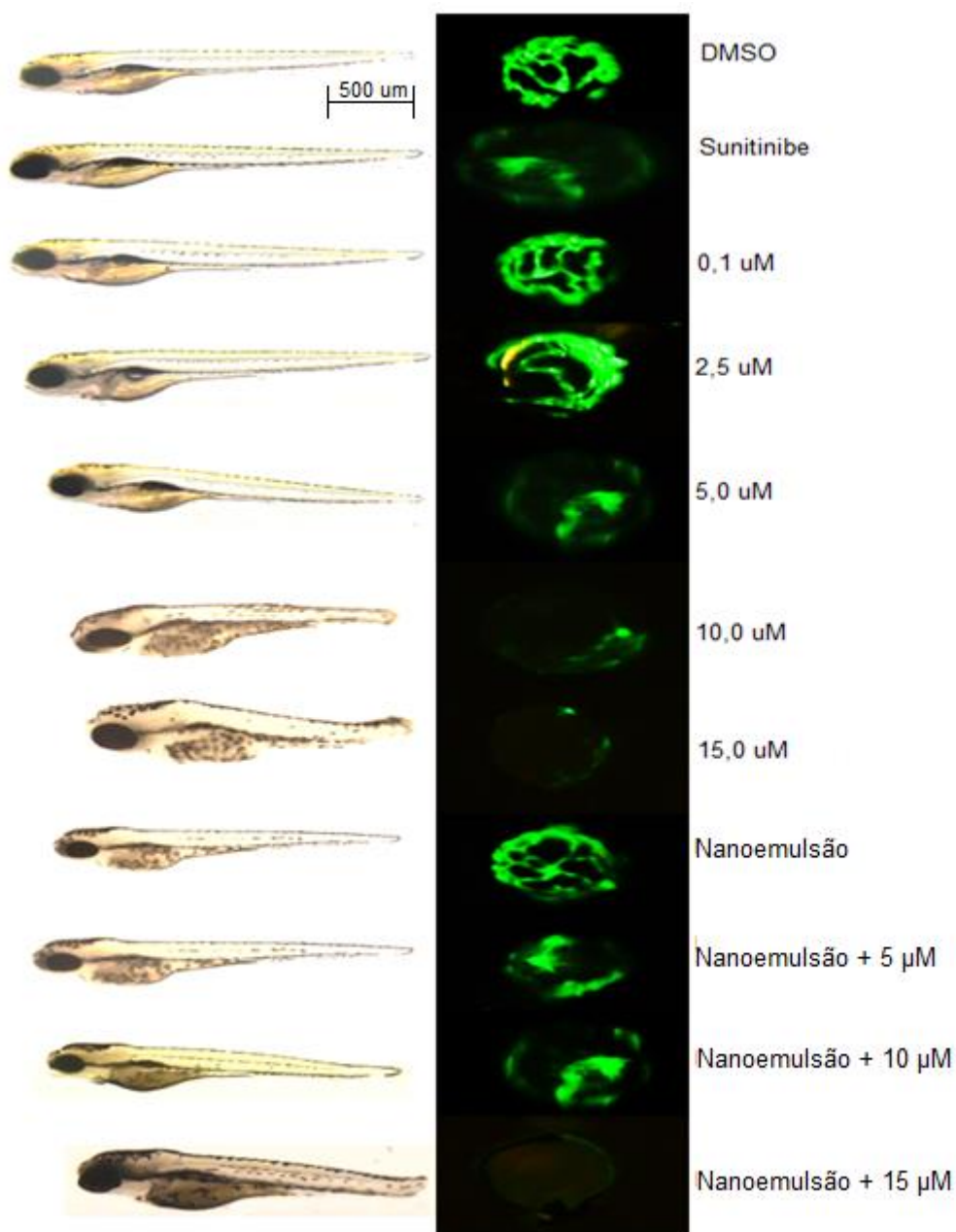


Nota: Os dados representados graficamente são traçados com a média e desvio padrão de 15 replicatas. A análise estatística foi realizada por ANOVA e post hoc de Dunnett. Barras de erro são médias $\pm$ DPR, * $p < 0,05$.

Larvas de Tg(fli1:EGFP) foram imersas em diferentes concentrações de fármaco livre e incorporado à NE a partir de 1 a 5 dias pós fertilização (dpf) e a integridade da vasculatura hialoide determinada por microscopia confocal de fluorescência das lentes dissecadas.

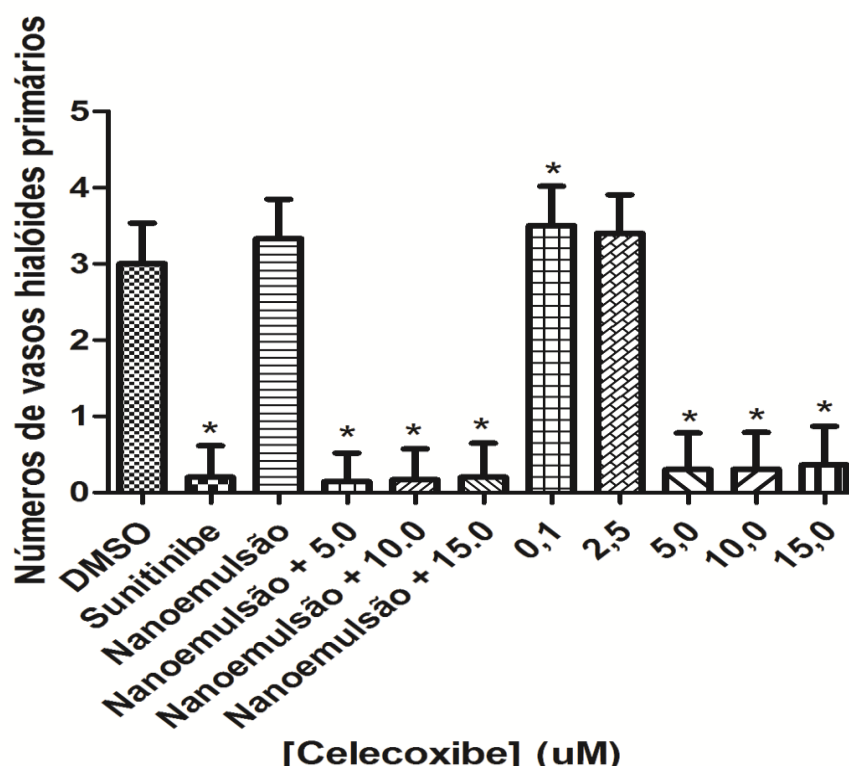
A análise da microscopia confocal de fluorescência demonstra que o tratamento com 5,0 μM de CEL reduz o número de ramificação e a padronização da vasculatura da hialoide e é observada ausência de defeitos morfológicos brutos nas larvas. Larvas incubadas de 10 a 15 μM , com o fármaco livre e incorporado exibe ocasionalmente edema leve, indicativo de efeitos colaterais sistêmicos, como pode ser visto na Figura 49.

Figura 49: Imagens fluorescentes que ilustram a integridade dos vasos sanguíneos da retina GFP-positivos a 5 dpf em larvas tratadas com CEL livre e incorporado à NE e controles tratados com DMSO e Sunitinibe.



O tratamento das larvas de 1 a 5 dpf, com um intervalo de concentrações, revela uma inibição dose-dependente da angiogênese do vaso da hialoide. Na concentração de 5,0 μM de CEL livre e incorporado à NE, as larvas não apresentam efeitos tóxicos e ocorre uma inibição estatisticamente significativa da angiogênese da hialoide (Figura 50).

Figura 50: CEL livre e incorporada resultam em inibição dose-dependente da angiogênese intraocular. As larvas Tg (fli1: EGFP) de 1 dpf foram tratadas com concentrações variando de 0,1 a 15,0 μ M e controles tratados com DMSO e Sunitinibe e o número de ramos primários de vasos hialóides foram determinados a 5 dpf.



Nota: Os dados representados graficamente são traçados com a média e desvio padrão de 15 replicatas. A análise estatística foi realizada por ANOVA e post hoc de Dunnett. Barras de erro são médias $\pm$ DPR, * $p < 0,05$.

Estes dados podem ser corroborados devido à hipótese para haver o bloqueio da angiogênese envolver a enzima COX-2.

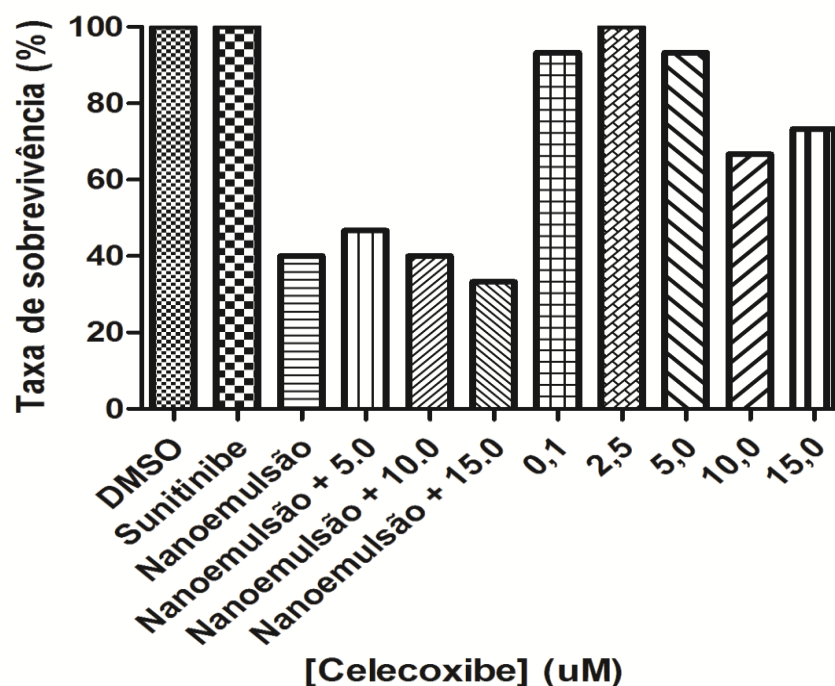
O CEL é um AINE e um inibidor específico de COX-2 (Amrite *et al.*, 2006). O aumento dos níveis de VEGF na DMRI e RD podem ser, pelo menos em parte, devido ao aumento da secreção de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas. No caso da RD, ela induz a produção de mediadores de inflamação através da via ciclooxygenase na retina. Os produtos do metabolismo da ciclooxygenase podem estimular a secreção de VEGF em células tumorais, células da retina cultivadas e tecidos cultivados (Amrite *et al.*, 2006). Assim, é provável que a inibição do sistema de enzimas COX-2 reduza a geração de prostaglandinas, a expressão de VEGF e o derrame vascular.

Estudos anteriores de sequenciamento genético foram feitos para verificar se o peixe-zebra apresentava expressão do gene COX-2 (ptgs2a e ptgs 2b) na retina em 5 dpf e de acordo com Grosser *et al.* (2002) os embriões apresentaram expressões

diferenciadas da enzima zCOX-1 e zCOX-2 em estruturas do olho em desenvolvimento (Grosser *et al.*, 2002). Assim, podemos concluir que o CEL atua bloqueando a COX-2, que conseqüentemente inibe o crescimento dos vasos sanguíneos oculares.

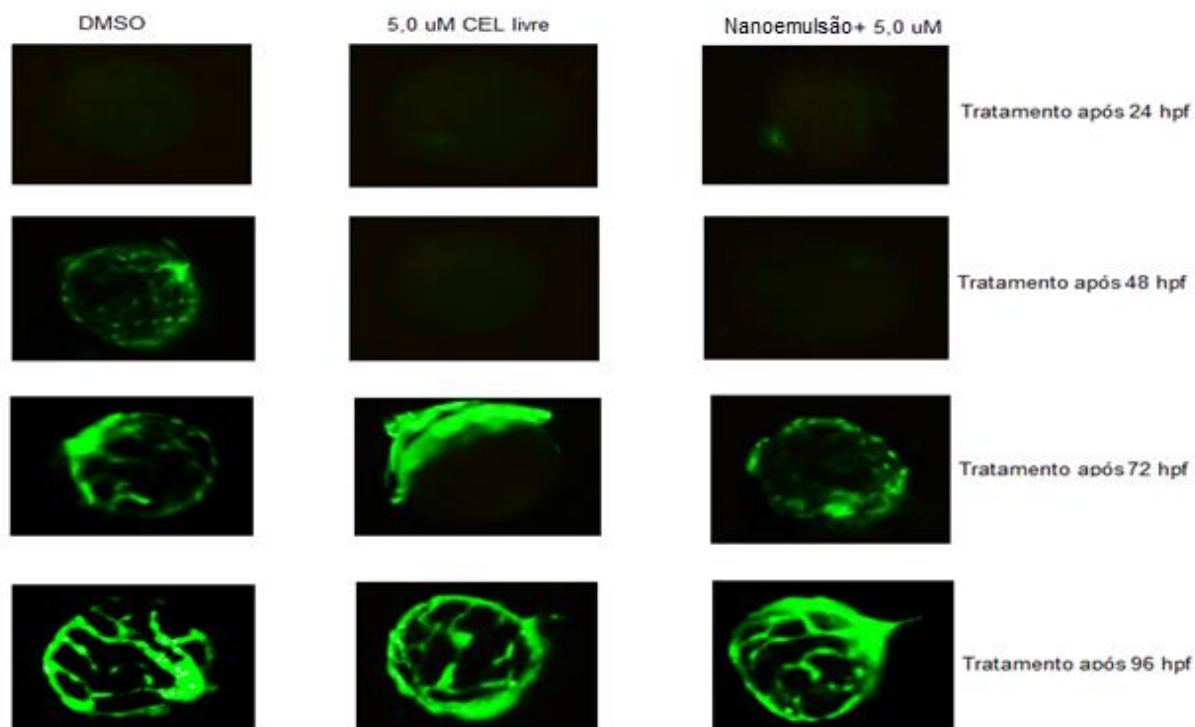
Devido à toxicidade em altas concentrações do fármaco livre, observa-se uma diminuição do número de larvas viáveis ao experimento. Também é possível notar que, ao administrar o fármaco incorporado à NE a taxa de sobrevivência das larvas ao final do ensaio diminui quase pela metade (Figura 51). Isso deve-se ao fato de que a nanoemulsão apresenta, em sua composição, elevada taxa de fase oleosa associada a tensoativo e co-tensoativo o que pode levar a um bloqueio da entrada de oxigênio no meio onde as larvas são criadas.

Figura 51: Taxa de sobrevivência das larvas após 5 dpf tratadas com CEL livre e incorporado à NE e controles tratados com DMSO e Sunitinibe.



Para determinar se o CEL inibe a angiogênese da hialoide durante um período de desenvolvimento específico, larvas Tg(fli1: EGFP) de 1-4 dpf foram tratadas por 24, 48, 72 e 96 horas com CEL livre e incorporado à NE com concentração de 5 μ M para ambas as condições e a vasculatura hialoide analisada a 5 dpf (Figura 52).

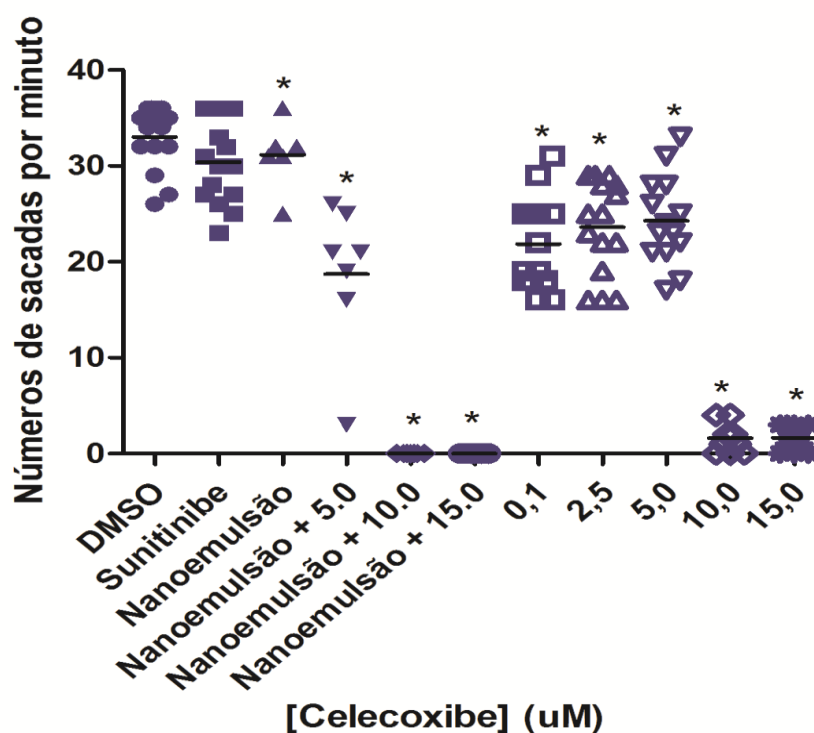
Figura 52: Inibição dependente do tempo do desenvolvimento e da angiogênese intraocular pelo CEL.



Ao comparar os resultados com o controle negativo (DMSO), após 48 e 72 hpf é possível notar, nas larvas tratadas com CEL livre e incorporado à NE, o efeito do fármaco na formação inicial da vasculatura hialoide, demonstrando que o CEL anula completamente o brotamento primário dos vasos. Entretanto, ao comparar o crescimento dos vasos da hialoide com as larvas tratadas com 96 hpf com o controle negativo, nota-se que não houve inibição dos vasos já formados, uma vez que estes vasos se formam com 2 a 3 dpf.

Estes resultados são consistentes com o CEL bloqueando a angiogênese do desenvolvimento de novos vasos hialoides, mas sem exercer nenhum efeito sobre os vasos intraoculares existentes.

Por fim, foi determinado se o tratamento com o CEL pode inibir a angiogênese intraocular, e fazê-lo sem efeitos colaterais sistêmicos ou efeitos sobre a função da retina. A função visual em larvas com 5 dpf foi analisada pela resposta optocinética (Figura 53).

Figura 53: Respostas optocinéticas (OKR) de larvas de 5 dpf.

Nota: Os dados representados graficamente são traçados com a média e desvio padrão de 15 replicatas. A análise estatística foi realizada por ANOVA e post hoc de Dunnett, * $p < 0.05$.

Neste ensaio, larvas com função visual normal rastreiam a rotação das listras em preto e branco através de sacadas reprodutíveis. Todas as amostras apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle com DMSO. Estes resultados indicam que a administração tanto do CEL livre e incorporado à NE podem bloquear seletivamente a angiogênese no olho; porém, com uma pequena depressão da função visual.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do desenvolvimento, da caracterização e da atividade anti-angiogênica específica ocular *in vivo* obtidos nesse trabalho indicam que a nanoemulsão é uma forma farmacêutica promissora para ensaios clínicos de fármacos com ação anti-inflamatória e anti-VEGF.

7. REFERÊNCIAS

- ABRAMOWITZ, M.; PARRY-HILL, M.; DAVIDSON, M. Polarized light microscopy. 2006. Disponível em: <
<http://www.microscope.fsu.edu/primer/java/polarizedlight/filters/index>>. Acesso em: 20 de outubro de 2018.
- ALS-NIELSEN, J. A. Diffraction, refraction and absorption of x-rays and neutrons: A comparative exposition. In: BARUCHEL, J.; HODEAU, J-L.; LEHMANN, M. (Ed.). **Neutron and Synchrotron Radiation for Condensed Matter Studies. Theory, Instruments and Methods**. Berlim: Springer-Verlag, 1994, v.1, p.3-33.
- ALVAREZ, Y.; ASTUDILLO, O.; JENSEN, L.; REYNOLDS, A. L.; WAGHORNE, N.; BRAZIL, D. P.; CAO, Y.; O'CONNOR, J. J.; KENNEDY, B. N. Selective inhibition of retinal angiogenesis by targeting PI3 kinase. **PloS One**, v. 4, n. 11, p. 7867-7877, 2009.
- AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.
- AMRITE, A.; PUGAZHENTHI, V.; CHERUVU, N.; KOMPELLA, U. Delivery of celecoxib for treating diseases of the eye: influence of pigment and diabetes. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 5, p. 631-645, 2010.
- AMRITE, A. C.; AYALASOMAYAJULA, S. P.; CBERUVU, N. P. S.; KOMPELLA, U. B. Single periocular injection of celecoxib-PLGA microparticles inhibits diabetes-induced elevations in retinal PGE2, VEGF, and vascular leakage. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 3, p. 1149-1160, 2006.
- AMRITE, A. C.; EDELHAUSER, H. F.; SINGH, S. R.; KOMPELLA, U. B. Effect of circulation on the disposition and ocular tissue distribution of 20 nm nanoparticles after periocular administration. **Molecular Vision**, v. 14, n. 19, p. 150-160, 2008.
- ANVISA. Guia nº 10/2017 - Guia para tratamento estatístico da validação analítica. Portal ANVISA, 2017a. Disponível em: <
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/%281%29Guia+10+v1+Tratamento+estatistico+validacao+analitica.pdf/85b0e965-d72f-4b7c-bd2e-17de13af1976>>. Acesso em: 08 de janeiro de 2019.
- ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Portal ANVISA, 2017b. Disponível em: <
http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 05 de janeiro de 2019.
- ATTAMA, A. A.; REICHL, S.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Diclofenac sodium delivery to the eye: in vitro evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1-2, p. 307-313, 2008.
- AULTON, M. E.; TAYLOR, K. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2005, p.678.

AVRAHAMI, M.; ASERIN, A.; GARTI, N. Crystallization of celecoxib in microemulsion media. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 28, n. 8, p. 1228-1235, 2007.

AYALASOMAYAJULA, S. P.; KOMPELLA, U. B. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits retinal vascular endothelial growth factor expression and vascular leakage in a streptozotocin-induced diabetic rat model. **European Journal of Pharmacology**, v. 458, n. 3, p. 283-289, 2003.

BARANANO, D. E.; KIM, S. J.; EDELHAUSER, H. F.; DURAIRAJ, C.; KOMPELLA, U. B.; HANDA, J. T. Efficacy and pharmacokinetics of intravitreal non-steroidal anti-inflammatory drugs for intraocular inflammation. **British Journal of Ophthalmology**, v. 93, n. 10, p. 1387-1390, 2009.

BEAUCAGE, G.; ULIBARRI, T.; BLACK, E.; SCHAEFER, D. **Hybrid organic-inorganic composites**. Nova Iorque: Oxford USA, 1995, p.378.

BHARGAVA, H.; NARURKAR, A.; LIEB, L. Using microemulsions for drug delivery. **Pharmaceutical Technology**, v. 11, n. 3, p. 46-52, 1987.

BLANCO-SÁNCHEZ, B.; CLÉMENT, A.; PHILLIPS, J.; WESTERFIELD, M. Zebrafish models of human eye and inner ear diseases. **Methods in Cell Biology**, v. 138, n. 1, p. 415-467, 2017.

BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M. D.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 564-573, 2014.

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J.-F.; COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **Journal of Controlled Release**, v. 60, n. 1, p. 67-76, 1999.

BROCKERHOFF, S. E. Measuring the optokinetic response of zebrafish larvae. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2448-2451, 2006.

BURCKBUCHLER, V.; MEKHLOUFI, G.; GITEAU, A. P.; GROSSIORD, J.; HUILLE, S.; AGNELY, F. Rheological and syringeability properties of highly concentrated human polyclonal immunoglobulin solutions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 3, p. 351-356, 2010.

CARNAHAN, M. C.; GOLDSTEIN, D. A. Ocular complications of topical, peri-ocular, and systemic corticosteroids. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 11, n. 6, p. 478-483, 2000.

CARVALHO, F. C. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina**. 143f. Tese (Doutorado)- Araraquara, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2008.

CONSTANTINIDES, P. P. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 11, p. 1561-1572, 1995.

CORNELL, B.; MIDDLEHURST, J.; SEPAROVIC, F. Small unilamellar phospholipid vesicles and the theory of membrane formation. **Faraday Discussions of the Chemical Society**, v. 81, n. 1, p. 163-178, 1986.

CORREA, M. A.; SCARPA, M. V.; FRANZINI, M. C.; OLIVEIRA, A. G. On the incorporation of the non-steroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 43, n. 2, p. 108-114, 2005.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

CUNHA-JÚNIOR, A. D. S.; FIALHO, S. L.; CARNEIRO, L. B.; ORÉFICE, F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, n. 3, p. 385-391, 2003.

DANIELSON, I.; LINDMANN, B. The definition of microemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 3, n. 2, p. 391-395, 1981.

DASH, S.; MURTHY, P. N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 217-23, 2010.

EDELHAUSER, H. F.; ROWE-RENDLEMAN, C. L.; ROBINSON, M. R.; DAWSON, D. G.; CHADER, G. J.; GROSSNIKLAUS, H. E.; RITTENHOUSE, K. D.; WILSON, C. G.; WEBER, D. A.; KUPPERMANN, B. D. Ophthalmic drug delivery systems for the treatment of retinal diseases: basic research to clinical applications. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 51, n. 11, p. 5403-5420, 2010.

ESCH, C.; SLIEKER, R.; WOLTERBEEK, A.; WOUTERSEN, R.; DE GROOT, D. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: a mini review. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 34, n. 6, p. 545-553, 2012.

FENG, X.; HE, Z.; WANG, L.; PENG, Y.; LUO, M.; LIU, X. Multiresidue analysis of 36 pesticides in soil using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method by liquid chromatography with tandem quadruple linear ion trap mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 17, p. 3047-3054, 2015.

FERRIS, F. L.; FINE, S. L.; HYMAN, L. Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. **Archives of Ophthalmology**, v. 102, n. 11, p. 1640-1642, 1984.

FORMARIZ, T. P.; CHIAVACCI, L. A.; SARMENTO, V. H. V.; SANTILLI, C. V.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Relationship between structural features and in vitro release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 60, n. 1, p. 28-35, 2007.

FORMARIZ, T. P.; SARMENTO, V. H. V.; SILVA-JUNIOR, A. A.; SCARPA, M. V.; SANTILLI, C. V.; OLIVEIRA, A. G. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 51, n. 1, p. 54-61, 2006.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA-JUNIOR, A. A. D.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.

FRANZINI, C. M. **Estudos de microemulsões e subemulsões contendo anfotericina B para administração oral**. 119f. Dissertação (Mestrado)- Araraquara, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2006.

GABBOUN, N. H.; NAJIB, N. M.; IBRAHIM, H. G.; ASSAF, S. Release of salicylic acid, diclofenac acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 212, n. 1, p. 73-80, 2001.

GALVIN, O.; SRIVASTAVA, A.; CARROLL, O.; KULKARNI, R.; DYKES, S.; VICKERS, S.; DICKINSON, K.; REYNOLDS, A. L.; KILTY, C.; REDMOND, G.; JONES, R.; CHEETHAM, S.; PANDIT, A.; KENNEDY, B. N. A sustained release formulation of novel quininib-hyaluronan microneedles inhibits angiogenesis and retinal vascular permeability in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 233, n. 1, p. 198-207, 2016.

GARTI, N.; ASERIN, A. Pharmaceutical emulsions, double emulsions, and microemulsions. **Drugs and the Pharmaceutical Sciences**, v. 73, n. 1, p. 411-534, 1996.

GEROSKI, D. H.; EDELHAUSER, H. F. Drug delivery for posterior segment eye disease. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 5, p. 961-964, 2000.

GONZALEZ-MIRA, E.; EGEA, M.; GARCIA, M.; SOUTO, E. Design and ocular tolerance of flurbiprofen loaded ultrasound-engineered NLC. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 2, p. 412-421, 2010.

GRASSI, M.; GRASSI, G.; LAPASIN, R.; COLOMBO, I. **Understanding drug release and absorption mechanisms: A physical and mathematical approach**. Flórida: CRC Press, 2006, p.648.

GROSSER, T.; YUSUFF, S.; CHESKIS, E.; PACK, M. A.; FITZGERALD, G. A. Developmental expression of functional cyclooxygenases in zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 12, p. 8418-8423, 2002.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. São Paulo: Editora Genio, 2012, p.920.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 10, p. 874-875, 1961.

HOAR, T.; SCHULMAN, J. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle. **Nature**, v. 152, n. 3847, p. 102-103, 1943.

HYDE, S. T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: (Ed.). **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. West Sussex: John Wiley & Sons, v.2, 2001, p.299-332.

IBRAHIM, M. M.; ABD-ELGAWAD, A. E. H.; SOLIMAN, O. A. E.; JABLONSKI, M. M. Nanoparticle-based topical ophthalmic formulations for sustained celecoxib release. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 3, p. 1036-1053, 2013.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos: Documento de caráter orientativo. Portal INMETRO, 2010. Disponível em: < http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf >. Acesso em: 08 de janeiro de 2019.

INOUE, M.; TAKEDA, K.; MORITA, K.; YAMADA, M.; TANIGAWARA, Y.; OGUCHI, Y. Vitreous concentrations of triamcinolone acetonide in human eyes after intravitreal or subtenon injection. **American Journal of Ophthalmology**, v. 138, n. 6, p. 1046-1048, 2004.

JÄRVINEN, K.; JÄRVINEN, T.; URTTI, A. Ocular absorption following topical delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 1, p. 3-19, 1995.

JOUSSEN, A. M.; POULAKI, V.; LE, M. L.; KOIZUMI, K.; ESSER, C.; JANICKI, H.; SCHRAERMEYER, U.; KOCIOK, N.; FAUSER, S.; KIRCHHOF, B. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 12, p. 1450-1452, 2004.

KARTHIK, G.; ANGAPPAN, M.; VIJAYAKUMAR, A.; NATARAJAPILLAI, S. Syringic acid exerts antiangiogenic activity by downregulation of VEGF in zebrafish embryos. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 203-208, 2014.

KAUR, I. P.; KAKKAR, S. Nanotherapy for posterior eye diseases. **Journal of controlled release**, v. 193, p. 100-112, 2014.

KIM, S. J.; ADAMS, N. A.; TOMA, H. S.; BELAIR, M.-L.; THORNE, J. E.; GREEN, W. R.; JABS, D. A. Safety of intravitreal ketorolac and diclofenac: an electroretinographic and histopathologic study. **Retina**, v. 28, n. 4, p. 595-605, 2008.

KIM, S. J.; TOMA, H.; SHAH, R.; KOMPELLA, U. B.; VOOTURI, S. K.; SHENG, J. The safety, pharmacokinetics, and efficacy of intraocular celecoxib. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 55, n. 3, p. 1409-1418, 2014.

KITAGAWA, T.; YUZAWA, M. Intravitreal pegaptanib sodium for myopic choroidal neovascularization: 1 year results of a prospective pilot study. **Journal of Japanese Ophthalmological Society**, v. 117, n. 4, p. 344-350, 2013.

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.

KRISHNAVENI, G.; SATHYANNARYANA, P. V. V. A Novel RP-HPLC method for the Quantification of Celecoxib in Formulations. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 340-346, 2012.

KULKARNI, A. D.; KUPPERMANN, B. D. Wet age-related macular degeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 14, p. 1994-2009, 2005.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, n. 1, p. 89-121, 2000.

LAWSON, N. D.; WEINSTEIN, B. M. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. **Developmental Biology**, v. 248, n. 2, p. 307-318, 2002.

LEE, M.-J.; LEE, M.-H.; SHIM, C.-K. Inverse targeting of drugs to reticuloendothelial system-rich organs by lipid microemulsion emulsified with poloxamer 338. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 2, p. 175-187, 1995.

LIDICH, N.; ASERIN, A.; GARTI, N. Structural characteristics of oil-poor dilutable fish oil omega-3 microemulsions for ophthalmic applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 463, n. 1, p. 83-92, 2016.

LIMA-FILHO, A. A. S.; OLIVEIRA, A. G.; SILVA-JUNIOR, A. A.; CARDILLO, J. A. **Fisiologia, Farmacologia e Patologia Ocular**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2013,

MACKAY, R. A. Reactions in microemulsions. The ion-exchange model. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 24, p. 4756-4758, 1982.

MARADUDIN, A. A.; MILLS, D. L. Scattering and absorption of electromagnetic radiation by a semi-infinite medium in the presence of surface roughness. **Physical Review B**, v. 11, n. 4, p. 1392-1416, 1975.

MARQUES, R. A. A. Oclusão de ramo da veia central da retina. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, n. 6, p. 897-900, 2003.

MATTHEWS, M.; TREVARROW, B.; MATTHEWS, J. A virtual tour of the guide for zebrafish users. **Resource**, v. 31, n. 1, p. 34-40, 2002.

MAURICE, D. M. Drug delivery to the posterior segment from drops. **Survey of Ophthalmology**, v. 47, n. 1, p. 41-52, 2002.

MERRIGAN, S. L.; KENNEDY, B. N. Vitamin D receptor agonists regulate ocular developmental angiogenesis and modulate expression of dre-miR-21 and VEGF. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 16, p. 2636-2651, 2017.

NOOMEN, A.; HBAIEB, S.; PARROT-LOPEZ, H.; KALFAT, R.; FESSI, H.; AMDOUNI, N.; CHEVALIER, Y. Emulsions of β -cyclodextrins grafted to silicone for the transport of antifungal drugs. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 5-6, p. 705-715, 2008.

NORLING, T.; LADING, P.; ENGSTRÖM, S.; LARSSON, K.; KROG, N.; NISSEN, S. S. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 19, n. 9, p. 687-692, 1992.

OLIVEIRA, A. G.; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V.; EGITO, E. S. T. Microemulsions: physico-chemical approaches on the system for pharmaceutical applications Chap.II. In: (Ed.). **Current Focus on Colloids and Surfaces**. Kerala: Research Signpost, 2009, p.1-44.

OLIVEIRA, A. G.; LIMA-FILHO, A. A. S.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; PAGANELLI, F.; CARDILLO, J. A. Trans-Scleral Controlled-Release of Drugs for Cataract Surgery. In: (Ed.). **Cataract Surgery**. Londres: INTECH Open Access Publisher, 2013, p.183-196.

OLIVEIRA, A. G.; NOTHENBERG, M. S.; CUCCOVIA, I. M.; CHAIMOVICH, H. Micellar catalysis of the intramolecular aminolysis of the β -lactam antibiotic cephaclor. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 19-24, 1991.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CHAIMOVICH, H. Effect of hexadecyltrimethylammonium bromide-based microemulsions on the rate of decomposition of the β -lactam antibiotic cephaclor. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 5, p. 616-620, 1997.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, A. G.; SILVA-JUNIOR, A. A. Novas tecnologias de administração de fármacos em oftalmologia. In: (Ed.). **Farmacologia Ocular**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2016, p.258.

OLIVEIRA, L. B. O.; GOMES, C. F.; BAMPI, V.; RHEINGANTZ, M. G.; SOUZA, M. A. L. Angiogênese e tumorigênese: onde ocorre a intersecção e as possibilidades de terapias. **VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde**, v. 22, n. 2, p. 11-22, 2010.

PAGANELLI, F.; CARDILLO, J. A.; DARE, A. R. J.; MELO JR, L. A. S.; LUCENA, D. R.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; OLIVEIRA, A. G.; PIZZOLITTO, A. C.; LAVINSKY, D.; SKAF, M. Controlled transscleral drug delivery formulations to the eye: establishing new concepts and paradigms in ocular anti-inflammatory therapeutics and antibacterial prophylaxis. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 8, p. 955-965, 2010.

PAGANELLI, F.; CARDILLO, J. A.; MELO-JÚNIOR, L. A. S.; OLIVEIRA, A. G.; SKAF, M.; COSTA, R. A. A single intraoperative sub-Tenon's capsule triamcinolone acetate injection for the treatment of post-cataract surgery inflammation. **Ophthalmology**, v. 111, n. 11, p. 2102-2108, 2004.

PAGANELLI, F.; CARDILLO, J. A.; MELO, L. A.; LUCENA, D. R.; SILVA, A. A.; OLIVEIRA, A. G.; HÖFLING-LIMA, A. L.; NGUYEN, Q. D.; KUPPERMANN, B. D.; BELFORT, R. A single intraoperative sub-Tenon's capsule injection of triamcinolone and ciprofloxacin in a controlled-release system for cataract surgery. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, n. 7, p. 3041-3047, 2009.

PAL KAUR, I.; KANWAR, M. Ocular preparations: the formulation approach. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 5, p. 473-493, 2002.

PALAMOOD, M.; JABLONSKI, M. M. Synthesis, characterization and in vitro studies of celecoxib-loaded poly (ortho ester) nanoparticles targeted for intraocular drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, n. 2, p. 474-482, 2013.

PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MACHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1-2, p. 44-50, 2006.

PARK, K.-M.; LEE, M.-K.; HWANG, K.-J.; KIM, C.-K. Phospholipid-based microemulsions of flurbiprofen by the spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 183, n. 2, p. 145-154, 1999.

PESCA, M. S.; DAL PIAZ, F.; SANOGO, R.; VASSALLO, A.; BRUZUAL DE ABREU, M.; RAPISARDA, A.; GERMANÒ, M. P.; CERTO, G.; DE FALCO, S.; DE TOMMASI, N. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antiangiogenic activities. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 1, p. 29-35, 2012.

PESTANA, K. C. **Microemulsões biocompatíveis de anfotericina B para administração oral: estudo estrutural, liberação in vitro e farmacocinética pré-clínica**. 140f.

Tese (Doutorado)- Araraquara, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2009.

PEYMAN, G. A.; GANIBAN, G. J. Delivery systems for intraocular routes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 1, p. 107-123, 1995.

PHILLIPS, D. J.; PYGALL, S. R.; COOPER, V. B.; MANN, J. C. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 11, p. 1549-1559, 2012.

PODLOGAR, F.; GAŠPERLIN, M.; TOMŠIČ, M.; JAMNIK, A.; ROGAČ, M. B. Structural characterisation of water-Tween 40®/Imwitor 308®-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 276, n. 1-2, p. 115-128, 2004.

REYNOLDS, A. L.; ALVAREZ, Y.; SASORE, T.; WAGHORNE, N.; BUTLER, C.; KILTY, C.; SMITH, A. J.; MCVICAR, C.; WONG, V. H.; GALVIN, O. Phenotype-based Discovery of 2-[(E)-2-(Quinolin-2-yl) vinyl] phenol as a Novel Regulator of Ocular Angiogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 14, p. 7242-7255, 2016.

RIBEIRO, F. A. D. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R. D.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

ROSENFELD, P. J.; BROWN, D. M.; HEIER, J. S.; BOYER, D. S.; KAISER, P. K.; CHUNG, C. Y.; KIM, R. Y. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 14, p. 1419-1431, 2006.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of pharmaceutical excipients**. Londres: Pharmaceutical press, 2006, p.850.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, E.; ESPINA, M.; DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E.; GARCÍA, M. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye—Part II-Ocular drug-loaded lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 110, p. 58-69, 2017.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L. D. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo: Artliber, 2006, p.240.

SEEDHER, N.; BHATIA, S. Solubility enhancement of Cox-2 inhibitors using various solvent systems. **Aaps Pharmscitech**, v. 4, n. 3, p. 36-44, 2003.

SEYFODDIN, A.; SHAW, J.; AL-KASSAS, R. Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery. **Drug Delivery**, v. 17, n. 7, p. 467-489, 2010.

SILVA, G. B. R. F.; SCARPA, M. V.; ROSSANEZI, G.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Development and characterization of biocompatible isotropic and anisotropic oil-in-water colloidal dispersions as a new delivery system for methyl dihydrojasmonate antitumor drug. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 867-876, 2014.

SILVA, G. B. R. F. D. **Desenvolvimento e caracterização físico-química e biofarmacêutica de nano e microemulsões lipídicas de uso intravenoso contendo metildiidrojasmonato**. 167f. Tese (Doutorado)- Araraquara, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2013.

SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KHAN, F. A.; CHAURASIA, M.; JAIN, N. K.; CHOURASIA, M. K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, n. 1, p. 28-49, 2017.

SINGHVI, G.; SINGH, M. In-vitro drug release characterization models. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 1, p. 77-84, 2011.

SOUTO, E. B.; DOKTOROVOVA, S.; GONZALEZ-MIRA, E.; EGEA, M. A.; GARCIA, M. L. Feasibility of lipid nanoparticles for ocular delivery of anti-inflammatory drugs. **Current Eye Research**, v. 35, n. 7, p. 537-552, 2010.

STOCKMANN, C.; SCHADENDORF, D.; KLOSE, R.; HELFRICH, I. The impact of the immune system on tumor: angiogenesis and vascular remodeling. **Frontiers in Oncology**, v. 4, n. 69, p. 69-83, 2014.

TARALLO, V.; LEPORE, L.; MARCELLINI, M.; DAL PIAZ, F.; TUDISCO, L.; PONTICELLI, S.; LUND, F. W.; ROEPSTORFF, P.; ORLANDI, A.; PISANO, C. The biflavonoid amentoflavone inhibits neovascularization preventing the activity of proangiogenic vascular endothelial growth factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 22, p. 19641-19651, 2011.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TOKUMOTO, M. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. Evolution of the viscoelastic properties of SnO₂ colloidal suspensions during the sol–gel transition. **Journal of Non-crystalline Solids**, v. 273, n. 1-3, p. 116-123, 2000.

TOLLOCZKO-IWANIUK, N.; DZIEMIANCZYK-PAKIELA, D.; NOWASZEWSKA, B. K.; CELINSKA-JANOWICZ, K.; MILTYK, W. Celecoxib in Cancer Therapy and Prevention-Review. **Current Drug Targets**, v. 20, n. 3, p. 302-315, 2018.

TROTТА, M. Influence of phase transformation on indomethacin release from microemulsions. **Journal of Controlled Release**, v. 60, n. 2-3, p. 399-405, 1999.

TROTТА, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, n. 2, p. 203-208, 2002.

URTTI, A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 11, p. 1131-1135, 2006.

WARGAFTIG, T. **Desenvolvimento de microemulsões lipídicas estabilizadas com fosfatidilcolina de soja para veiculação de vacina de DNA contra tuberculose**. 90f. Dissertação (Mestrado)- Araraquara, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2000.

ZANA, R.; LANG, J.; FRIBERG, S.; BOTHOREL, P. **Microemulsions: structure and dynamics**. Flórida: CRC Press, 1987, p.225.