

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta Tese será disponibilizado somente a partir de 28/06/2021.

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

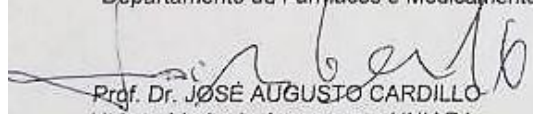
TÍTULO DA TESE: Nanodispersões biocompatíveis como estratégia tecnológica para liberação controlada intra-ocular do AINE Celecoxibe

AUTORA: ALINE GRAVINEZ PERISSINATO

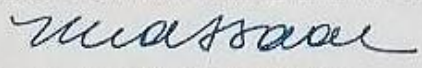
ORIENTADOR: ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA

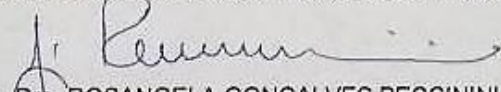
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:


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

d_{pf} – 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

h_{pf} – 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.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2: Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3: Resultados de adequação dos sistemas cromatográficos.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 4: Composição do planejamento experimental. ...**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 5: Resultados experimentais do planejamento fatorial.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 6: Resultados do Teste de Cochran para a avaliação da homocedasticidade.
.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 7: Resultados da ANOVA para a avaliação da significância do coeficiente angular.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 8: Resultados da ANOVA para a avaliação da significância do coeficiente linear.
.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 9: Resultados do teste de Shapiro-Wilk para a avaliação da normalidade. . **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 10: Resumo da análise dos resíduos.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 11: Resultados do teste de Durbin- Watson para a avaliação da independência.
.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 12: Resumo dos resultados estatísticos obtidos no parâmetro linearidade da validação analítica.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 13: Resultados obtidos na determinação da precisão inter-dia do método analítico para a quantificação do CEL.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 14: Resultados obtidos na determinação da precisão intra-dia do método analítico para a quantificação do CEL.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 15: Resultados obtidos na determinação da exatidão inter-dia do método analítico para a quantificação do CEL.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 16: Resultados obtidos na determinação da exatidão intra-dia do método analítico para a quantificação do CEL.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 17: Resultados do limite de detecção e quantificação.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 18: Resultados obtidos para a determinação da robustez do método. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 19: Estabilidade do CEL no meio diluente. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 20: Composição das NEs selecionadas para a sequência de trabalho..... **Erro! Indicador não definido.**

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.**Erro! Indicador não definido.**

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

Tabela 23: Valores referentes ao volume de fase das NEs e a solubilidade do CEL em cada formulação.**Erro! Indicador não definido.**

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.....**Erro! Indicador não definido.**

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

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.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 27: Dados dos modelos matemáticos de Korsmeyer-Peppas e Higuchi para caracterizar a cinética de liberação das NEs.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 28: Dados dos modelos matemáticos de Hixson/Crowell e Weibull para caracterizar a cinética de liberação das NEs.....**Erro! Indicador não definido.**

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....	Erro! Indicador não definido.
Figura 7: Gráfico de Pareto para o fator de encaudamento.	Erro! Indicador não definido.
Figura 8: Gráfico de superfície de resposta descrevendo as melhores condições para o tempo de retenção.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 9: Gráfico de superfície de resposta descrevendo as melhores condições para o fator de encaudamento.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 10: Cromatogramas do branco (A) e da amostra de CEL na concentração de 45,0 µg/mL incorporada à NE (B).	Erro! Indicador não definido.
Figura 11: Curva analítica de CEL por CLAE.	Erro! Indicador não definido.
Figura 12: Análise gráfica dos resíduos.....	Erro! Indicador não definido.
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.....	Erro! Indicador não definido.
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.....	Erro! Indicador não definido.
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.....	Erro! Indicador não definido.
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.....	Erro! Indicador não definido.

Figura 17: Efeito do volume de fase na incorporação do do CEL nas NEs. **Erro!**
Indicador não definido.

Figura 18: Efeito da razão de O/T na incorporação do CEL nas NEs. **Erro!** **Indicador não definido.**

Figura 19: Perfil reológico das NEs em função da razão O/T na ausência de CEL. **Erro!**
Indicador não definido.

Figura 20: Perfil reológico das NEs em função da razão O/T na presença de 30 mg/mL de CEL..... **Erro! Indicador não definido.**

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

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... **Erro!**
Indicador não definido.

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... **Erro!**
Indicador não definido.

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... **Erro!**
Indicador não definido.

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... **Erro!**
Indicador não definido.

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... **Erro!**
Indicador não definido.

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... **Erro!**
Indicador não definido.

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... **Erro!**
Indicador não definido.

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... **Erro!**
Indicador não definido.

Figura 30: Evolução temporal da compliância das NEs na ausência do fármaco. .. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 31: Evolução temporal da compliância das NEs na presença de 30 mg/mL do fármaco..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 32: Valores de compliância a 200s (etapa de fluência) das NEs em função da razão O/T..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 33: Fotomicrografias dos sistemas preparados com proporções crescentes da razão O/T. Aumento de 40x..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 34: Curvas de SAXS das NEs em relação à razão O/T na ausência de CEL. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 35: Curvas de SAXS das NEs em relação à razão O/T na presença de 30 mg/mL de CEL..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 36: Difrátogramas dos componentes isolados: Tween®20, Captex®200, FS e CEL..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 37: Difrátogramas da mistura física dos componentes das NEs. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 38: Difrátogramas das NEs na ausência do fármaco. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 39: Difrátogramas das NEs na presença de 30 mg/mL do fármaco. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 40: Estabilidade da NE A (O/T 0,33). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 41: Estabilidade da NE B (O/T: 0,56). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 42: Estabilidade da NE C (O/T: 0,78). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 43: Estabilidade da NE D (O/T: 1,00). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 44: Perfil de liberação do CEL nas NEs com variação da razão O/T **Erro! Indicador não definido.**

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

Figura 46: Curvas de liberação das NEs com variação da razão O/T fitados com o modelo de Weibull. **Erro! Indicador não definido.**

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. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 48: Gráfico hierárquico da bioatividade das amostras em uma concentração de 0,1 a 15,0 μ M 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).....**Erro! Indicador não definido.**

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.**Erro! Indicador não definido.**

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 hialoides foram determinados a 5 dpf..... **Erro! Indicador não definido.**

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.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 52: Inibição dependente do tempo do desenvolvimento e da angiogênese intraocular pelo CEL.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 53: Respostas optocinéticas (OKR) de larvas de 5 dpf.**Erro! Indicador não definido.**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
3. OBJETIVOS	Erro! Indicador não definido.
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	Erro! Indicador não definido.
4.1 MATERIAL	Erro! Indicador não definido.
4.1.1 Matérias-primas, reagentes e solventes ...	Erro! Indicador não definido.
4.1.2 Equipamentos	Erro! Indicador não definido.
4.2 MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
4.2.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de CEL por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	Erro! Indicador não definido.
4.2.1.1 Ensaios preliminares para determinação da concentração ideal de metanol:água	Erro! Indicador não definido.
4.2.1.2 Planejamento fatorial com ponto central	Erro! Indicador não definido.
4.2.1.3 Validação da metodologia analítica.....	Erro! Indicador não definido.
4.2.2 Preparação dos sistemas estabilizados por fosfatidilcolina de soja e Tween®20	Erro! Indicador não definido.
4.2.3 Diagrama de fase para o sistema estabilizado por FS/Tw.....	Erro! Indicador não definido.
4.2.4 Caracterização dos sistemas selecionados	Erro! Indicador não definido.
4.2.4.1 Determinação do diâmetro médio da gotícula e Pdl por espalhamento dinâmico de luz	Erro! Indicador não definido.
4.2.4.2 Potencial Zeta	Erro! Indicador não definido.
4.2.4.3 Determinação da incorporação do CEL nas NEs	Erro! Indicador não definido.
4.2.4.3.1 Determinação das densidades das NEs	Erro! Indicador não definido.
4.2.4.3.2 Determinação do volume de fase.....	Erro! Indicador não definido.
4.2.4.4 Análise reológica	Erro! Indicador não definido.

- 4.2.4.5 Seringabilidade.....**Erro! Indicador não definido.**
- 4.2.4.6 Microscopia de luz polarizada**Erro! Indicador não definido.**
- 4.2.4.7 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)**Erro! Indicador não definido.**
- 4.2.4.8 Difração de raios-X.....**Erro! Indicador não definido.**
- 4.2.4.9 Estudos de estabilidade física das NEs..**Erro! Indicador não definido.**
- 4.2.5 Estudos de liberação *in vitro***Erro! Indicador não definido.**
- 4.2.6 Estudos *in vivo* para avaliar a atividade anti-angiogênica do CEL utilizando o modelo animal peixe-zebra**Erro! Indicador não definido.**
 - 4.2.6.1 Ensaio dose-dependente.....**Erro! Indicador não definido.**
 - 4.2.6.2 Quantificação dos vasos hialoides da retina**Erro! Indicador não definido.**
 - 4.2.6.3 Ensaio do comportamento visual**Erro! Indicador não definido.**
 - 4.2.6.4 Ensaio de tempo-dependência do CEL..**Erro! Indicador não definido.**
- 5.1 DETERMINAÇÃO DO CEL EM NEs POR CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....**Erro! Indicador não definido.**
 - 5.1.1 Ensaios preliminares para determinação das proporções ideais de metanol:água.....**Erro! Indicador não definido.**
 - 5.1.2 Gráficos de Pareto e de superfície de resposta**Erro! Indicador não definido.**
 - 5.1.3 Parâmetros de validação**Erro! Indicador não definido.**
- 5.2 DIAGRAMA DE FASES**Erro! Indicador não definido.**
- 5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NEs**Erro! Indicador não definido.**
 - 5.3.1 Análise do diâmetro médio das gotículas e Pdl por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)**Erro! Indicador não definido.**
 - 5.3.2 Análise do Potencial Zeta.....**Erro! Indicador não definido.**
 - 5.3.3 Incorporação do CEL nas NEs em função do volume de fase..... **Erro! Indicador não definido.**
 - 5.3.4 Análise do comportamento reológico.....**Erro! Indicador não definido.**
 - 5.3.5 Análise da seringabilidade.....**Erro! Indicador não definido.**
 - 5.3.6 Microscopia de luz polarizada**Erro! Indicador não definido.**

5.3.7	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	Erro! Indicador não definido.
5.3.8	Difração de raios-X	Erro! Indicador não definido.
5.3.9	Determinação da estabilidade física das NEs	Erro! Indicador não definido.
5.4	ANÁLISE DA LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> E MODELOS CINÉTICOS.....	Erro! Indicador não definido.
5.5	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI-ANGIOGÊNICA DO CEL UTILIZANDO MODELO ANIMAL PEIXE-ZEBRA.....	Erro! Indicador não definido.
6.	CONCLUSÕES	36
7.	REFERÊNCIAS	36

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 a 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 ciclooxygenase (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

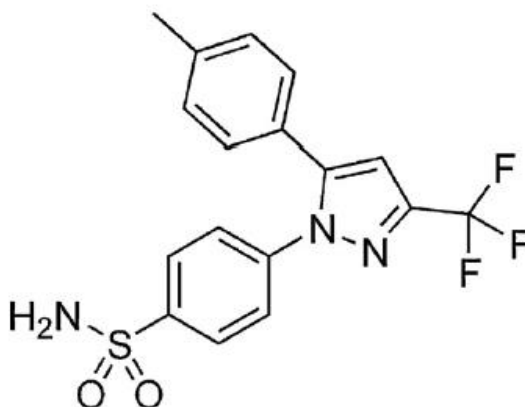
MEs são sistemas opticamente transparentes (Lawrence e Rees, 2000; Aulton e Taylor, 2005; Pestana, 2009).

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 ciclooxigenase 2 (COX-2), sem a inibição da ciclooxigenase 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

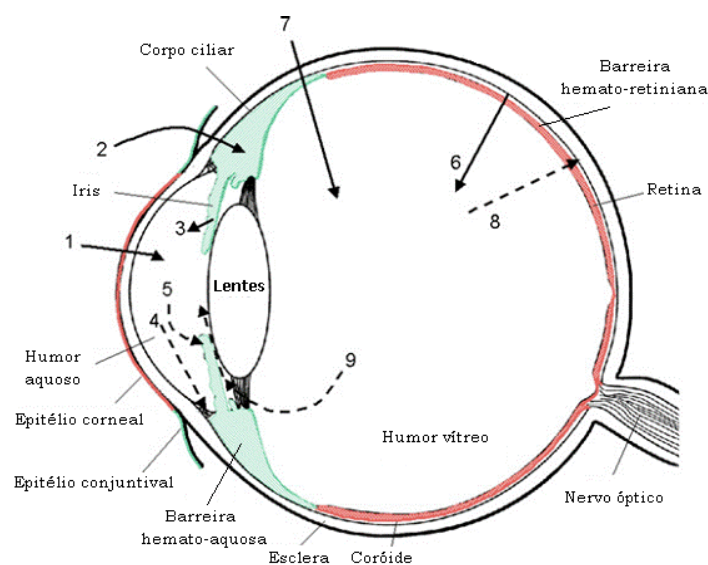
hemorragias intraretinianas. Se a obstrução está situada próxima ao disco óptico, dois quadrantes do fundo podem ser atingidos (oclusões hemisféricas); no entanto se a oclusão é mais periférica, um quadrante, ou menos, pode estar envolvido. Quando o bloqueio é periférico às veias tributárias que drenam 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 intravitreal 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 intravitreal de administração de fármacos tem ganhado importância para a liberação de fármacos na coroide, retina e vítreo. Tem sido demonstrado que a via intravitreal 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 intravitrealmente, 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.

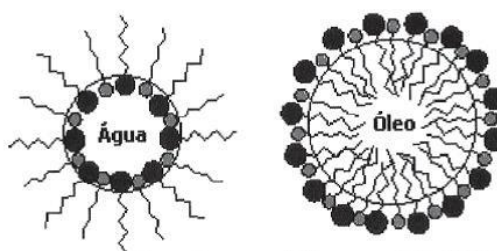
Quando não levamos em conta a via de administração mais adequada e não temos disponíveis novos sistemas de liberação de fármacos, tais como os lipossomas, nano e microemulsões, géis hidrofílicos, nano e micropartículas, faz-se o uso das formulações convencionais, estas não possuem habilidade de gerar 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

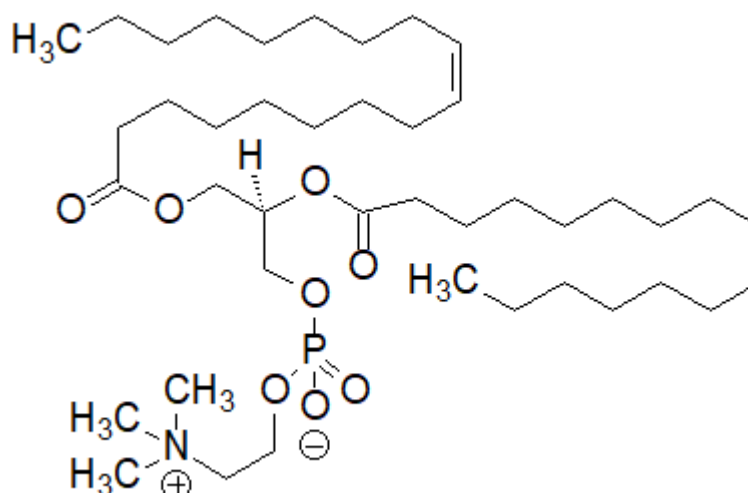
oleosa e com emulsionantes que apresentam equilíbrio hidrófilolipófilo (EHL) na faixa de 8-14; os do tipo A/O são formados quando a concentração de fase aquosa é baixa e com emulsionantes com EHL na faixa de 3-8; e, os do tipo bicontínuo se formam quando as concentrações de fase aquosa e fase oleosa 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 hidrofília 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).

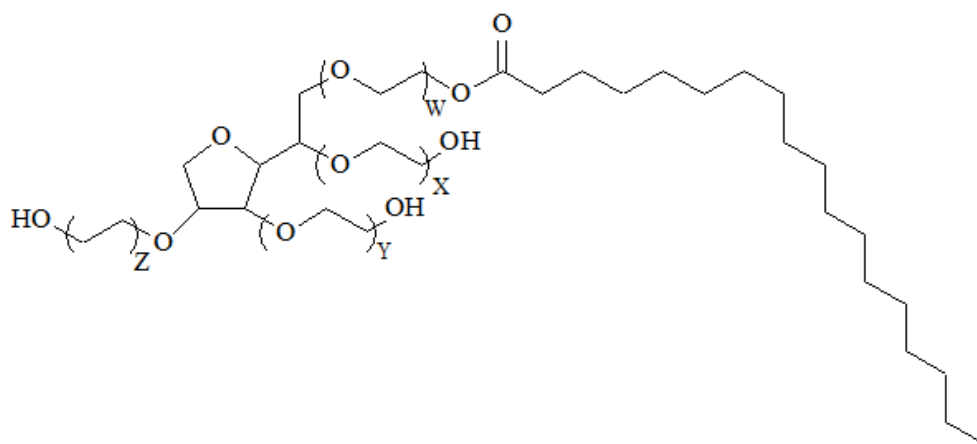
Figura 4: Estrutura química da fosfatidilcolina.



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 isotonzantes 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. 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.

4. 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.; SCHRAERMAYER, 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 acetonide 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.; GERMANO, 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.