

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**Nanocristais de Lapdesf GL-FT 5 para o tratamento do Edema
Macular Diabético: preparação e caracterização físico-química.**

Isabela Fernandes de Oliveira

Trabalho de Conclusão do Curso
de Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a Nádia Araci Bou Chacra

São Paulo
2022

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

1. Introdução

1.1. Edema Macular Diabético: fisiopatologia e tratamento

1.2. Sistema de visão

1.3 Lapdesf GL-FT 5: um candidato a fármaco inovador

1.4. Nanocristais: considerações gerais

2. Objetivo

3. Material

4. Método

4.1. Preparação e otimização da formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT5.

4.1.1 Ensaio exploratório para seleção dos parâmetros do processo de desenvolvimento de formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5

4.1.2 Planejamento experimental empregando método de superfície de resposta para otimização da formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5

4.1.3 Verificação do modelo matemático pelo método de superfície de resposta para otimização da preparação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5

4.2 Caracterização da formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5

4.2.1 Diâmetro Hidrodinâmico Médio (DHM) e Índice de Polidispersão (IP)

4.2.2 Viscosidade aparente

4.2.3 Potencial Zeta (PZ)

4.2.4 pH

4.2.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN- C^{13})

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

5. Resultado e discussão

5.1 Ensaio exploratório para seleção dos parâmetros do processo de desenvolvimento de formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5

5.2 Otimização da formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5

5.2.1 Otimização das formulações de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5, contendo o tensoativo cloreto de cetilpiridínio, utilizando planejamento de experimento por superfície de resposta

5.2.1.1 Verificação do modelo de otimização das formulações de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5 contendo cloreto de cetilpiridínio.

5.3 Caracterização da formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5 contendo cloreto de cetilpiridínio.

5.3.1 Ressonância Magnética Nuclear C^{13} (RMN- C^{13}) da formulação contendo cloreto de cetilpiridínio.

5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da formulação contendo cloreto de cetilpiridínio

6. Conclusão

7. *Acknowledgement*

8. Referências

LISTA DE ABREVIATURAS

EMD	Edema macular diabético
DM	Diabetes Mellitus
VEFG	Fator de crescimento endotelial
FDA	<i>Food and drug administration</i>
RD	Retinopatia diabética
TPGS	<i>Tocopherol polyethylene glycol succinate</i>
BAK	Cloreto de benzalcônio
CPC	Cloreto de cetilpirídínio
DHM	Diâmetro hidrodinâmico médio
PZ	Potencial zeta
IP	Índice de polidispersão
RMN	Ressonância magnética nuclear
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
HLB	Balanço hidrofílico-hidrofóbico

RESUMO

DE OLIVIERA, IF. **Nanocristais de Lapdesf GL-FT 5 para o tratamento do Edema Macular Diabético: preparação e caracterização físico-química.** 2022. no. f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Palavras-chave: Nanocristal; preparação oftálmica; nanotecnologia.

O edema macular diabético (EMD) é caracterizado como doença inflamatória, ocasionada pela progressão da retinopatia diabética, que por sua vez pode ser causada por alterações na microvasculatura ocular, graças ao aumento crônico da glicemia. O EMD é a principal doença responsável por promover a cegueira em pessoas em idade produtiva que possuem diabetes no mundo. Além disso, os tratamentos disponíveis atualmente são caros, com efeitos adversos graves e administração pouco conveniente. O composto Lapdesf GL-FT 5, formado a partir de hibridação da budesonida com a ftalímida se mostra como alternativa promissora para ser usado no tratamento do EMD, graças a sua ação anti-inflamatória. No entanto, sua baixa solubilidade em água impede que testes *in vitro* e *in vivo* sejam realizados para demonstrar sua aplicação ocular. O desenvolvimento de formulação contendo nanocristais de Lapdesf GL-FT 5 corresponde a uma proposta inovadora para superar os desafios de solubilidade em água desse composto. Assim, o presente projeto tem como objetivo desenvolver formulação otimizada contendo nanocristais de Lapdesf GL-FT 5 e realizar sua caracterização físico-química e morfológica. O processo de produção dos nanocristais foi realizado por moagem via úmida em escala super reduzida, enquanto o planejamento experimental por superfície de resposta foi aplicado na etapa de otimização. Após o estudo foi proposta a formulação que continha 1,0% (m/m) de Lapdesf GL-FT 5 e 0,092% (m/m) de cloreto de cetilpiridínio, como a preparação de nanocristais otimizada (tamanho aproximado de 165,00 nm). Esta formulação foi caracterizada pelos métodos morfológico e físico-químicos e apresentou potencial para uso oftálmico com frequência reduzida de aplicação do produto, maior eficiência e segurança, o que pode promover superior adesão do paciente. O presente estudo foi desenvolvido em estágio de iniciação científica, realizado entre 2018 e 2020, com bolsa auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) de 2019 a 2020 (2018/24529-4).

1.Introdução

1.1. Edema Macular Diabético: fisiopatologia e tratamento

Atualmente, cerca de 1 em cada 10 adultos são portadores de Diabetes Mellitus (DM) no mundo, sendo 32 milhões apenas na América do Sul. A incidência global tende a crescer cerca de 67% entre 2019 e 2045 (CHO et al., 2019; THOMAS et al., 2019). O considerável aumento pode ser explicado pelo envelhecimento populacional, sedentarismo e principalmente por dietas pouco saudáveis, ricas em açúcares refinados e gorduras. A hiperglicemia crônica resulta em estresse oxidativo, glicação em estágio elevado e ativação da proteína quinase C. Esse quadro inflamatório tem como resultado a produção exacerbada de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (sigla em inglês VEGF), o que aumenta a permeabilidade vascular (TOTO et al., 2017).

Quando não tratado, o aumento da glicemia tende a provocar extensas complicações microvasculares, podendo causar diversos processos degenerativos, como a Retinopatia Diabética (RD), caracterizada pela diminuição da acuidade visual devido aos danos aos vasos sanguíneos que irrigam a retina (MAZZOLI et al., 2020). A RD é responsável pela perda parcial da visão em aproximadamente 30% dos portadores da DM (THOMAS et al., 2019). Entretanto, quando esta doença não é tratada, os danos à microvasculatura ocular podem progredir até que haja o desenvolvimento do Edema Macular Diabético (EMD). Outros fatores gerais como tendências genéticas, ocorrência de hipóxia, isquemia e quadros inflamatórios anteriores são apontados como fatores de risco para o desenvolvimento do EMD (GUNDOGAN et al. 2016).

Estima-se que, entre 2015 e 2019, cerca de 4,6% da população mundial sofria de EMD (THOMAS et al., 2019). Esta doença é descrita como a ampliação dos danos nos vasos que irrigam a retina, de modo que haja o comprometimento da barreira hemato-retiniana e aumento da permeabilidade dos capilares que formam esta barreira, com consequente extravasamento do líquido intravascular para a retina, especificamente para a mácula (GUNDOGAN et al. 2016).

O EMD pode ser prevenido com a realização de exames periódicos para avaliar a glicemia, o tratamento correto e contínuo da DM, redução do consumo de carboidratos simples, prática assídua de exercícios físicos, além de outros

hábitos benéficos para estabelecer estilo de vida mais saudável. Por outro lado, quando a patologia é instaurada é necessário adotar medidas clínicas para evitar a perda da acuidade visual (BHAGAT et al., 2009).

O diagnóstico e tratamento precoce são as formas mais eficientes de deter a progressão do EMD. Dentre as terapias não medicamentosas, destaca-se a terapia com laser focal. Todavia, para melhora considerável na condição do EMD é necessário que esse tratamento seja associado com triancinolona a 4mg, causando efeitos adversos típicos de corticosteroides. Além disso, o fato de que 17% dos pacientes apresentaram grave perda da acuidade visual mesmo após o tratamento e a ocorrência de ao menos um efeito adverso, como a formação de cicatrizes na região da mácula, em 30% dos casos, restringiram a aplicação dessa abordagem terapêutica (BAKER et al., 2019).

Na tentativa de reduzir o processo inflamatório e consequentemente o avanço da permeabilidade vascular, a triancinolona é usada *off-label* no tratamento do EMD, já o Iluvien®, implante intravítreo de fluocinolona acetona (FAC), foi aprovado pela FDA em 2014 e pode ser usado com o mesmo objetivo (FLAXEL; BEARDSLEY; MESSENGER, 2013). Entretanto, ambos os corticosteroides apresentam efeitos adversos graves. Estima-se que 51% das pessoas sofreram com aumento significativo da pressão intraocular e 30% dos pacientes com aumento do risco de desenvolver glaucoma. Além disso, estudos demonstraram maior ocorrência de catarata nesses pacientes (DIBAS et al., 2016; JONAS et al., 2005). Tais efeitos adversos limitam a adesão do paciente e impedem o tratamento adequado.

O marco para o tratamento do EMD ocorreu em 2015, com a aprovação de dois inibidores de VEGF: Lucentis® e Eylea®. O mecanismo para reduzir a produção de VEGF consiste na administração de fármacos com potencial para inibir a proteína quinase C de forma inespecífica. Por outro lado, o custo elevado dos medicamentos, que pode chegar a R\$ 4.000 por injeção, associado com a forma de administração intravítrea representam os principais obstáculos na aplicação ampla dessa terapia (KLAASSEN et al., 2013).

Atualmente, as abordagens terapêuticas para o tratamento do EMD disponíveis no mercado apresentam elevado custo e graves efeitos adversos advindos do uso constante e prolongado. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de novas terapias medicamentosas, que melhor associam

custo com o aumento da eficácia, a segurança, e consequentemente a adesão do paciente.

1.2. Sistema de visão

O olho humano é formado por sistema complexo de estruturas cujo principal objetivo é garantir que a função desse órgão não seja prejudicada por agressores exógenos ou endógenos. As barreiras podem ser anatomicamente divididas em duas regiões: o segmento anterior do olho, constituído pelo filme lacrimal, a córnea, a conjuntiva e a esclera; e o segmento posterior, destacando-se a barreira hematoaquosa, a coroide e a barreira hematorretiniana. Além disso, o olho também é constituído pela íris, pupila, corpo vítreo, cristalino, retina e nervo óptico; estruturas que não atuam como barreira, mas são diretamente responsáveis pela função ocular (SOBOTTA, 2010).

O filme lacrimal é a barreira dinâmica que recobre toda a região pré-corneal e desempenha sua função impedindo a adesão e entrada de partículas e micro-organismos à superfície ocular, já que seu volume é constantemente drenado pelo ducto lacrimal para a circulação sanguínea à taxa de aproximadamente $38 \pm 18\%$ por minuto (GARASZCZUK et al., 2018). Esse mecanismo representa a primeira camada de proteção do olho, entretanto, também é responsável por remover os fármacos que são administrados por via tópica, não apenas inviabilizando a eficácia da terapia, mas também promovendo efeitos adversos sistêmicos devido à grande frequência de aplicação de doses (KAKIZAKI; ALI, 2017).

Essa barreira é composta de 600 lipídeos, 1796 proteínas e eletrólitos sendo dividido em 3 camadas. A porção mais interna é formada por células de Goblet, que secretam a mucina, glicoproteínas de alto peso molecular, com caráter negativo graças a ligação do ácido siálico e os resíduos de sulfato. A mucina é responsável pela lubrificação ocular, além de manter a estabilidade do filme. O gel formado por essas proteínas limita a permeabilidade de partículas com tamanho superior a 550 ± 50 nm. Já a camada intermediária possui composição aquosa, enquanto a porção mais externa é formada por lipídeos que impedem a evaporação da água (JUNG et al., 2017; XU et al., 2013).

A córnea, por sua vez, corresponde a primeira barreira estática do olho. Sua estrutura composta de 5 camadas (epitélio, camada de Bowman, estroma,

membrana de Descemet e o endotélio) é responsável por limitar a permeabilidade de partículas grandes e hidrofílicas. Já a conjuntiva é altamente irrigada por vasos sanguíneos e linfáticos, sendo capaz de promover o *clearance* de aproximadamente 34-79% dos fármacos que atingem esta região (JANAGAM et al., 2017; SOBOTTA, 2010)

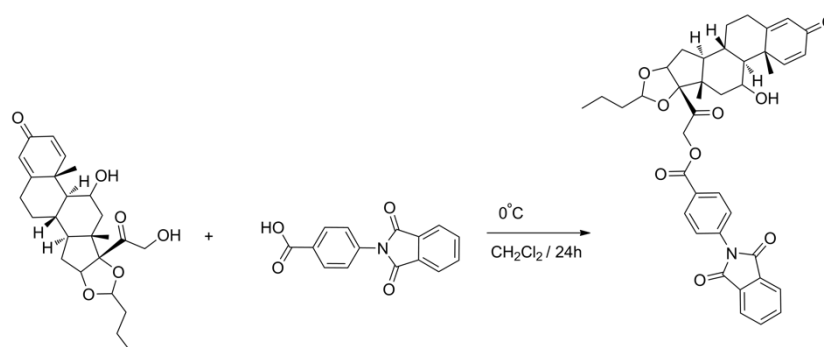
A barreira hematorretiniana é responsável por proteger a retina e o nervo ótico de agressores endógenos. Essa estrutura impede a absorção de partículas devido à baixa permeabilidade dos capilares que compõe sua porção mais interna. Além disso, a presença de transportadores da família ABC também pode contribuir para reduzir a entrada de fármacos administrados via sistêmica. Dos receptores de efluxo, destacam-se as glicoproteína-p e o Bcrp (presentes apenas na porção mais interna da barreira hematorretiniana), e os receptores MRP 1 e MRP 4 (localizados no lúmen dos capilares que compõe a porção externa da barreira). Em contrapartida, a barreira hematorretiniana também possui transportadores de influxo, como o Novo Transportador de Cátions Orgânicos, que pode internalizar fármacos com carga positiva (CHOLKAR et al., 2013; KUBO et al., 2017).

A estrutura do olho é finamente regulada para que sua função seja exercida sem prejuízos. Entretanto, esses mecanismos de proteção acabam por remover também fármacos usados no tratamento doenças que afetam regiões como a retina, o que limita sua absorção nesse local (KLAASSEN et al., 2013). Assim, torna-se indispensável o desenvolvimento de formulações capazes de atravessar essas barreiras e atingir o segmento posterior do olho, possibilitando a redução do número de doses necessárias para atingir o efeito desejado, consequentemente, amenizando os efeitos adversos e aumentando a adesão do paciente (PETERS et al., 2019).

1.3 Lapdesf GL-FT 5: um candidato a fármaco inovador

O composto híbrido Lapdesf GL-FT 5 foi sintetizado pelo grupo da Professora Dra. Chung Man Chin (FCF/UNESP) a partir da ftalimida (grupo farmacofórico da talidomida, destituída do seu efeito teratogênico) e o glicocorticoide budesonida (Figura 1), com o objetivo de obter melhor perfil terapêutico, com a redução dos efeitos adversos desses fármacos (MACHADO et al., 2019).

Figura 1: Representação do mecanismo de síntese do Lapdesf GL-FT 5 (Desenhado no programa Chem Draw 12.0).



Os glicocorticoides atuam principalmente como imunossupressores por suprimir a transcrição de genes relacionados a imunomodulação, como aqueles responsáveis pela produção de ciclooxygenase-2 e citocinas pró-inflamatórias, em todas as fases da resposta imune (NECELA, 2004). Esses fármacos também atuam como anti-inflamatórios, por reduzir a ação de neutrófilos, macrófagos, a proliferação monoclonal dos linfócitos B e a ação das células T (NECELA, 2004). Os derivados ftalimídicos também possuem ação anti-inflamatória e antiangiogênica, por suprimir a produção da citocina TNF- α . Glicocorticoides tiveram sua eficácia demonstrada para o tratamento de doenças oculares inflamatórias. Entretanto, quando usados em elevadas concentrações ou quando muitas doses são necessárias, seu uso exige cautela devido aos efeitos adversos, como aumento da pressão intraocular e maior tendência a ocorrência de catarata (SHARMA et al., 2010).

Estudos realizados no tratamento da colite ulcerativa com o composto Lapdesf GL-FT 5 confirmaram sua propriedade anti-inflamatória, além de mostrar que o candidato a fármaco possui baixa citotoxicidade, com viabilidade celular acima de 70%. Entretanto, sua baixa solubilidade em água não permitiu testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar sua ação no tratamento de doenças oculares (MACHADO et al., 2019). Assim, o desenvolvimento de preparações contendo nanocristais de Lapdesf GL-FT 5 se mostra como alternativa inovadora para viabilizar os estudos da eficácia desse composto híbrido para o tratamento do EMD (PETERS et al., 2021).

1.4. Nanocristais: considerações gerais

Nanocristais são partículas de compostos puros com característica amorfa ou cristalina, preferivelmente entre 100 e 500 nm em ao menos uma de suas dimensões. O fato de os nanocristais não possuírem matriz lipídica ou polimérica representa vantagem significativa, já que os compostos legalmente aprovados para a aplicação em preparações oftálmicas são extremamente limitados (MÖSCHWITZER et al., 2013).

O aumento da área superficial dos nanocristais quando comparados com a estrutura micrométrica pode promover a elevação da velocidade de dissolução, de acordo com a equação (Equação 1) de Noyes-Whitney (NOYES; WHITNEY, 1897).

$$\frac{dc}{dt} = A \cdot D \cdot \left(\frac{C_s - C_x}{h} \right) \quad \text{Eq. (1)}$$

Nesta equação, A representa a área superficial da partícula, enquanto D é o coeficiente de difusão, C_s é solubilidade de saturação, C_x é a concentração em massa, h é distância de difusão, por fim, a razão dc/dt corresponde à velocidade de dissolução.

O aumento da área superficial pode contribuir para ampliar o potencial de internalização do fármaco na estrutura do olho, já que é capaz de melhorar a adesividade da partícula às membranas celulares, prolongando o tempo de residência ocular e aumentando sua liberação no sítio de ação (SHARMA; PATEL; MEHTA, 2016). Essa característica é particularmente importante para preparações oftálmicas, uma vez que torna possível aumentar a biodisponibilidade do fármaco e consequentemente limitar o número de doses necessárias para atingir o efeito terapêutico. É descrito que, quando a dose é reduzida em 10 vezes, a citotoxicidade reduz 2 vezes (LEE et al., 2015). Portanto, essa vantagem dos nanocristais, quando comparadas com as preparações convencionais, contribuem em moderar os efeitos adversos, tendo potencial para aumentar a adesão do paciente (PETERS et al., 2019).

Duas abordagens podem ser aplicadas na produção de nanocristais: *bottom-up* e *top-down*. A primeira consiste em dissolver o fármaco em solvente e posteriormente precipitar as partículas em escala nanométrica pela aplicação de antissolvente, em que o fármaco seja imiscível (geralmente água) (SHARMA; PATEL; MEHTA, 2016). Entretanto, essa técnica não é comumente aplicada em

processos industriais, devido aos problemas causados pelos resíduos de solventes orgânicos, altamente danosos para o meio ambiente, além da grande dificuldade em controlar o tamanho dos nanocristais (SHEGOKAR; MÜLLER, 2010).

O método *de top-down* parte da partícula em escala micrométrica até que o fármaco seja reduzido mecanicamente à escala nanométrica, utilizando os processos de homogeneização por alta pressão ou moagem por via úmida. A primeira técnica emprega o equipamento homogeneizador por alta pressão. Nesse caso a suspensão coloidal é aplicada em uma abertura de apenas alguns micrometros em que a pressão pode variar tipicamente de 1000 a 2000 bar, promovendo a redução da partícula por meio da aplicação de forças de cavitação, cisalhamento e colisão (MÖSCHWITZER, 2013).

Já o método de moagem por via úmida em escala reduzida consiste em sistema formado por recipiente de vidro, agitadores magnéticos, esferas de zircônia, tensoativos apropriados e a suspensão aquosa do fármaco. O sistema é submetido a agitação durante determinado período, até que ocorra a fragmentação mecânica do composto pelas forças de cisalhamento que ocorrem pelo choque do fármaco com as esferas de zircônia, do fármaco com a parede do recipiente e das partículas do fármaco entre si (MÖSCHWITZER, 2013). Essa técnica possui elevado custo-benefício, visto que não exige elevada quantidade de amostra ou alta energia para que haja a redução, permitindo que os parâmetros do processo sejam avaliados em escala reduzida, e posteriormente otimizados (ROMERO; KECK; MÜLLER, 2016;).

Assim, o desenvolvimento de nanocristais por método de moagem via úmida demonstra ser a alternativa mais promissora para a elaboração de preparação contendo Lapdesf GL-FT 5, considerando que essa abordagem permite melhorar o perfil de solubilidade de saturação em água e adesividade, consequentemente, com potencial para viabilizar a realização de testes para avaliar seu potencial para aplicação oftálmica (ROMERO; KECK; MÜLLER, 2016; PETERS et al., 2021).

2. Objetivos

O objetivo do presente estudo é a obtenção e a caracterização físico-química de formulação contendo nanocristal de Lapdesf GL-FT 5, por moagem via úmida em escala ultra reduzida, com características compatíveis para o uso oftálmico, que possa ser posteriormente avaliada no tratamento do EMD.

3. Material

Composto Lapdesf GL-FT 5 (fornecido pelo Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos, UNESP, Brasil), poloxamer 407 (BASF, Alemanha), poloxamer 188 (BASF, Alemanha), polissorbato80 (SIGMA-ALDRICH, EUA), tocoferol polietileno glicol succinato (TPGS) (BASF, Alemanha), cloreto de cetilpiridínio (SIGMA-ALDRICH, EUA), cloreto de benzalcônio (SIGMA-ALDRICH®, Dinamarca) e água ultrapura, obtido de um Milli-Q®apparat (Millipore GmbH, Alemanha), esferas de zircônia de 0,1mm (Retsch, Alemanha); recipientes de vidro (capacidade de 1,5mL –vial de HPLC e capacidade de 10mL); barras magnéticas de 3 x 5 mm e em formato de cruz (Lisa Teflon), agitador magnético RCT basic (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Germany).

4. Método

4.1. Preparação e otimização da formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT5.

4.1.1 Ensaio exploratório para seleção dos parâmetros do processo de desenvolvimento de formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5

O primeiro ensaio exploratório foi realizado a fim de determinar os tensoativos com potencial para promover a redução do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) do composto. Desenvolveu-se seis formulações (F1-F6) empregando o método de moagem via úmida em escala reduzida, adaptado de Romero et al (2016) (Tabela 1). O sistema continha 1 recipiente de vidro de 1,5 mL, 0,200 g de esfera de zircônia, 2 barras magnéticas cilíndricas (5,0 x3,0 mm), composto Lapdesf GL-FT 5 a 3% (m/m), tensoativo a 3% (m/m) e a massa final foi ajustada com água até 1,0 g. Os tensoativos aprovados para o uso ocular selecionados foram os estabilizantes não-iônicos: poloxamer 407 (F1), poloxamer 188 (F2), tween 80 (F3) e *tocopherol polyethylene glycol succinate* (TPGS) (F4); e tensoativos catiônicos: cloreto de benzalcônio (BAK) (F5) e

cloreto de cetilpiridínio (CPC) (F6). O sistema foi submetido a agitação de 800 rpm por 96h a 25 °C (Tabela 1).

Posteriormente, o segundo ensaio exploratório (F7-F12) teve como base os tensoativos selecionados no primeiro ensaio, poloxamer 407, cloreto de benzalcônio e cloreto de cetilpiridínio, com o objetivo de observar se a redução do DHM se manteve com a diminuição da concentração dos tensoativos selecionados. Além disso, verificou-se a possibilidade das mudanças na quantidade de esferas de zircônia e na velocidade de agitação afetarem o perfil de redução do DHM. A concentração da suspensão de Lapdesf GL-FT 5 e do tensoativo foram ambas de 1% (m/m), em proporção de 1:1 (Tabela 1). Novamente, a massa foi ajustada com água para 1,0g. O sistema foi formado por recipiente de vidro de 1,5 mL, 2 barras magnéticas (5,0 x 3,0 mm) e foi submetido a agitação por 96h, em placa de agitação magnética, a 25°C (Tabela 1).

Todas as preparações (primeiro e segundo ensaio exploratório) tiveram seu DHM e Potencial Zeta (PZ) avaliados ao final do processo de moagem e durante 7º e 30º dias de armazenamento a 4 °C.

Por fim, o terceiro ensaio exploratório avaliou se os tensoativos catiônicos foram capazes de manter a redução do DHM quando a concentração foi ajustada para os valores aprovados pela FDA para uso oftálmico. Quatro preparações foram desenvolvidas com o composto Lapdesf GL-FT 5 a 1% (m/m) e os tensoativos CPC e BAK a 0,05% (m/m) (F13 e F14, respectivamente) e a 0,1% (m/m) (F15 e F16, respectivamente) (Tabela 1). O sistema, formado por recipiente de vidro de 1,5 mL, 0,200 g de esferas de zircônia e 2 barras magnéticas cilíndricas (5,0 x 3,0 mm), foi submetido a agitação de 800 rpm em agitador magnético por 96 h a 25°C. O DHM e o PZ foram avaliados após o término da moagem e durante o dia 7 e 60 de armazenamento a 4°C.

Tabela 1: Ensaios exploratórios para a seleção do tipo de tensoativo e sua concentração (%m/m), concentração do composto Lapdesf GL-FT 5 (%m/m) e dos parâmetros do processo.

Fórmula	Lapdesf GL-FT 5 (%m/m)	Tensoativo	Concentração do tensoativo (%m/m)	Esferas de zircônia (g)	Velocidade de agitação (rpm)
1º Ensaio exploratório					
F1	3,0	poloxamer 407	3,0	0,200	800
F2	3,0	poloxamer 108	3,0	0,200	800
F3	3,0	tween 80	3,0	0,200	800
F4	3,0	TPGS	3,0	0,200	800
F5	3,0	CPC	3,0	0,200	800
F6	3,0	BAK	3,0	0,200	800
2º ensaio exploratório					
F7	1,0	poloxamer 407	1,0	0,200	800
F8	1,0	CPC	1,0	0,200	800
F9	1,0	BAK	1,0	0,200	800
F10	1,0	poloxamer 407	1,0	0,300	1200
F11	1,0	CPC	1,0	0,300	1200
F12	1,0	BAK	1,0	0,300	1200
3º Ensaio exploratório					
F13	1,0	CPC	0,05	0,200	800
F14	1,0	BAK	0,05	0,200	800
F15	1,0	CPC	0,1	0,200	800
F16	1,0	BAK	0,1	0,200	800

TPGS: tocoferol polietileno glicol succi-nato; CPC: cloreto de cetilpiridínio; BAK: cloreto de benzalcônio.

4.1.2 Planejamento experimental empregando método de superfície de resposta para otimização da formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5

A otimização das formulações foi realizada empregando planejamento estatístico pelo método de superfície de resposta. As variáveis selecionadas a partir dos resultados dos 3 ensaios exploratórios prévios, foram: concentração de poloxamer 407 (%m/m), concentração cloreto de cetilpiridínio (%m/m) e a velocidade de agitação do sistema (rpm), conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Perfil dos níveis das variáveis selecionadas no planejamento estatístico para otimização da formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5.

Nível	Cloreto de cetilpiridínio (%m/m)	Poloxamer 407 (%m/m)	Velocidade de agitação (rpm)
Mínimo (-1)	0,050	0,0	800
Ponto central (0)	0,075	0,5	1000
Máximo (+1)	0,100	1,0	1200

As preparações foram desenvolvidas mantendo a concentração de Lapdesf GL-FT 5 constante em 1,0% (m/m). Para o processo empregou-se o

recipiente de vidro de 1,5 mL, 2 barras magnéticas cilíndricas (5,0 x 3,0 mm) e 0,200 g de esfera de zircônia. O sistema foi submetido a agitação por 96h a 25°C. O DHM foi avaliado após o término do processo de moagem. O software Minitab 18® foi utilizado para gerar a matriz de ensaio e para a avaliação dos resultados.

4.1.3 Verificação do modelo matemático pelo método de superfície de resposta para otimização da preparação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5

A verificação do modelo estatístico gerado no item 4.1.2 foi realizada a partir da formulação proposta pela equação matemática derivada da análise do método de superfície de resposta (Fa e Fb) (Tabela 3).

Tabela 3: Formulações para a verificação do modelo pelo método de superfície de resposta para otimização da formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5

Formulação	cloreto de cetilpiridínio (%m/m)	Poloxamer 407 (%m/m)	Velocidade de agitação (rpm)
Fa	0,092	0,000	800
Fb	0,080	0,299	800

As formulações foram preparadas com 1% (m/m) de Lapdesf GL-FT 5. Para o processo empregou-se o recipiente de vidro de 1,5 mL, 2 barras magnéticas cilíndricas (5,0 x 3,0 mm) e 0,200 g de esfera de zircônia.

4.2 Caracterização da formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5

4.2.1 Diâmetro Hidrodinâmico Médio (DHM) e Índice de Polidispersão (IP)

O DHM e o IP das partículas foram determinados por espalhamento de luz dinâmica, observando-se à luz espalhada em ângulo de 90°. O DHM e o IP foram determinados empregando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Para a análise, diluiu-se as amostras na razão de 1:24, em solução saturada filtrada do fármaco, recém-preparada.

4.2.2 Viscosidade aparente

A viscosidade foi medida a 25°C utilizando o equipamento Brookfield modelo DV_IPrime. O Spin utilizado para o experimento foi do tipo 00 e a velocidade foi de 100 rpm.

4.2.3 Potencial Zeta (PZ)

O Potencial Zeta foi determinado empregando o equipamento Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). O cálculo do Potencial Zeta foi efetuado empregando a equação de Helmholtz-Smoluchowski a partir das medidas de mobilidade eletroforética, relação entre a velocidade da partícula e o campo elétrico aplicado:

$$\zeta = \frac{Ue \cdot 3\eta}{2\varepsilon \cdot F(\kappa\alpha)} \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que, ζ corresponde ao potencial zeta, Ue a mobilidade eletroforética, η a viscosidade, ε a constante dielétrica e $F(\kappa\alpha)$ a função de Henry. As amostras foram diluídas em solução saturada filtrada de Lapdesf GL-FT 5, na proporção de 1:24.

4.2.4 pH

O pH das preparações foi medido utilizando pHmetro Seven Excelente Multiparameter (Mettler Toledo, USA), após a calibração do equipamento com soluções tampão pH 7,0 e 4,0.

4.2.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN- C^{13})

A ressonância magnética nuclear (RMN) de C^{13} foi realizada com o equipamento Bruker Avance DPX 300 MHz com sonda de 5mm multinuclear, a fim de observar a presença do composto na preparação e a integridade da partícula do candidato a fármaco Lapdesf GL-FT 5 após processo de moagem, utilizando a preparação Fa (1% de Lapdesf GL-FT 5 e 0,092% de cloreto de cetilpiridínio).

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O ensaio de MEV foi executado no Laboratório de Biotecnologia no Núcleo de Bionanomanufatura do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT). Primeiramente, a amostra de 0,05 mL da nanossuspensão Fa (1% de Lapdesf

GL-FT 5 e 0,092% de cloreto de cetilpiridínio) foi depositada em lamínula e submetida a processo de secagem em dessecador por 24 horas. Transferiu-se o sólido resultante para o suporte metálico (stubs), que foi posteriormente coberto com ouro de paládio (Au-Pd) por meio de processo de pulverização (mini Sputter Coater modelo POLARON EMITECH SC7620). Para a MEV utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura modelo ZEISS EVO MA10, com geração de elétrons por filamento de tungstênio, câmara de alto vácuo, modo secundário de detecção de elétrons e tensão de aceleração de elétron de 20 kV. A análise da morfologia e do tamanho, antes e após o processo de moagem, foram efetuadas por meio do programa ImageJ®, considerando a menor extensão da partícula.

5 Resultado e discussão

5.1 Ensaio exploratório para seleção dos parâmetros do processo de desenvolvimento de formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5

A primeira etapa do estudo consistiu na seleção dos tensoativos, devidamente aprovados para a aplicação ocular, adequados para reduzir o tamanho de partícula e que fossem capazes de manter o fármaco em escala nanométrica.

Os estabilizantes poloxamer 407 (F1), cloreto de cetilpiridínio (F5) e cloreto de benzalcônio (F6) apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) de $237,5 \pm 20,8$; $237,8 \pm 2,9$; $150,0 \pm 2,2$ nm, respectivamente, logo após o término do processo de moagem (dia 0) (Tabela 4). Além disso, os tensoativos foram capazes de manter o tamanho na escala nanométrica em 30 dias (F1: $227,8 \pm 1,4$ nm; F5: $200,0 \pm 2,9$ nm; F6: $139,9 \pm 2,0$ nm) (Tabela 4).

O índice de polidispersão (IP), indicador do grau de homogeneidade do DHM na formulação para as preparações F1, F5 e F6 foi $0,202 \pm 0,008$; $0,293 \pm 0,107$, e $0,203 \pm 0,100$ respectivamente, ao fim do processo de moagem (dia 0) (Tabela 4). Valores de IP próximos de 0 indicam que o sistema é homogêneo, enquanto valores próximos de 1 mostram elevado grau de heterogeneidade da formulação. Assim, para nanosuspensões, o IP abaixo de 0,3 aponta grau adequado de homogeneidade (DANAEI et al., 2018).

Os tensoativos catiônicos (F5 e F6) permitiram manter o potencial zeta (PZ) acima de +30 mV, mesmo 30 dias após o término de processo de moagem (F5: $+62,3 \pm 7,1$ a $+56,0 \pm 1,9$ mV; F6: $+45,3 \pm 1,8$ a $+45,1 \pm 1,1$ mV, nos dias 0 e 30, respectivamente) em condutividade 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e pH 6,50 (Tabela 4). Valores de PZ acima de $\zeta = |30|$ mV tem potencial para evitar a agregação das partículas por promover a estabilização eletrostática do sistema (SUN et al., 2012).

Por outro lado, o tensoativo poloxamer 188 (F2) apresentou o DHM de $937,6 \pm 249,8$ nm, logo após o término da moagem (dia 0). Enquanto o estabilizante polissorbato 80 (F3) apresentou agregação ao final do período de avaliação, com o DHM aumentando de $239,2 \pm 16,6$ para $545,6 \pm 86,8$ nm, nos 30 dias de monitoramento (Tabela 4). Dentre os tensoativos não-iônicos, a melhor performance do poloxamer 407 (massa molecular: 10000- 14600 g/mol) frente ao poloxamer 188 e o polissorbato 80 pode ser explicada pela diferença da massa molecular entre os estabilizantes. A menor massa molecular do poloxamer 188 (7680- 9510 g/mol) e do polissorbato 80 (604.8 g/mol) forma camada estérica fina, incapaz de superar as forças de Van de Waals que existem entre as partículas, permitindo a agregação do composto. Além disso, o poloxamer 407 apresenta o balanço hidrofílico-hidrofóbico (HLB) intermediário (18 a 23), sendo mais adequado para a redução de partícula quando comparado com os valores mais extremos do polissorbato 80 (HLB: 14 a 18) e do poloxamer 188 (HLB>24) (CHAUDHARI et al., 2017).

A formulação contendo TPGS (F4) (Log P 9.9) apresentou o DHM e IP de $348,9 \pm 25,3$ nm e $0,148 \pm 0,135$, respectivamente logo após o término do processo de moagem (Tabela 4). O pior desempenho da formulação F4 frente a F1 pode ser explicado pela alta lipofilicidade do Lapdesf GL-FT 5 (Log P teórico de $6,07 \pm 1,03$ calculado pelo programa ACD/Labs Release: 12.000) e do estabilizante, o que impede a solubilização adequada do candidato a fármaco em água e consequentemente a redução do DHM (VAN EERDENBRUGH et al., 2009).

Tabela 4: Diâmetro hidrodinâmico médio (nm), IP e potencial zeta (mV) para nanossuspensões de Lapdesf GL-FT 5 referentes ao primeiro ensaio exploratório (3,0% em peso; variando os tensoativos em 1:1)

Formulação	Dia								
	0			7			30		
	DHM (nm)	IP	PZ (mV)	DHM (nm)	IP	PZ (mV)	DHM (nm)	IP	PZ (mV)
1ºEnsaio exploratório									
F1	237,5± 20,8	0,202±0,008	-7,0±0,5	134,1±2,8	0,527±0,017	-9,1±0,2	227,8±1,4	0,149±0,046	-10,2±0,3
F2	937,6±249,8	0,251±0,238	-6,2±1,6	629,0±23,8	0,333±0,073	-10,4±0,2	-	-	-
F3	239,2±16,6	0,183 0,180	-20,6±0,5	264,7±24,7	0,179±0,121	-16,4±0,5	545,6±86,8	0,428±0,290	-17,4±0,4
F4	348,9±25,3	0,148±0,135	-8,9±0,5	314,6±5,0	0,170±0,049	-9,9±0,3	335,0±2,9	0,207±0,006	-6,4±0,0
F5	237,8± 2,9	0,293±0,107	+62,3±7,1	261,7±2,1	0,163±0,013	+58,5±0,6	200,0±2,9	0,17±0,031	+56,0±1,9
F6	150,0± 2,2	0,203±0,000	+45,3±1,8	141,8±0,8	0,196±0,007	+43,3±0,9	139,9±2,0	0,203±0,002	+45,1 1,1

DHM: diâmetro hidrodinâmico médio; IP: índice de polidispersão; PZ: potencial zeta; F1: poloxamer 407; F2: poloxamer 188; F3: polissorbato 80; F4: TPGS; F5: cloreto de cetilpiridínio; F6: cloreto de benzalcônio; (-): não medido devido à agregação.

Assim, a partir dos resultados obtidos na primeira etapa foi possível selecionar os tensoativos poloxamer 407, CPC e BAK para as fases seguintes do processo de preparo de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5. O segundo ensaio exploratório teve como objetivo analisar o impacto dos parâmetros do processo na moagem. Também objetivou-se analisar se os tensoativos foram capazes de manter a redução do DHM mesmo em concentrações menores. Para esta etapa, a quantidade de Lapdesf GL-FT 5 e de tensoativo foram reduzidas de 3% para 1% (m/m), sendo que a proporção foi mantida em 1:1. Os resultados de DHM, IP e PZ obtidos durante o segundo ensaio exploratório estão descritos na Tabela 5 (F7-F12).

Demonstrou-se que para o poloxamer 407 (F7 e F10), os parâmetros mais adequados para a redução do DHM foram 0,300 g de esfera de zircônia e velocidade de agitação de 1200 rpm (F10: 201,0 ± 2,9 e 156,6 ± 1,3 nm, no término da moagem e após 30 dias, respectivamente) (Tabela 5). Em contrapartida, para os tensoativos CPC (F8 e F11) e BAK (F9 e F12), melhores resultados foram obtidos quando se aplicou 0,200g de esfera de zircônia e 800 rpm de velocidade de agitação (F8: 99,1 ± 2,0 e 103,2 ± 0,6 nm; F9: 107,8 ± 2,3 e 95,2 ± 0,9 nm no término do processo de moagem e com 30 dias, respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 5: DHM (nm), IP e potencial zeta (mV) para nanosuspensões de Lapdesf GL-FT 5 referentes ao segundo exploratório (1,0% em massa; variando os estabilizadores, mantendo a proporção em 1:1).

Formulação	Dia								
	0			7			30		
	DHM (nm)	IP	PZ (mV)	DHM (nm)	IP	PZ (mV)	DHM (nm)	IP	PZ (mV)
2ºEnsaio exploratório									
F7	244,9±0,3	0,235±0,089	-8,9±0,6	219,5±4,6	0,189±0,007	-8,7±0,2	233,4±1,5	0,249±0,018	-11,3±0,6
F8	99,1±2,0	0,218±0,007	+44,6±1,3	87,4±1,2	0,18 ±0,009	+43,1±1,5	103,2±0,6	0,249±0,009	+45,2±1,2
F9	107,8±2,3	0,248±0,006	+52,3±1,8	100,7±1,6	0,225±0,009	+53,2±0,2	95,2±0,9	0,203±0,005	+55,8±0,6
F10	201,0±2,9	0,209±0,034	-10,0±0,6	183,9±1,0	0,184±0,010	-9,6±0,2	156,6±1,3	0,124±0,022	-12,5±0,3
F11	185,0±0,8	0,203±0,014	+42,4±0,2	233,7±2,8	0,234±0,012	+40,5±0,6	250,7±2,7	0,237±0,016	+42,9±0,8
F12	250,3±11,1	0,598±0,096	+58,3±0,2	171,1±6,0	0,479±0,018	+54,6±0,6	123,2±3,0	0,549±0,067	+56,6±1,4

DHM: diâmetro hidrodinâmico médio; IP: índice de polidispersão; PZ: potencial zeta; F7 e F10: poloxamer 407; F8 e F11: cloreto de cetilpiridínio; F9 e F12: cloreto de benzalcônio; F7, F8 e F9: os parâmetros do processo foram 800 rpm de velocidade de agitação e 0,200 mg de esfera de zircônia; F10, F11 e F12: os parâmetros do processo foram 1200 rpm de velocidade de agitação e 0,300 mg de esfera de zircônia;

O uso de tensoativos catiônicos se mostra bastante vantajoso em preparações de aplicação ocular. Esses benefícios decorrem da carga positiva que os estabilizantes conferem as partículas, sendo adequados para interagir com os componentes de carga negativa presentes na mucina que recobre a superfície ocular. Esta interação eletrostática é capaz de aumentar o tempo de residência da partícula no olho, diminuindo sua remoção pelos mecanismos de proteção ocular. Logo aumenta-se a internalização do fármaco, tendo potencial para reduzir a dose necessária para atingir o efeito terapêutico. Assim, diminui-se também os efeitos adversos e amplia-se a adesão do paciente. Além disso, os tensoativos catiônicos também auxiliam na estabilidade da formulação, não apenas por formar a barreira eletrostática entre as partículas, colaborando para evitar a agregação, mas também por conferir proteção antimicrobiana, já que esses compostos possuem conhecida aplicação como conservantes em colírios de múltiplas doses (ROMERO et al., 2016).

Entretanto, os tensoativos catiônicos apresentam alta toxicidade, assim, as concentrações aprovadas para aplicação em produtos oftálmicos são

limitadas a 0,1% tanto para o CPC quanto para o BAK. Dessa forma, ensaios foram realizados para verificar se esses tensoativos seriam capazes de manter a estabilização eletrostática mesmo em concentrações aprovadas para uso ocular. Os resultados de DHM, IP e PZ obtidos estão descritos na Tabela 6. As formulações contendo 0,05% de CPC e BAK (F13 e 14 respectivamente) e 0,1% (F15 e F16 respectivamente) foram capazes de manter tanto DHM em escala nanométrica, quanto o PZ acima de + 30 mV, nos 60 dias de avaliação. Entretanto, o CPC foi o tensoativo que apresentou melhor perfil de estabilidade após o término do período de avaliação (F15: DHM= 127,0±2,1 nm; IP: 0,229±0,015; PZ: +50,1±1,4 mV, após 60 dias). A condutividade medida foi de 50 μ S/cm, enquanto o pH medido foi de 6,50. Assim, esse tensoativo foi escolhido para as etapas subsequentes de otimização.

Tabela 6: Diâmetro hidrodinâmico médio (nm), IP e potencial zeta (mV) para nanosuspensões de Lapdesf GL-FT 51% em peso), variando a concentração do estabilizante catiônico.

Formulação	Dia								
	0	7			60				
	DHM (nm)	IP	PZ (mV)	DHM (nm)	IP	PZ (mV)	DHM (nm)	IP	PZ (mV)
3ºEnsaio exploratório									
F13	291,5±1,9	0,169±0,031	+24,3±0,8	272,6±7,3	0,148±0,035	+25,5±0,8	358,6±22,7	0,310±0,071	+26,9 ± 0,8
F14	144,4±1,4	0,170±0,008	+29,9±0,3	142,4±0,7	0,152±0,019	+30,4±0,6	163,5±6,6	0,231±0,040	+30,0±1,1
F15	116,5±0,9	0,216±0,006	+48,2±1,0	110,3±0,4	0,167±0,024	+47,4±0,4	127,0±2,1	0,229±0,015	+50,1±1,4
F16	137,8±1,8	0,160±0,008	+33,0±0,6	136,8±2,5	0,153±0,028	+34,5±0,2	149,3±3,5	0,242±0,014	+35,6±0,5

DHM: diâmetro hidrodinâmico médio; IP: índice de polidispersão; PZ: potencial zeta; F13: 0,05% em peso de cloreto de cetilpiridínio, F14: 0,05% em peso de cloreto de benzalcônio; F15: cloreto de cetilpiridínio 0,1% em peso; F16: 0,1% em peso de cloreto de benzalcônio.

5.2 Otimização da formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5

Após a finalização dos ensaios exploratórios foi possível definir os parâmetros do processo para a realização da otimização da nanossuspensão de Lapdesf GL-FT 5. Para o planejamento de experimento por superfície de resposta selecionou-se como níveis mínimo e máximo de concentração de tensoativo cloreto de cetilpiridínio 0,05 e 0,1%, respectivamente. Esses valores apresentaram perfil adequado de redução de DHM e estão dentro do permitido

pela legislação. Para o poloxamer 407, o nível mínimo foi definido como a ausência desse tensoativo, já que os ensaios exploratórios demonstraram que o DHM foi mantido na escala nanométrica mesmo sem o estabilizante não-iônico. A concentração máxima de poloxamer 407 foi definida como 1,0%, de acordo com os resultados obtidos no segundo ensaio exploratório. Por fim, a velocidade de agitação mínima e máxima foram estabelecidas em 800 e 1200 rpm, respectivamente, também de acordo com os resultados positivos obtidos no segundo ensaio exploratório.

5.2.1 Otimização das formulações de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5, contendo o tensoativo cloreto de cetilpiridínio, utilizando planejamento de experimento por superfície de resposta

Os resultados obtidos a partir dos parâmetros definidos para o planejamento de experimento por superfície de resposta estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: DHM obtidos para as preparações de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5 da matriz de ensaio de experimentos por superfície de resposta.

Formulação	Ordem	Ponto central	CPC	Poloxamer 407	Velocidade (rpm)	DHM (nm)
F17	12	-1	0,075	1,0	1000	268,20 \pm 2,5
F18	4	1	0,100	1,0	800	265,40 \pm 1,2
F19	11	-1	0,075	0,0	1000	164,90 \pm 1,6
F20	20	0	0,075	0,5	1000	246,50 \pm 1,7
F21	6	1	0,100	0,0	1200	192,54 \pm 0,2
F22	13	-1	0,075	0,5	800	252,50 \pm 2,4
F23	2	1	0,100	0,0	800	137,02 \pm 0,9
F24	8	1	0,100	1,0	1200	267,40 \pm 1,7
F25	9	-1	0,050	0,5	1000	266,10 \pm 6,4
F26	17	0	0,075	0,5	1000	274,80 \pm 1,4
F27	10	-1	0,100	0,5	1000	227,00 \pm 4,4
F28	3	1	0,050	1,0	800	231,30 \pm 4,2
F29	15	0	0,075	0,5	1000	266,20 \pm 3,4
F30	18	0	0,075	0,5	1000	256,00 \pm 3,4
F31	5	1	0,050	0,0	1200	164,82 \pm 3,2
F32	1	1	0,050	0,0	800	251,88 \pm 1,9

F33	19	0	0,075	0,5	1000	269,70 \pm 3,4
F34	16	0	0,075	0,5	1000	270,65 \pm 3,4
F35	14	-1	0,075	0,5	1200	241,10 \pm 3,2
F36	7	1	0,050	1,0	1200	233,70 \pm 6,3

DHM: diâmetro hidrodinâmico médio

O menor e o maior valor de DHM foram, respectivamente, de 137,02 \pm 0,9 (F23) e 270,65 \pm 3,4nm (F34). Esses valores estão dentro da faixa esperada para nanocristais (até 500 nm) (KECK, MÜLLER 2006) (Tabela 7). A primeira avaliação demonstrou que a concentração de cloreto de cetilpiridínio foi a variável que impactou o DHM, assim como a menor concentração de poloxamer 407, permitindo que o menor valor de tamanho fosse obtido (F23). A distribuição do tamanho das partículas apresenta perfil monomodal, com exceção das formulações F18 e F28. A característica adequada de redução do tamanho de partícula utilizando o cloreto de cetilpiridínio se deve provavelmente à lipofilicidade do tensoativo (log P 3,47). Essa característica permitiu adsorção adequada à superfície da partícula de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5 (log P teórico 6,07 \pm 1,03), bem como a sua solubilização em água.

Os resultados obtidos a partir da matriz de experimento foram descritos na Tabela 8, que mostra a resposta da análise de variância para o DHM. As variáveis independentes, assim como, suas interações são consideradas estatisticamente significativas quando os valores-p forem inferiores a 0,05 ($\alpha=0,05$) (PALLANT, 2011). Assim, os termos considerados significativos foram: no modelo linear, a concentração de cloreto de cetilpiridínio, a concentração de poloxamer 407 e a velocidade de agitação, enquanto no modelo quadrático, apenas a concentração de poloxamer 407. Na interação com dois fatores, a concentração de cloreto de cetilpiridínio com a concentração de poloxamer 407 e a concentração de poloxamer 407 com a velocidade de agitação foram os fatores significativos. A adequação desse modelo pode ser confirmada pelo valor não significativo para a falta de ajuste (valor-p=0,262), como apresentado na Tabela 8.

Tabela 8: Análise de variância para testar a significância dos termos obtidos para a variação de DHM de partícula das preparações de nanocristal de

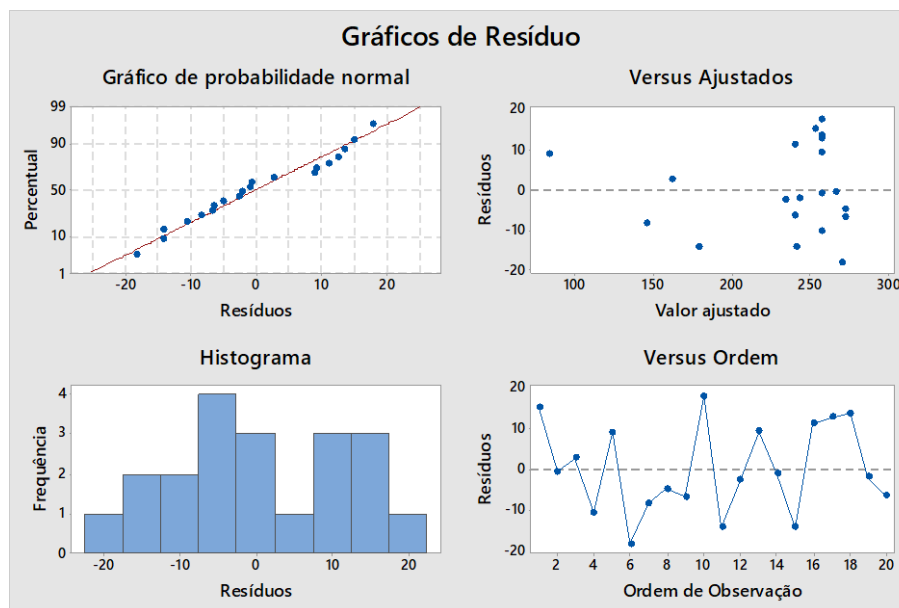
Lapdesf GL-FT 5. As variáveis são: concentração de cloreto de cetilpiridínio (%m/m), concentração de poloxamer 407 (%m/m) e velocidade (rpm).

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	6	47723,5	7953,9	46,35	0,0001
Linear	3	25117,6	8372,5	48,79	0,0001
CPC	1	2510,3	2510,3	14,63	0,002
Poloxamer 407	1	20687,9	20687,9	120,56	0,0001
Velocidade	1	1919,3	1919,3	11,18	0,005
Quadrado	1	12171,7	12171,7	70,93	0,0001
Poloxamer 407*Poloxamer 407	1	12171,7	12171,7	70,93	0,0001
Interação com 2 Fatores	2	10434,3	5217,1	30,40	0,0001
CPC*Poloxamer 407	1	8124,3	8124,3	47,34	0,0001
Poloxamer 407*Velocidade	1	2310,0	2310,0	13,46	0,003
Erro	13	2230,8	171,6		
Falta de ajuste	8	1662,4	207,8	1,83	0,262
Erro puro	5	568,4	113,7	*	*
Total	19	49954,3			

GL: grau de liberdade; SQ (Aj.): Soma dos quadrados ajustados; QM (Aj.): Média quadrática ajustada, Valor-F: F estatístico; Valor-P: nível de significância; * valor não calculado pelo software Minitab®18; CPC: Cloreto de cetilpiridínio.

A análise dos resíduos está apresentada na Figura 2. No gráfico de probabilidade normal, os pontos estão próximos da linha central, indicando que possivelmente os resíduos estão distribuídos normalmente. Considerando o histograma, que apresenta as características dos resíduos, a predição de normalidade fica prejudicada pelo deslocamento dos resíduos. Os gráficos de observações individuais (Gráfico Versus ajustados e Gráfico Versus ordem) indicam que não há correlação entre os resíduos, e, portanto, os erros são aleatórios (CALLEGARI-JACQUES, 2007).

Figura 2: Gráfico de resíduos para o modelo estatístico das formulações de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5.



A ausência da falta de ajuste indica boa confiabilidade na adequação do modelo, entretanto, outros fatores externos, não controláveis e não explicados pelo modelo proposto devem ser considerados. Assim, para verificar a confiabilidade do modelo, analisa-se medidas de desempenho, como o coeficiente de determinação (R^2), e o coeficiente de determinação ajustado para os graus de liberdade associados (R^2_{Aj}), indicados na Tabela 9.

Tabela 9: Significância dos coeficientes de regressão codificados e índice de ajuste do modelo selecionado na avaliação DHM nanocristais Lapdesf GL-FT 5.

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P
Constante	257,06	4,14	62,05	0,001
CPC	-15,84	4,14	-3,82	0,002
Poloxamer 407	45,48	4,14	10,98	0,001
Velocidade	-13,85	4,14	-3,34	0,005
Poloxamer 407*Poloxamer 407	-49,34	5,86	-8,42	0,001
CPC*Poloxamer 407	31,87	4,63	6,88	0,001
Poloxamer 407*Velocidade	16,99	4,63	3,67	0,003

DP: 13,09% R^2 : 95,53% $R^2(Aj.)$: 93,47% $R^2(Prev.)$: 86,30%

Coef: coeficiente; Coef-DP: coeficiente de desvio padrão; Valor-p: nível de significância dos termos; tamanho da diferença em relação à variação; CPC: cloreto de cetilpiridínio; DP: desvio padrão; R^2 : coeficiente de determinação; $R^2(Aj.)$: coeficiente de determinação ajustado; $R^2(Prev.)$: coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado.

A Tabela 9 mostra que os resultados de coeficiente de determinação e o coeficiente de determinação ajustado, respectivamente 95,53% e 93,47%, estão próximos suficientes para inferir que valores não significativos não foram incluídos no modelo. Valores de R^2 (prev.) acima de 80% indicam grande probabilidade dos valores teóricos e dos valores práticos estarem muito próximos. Para o modelo obtido nesse experimento, o valor de R^2 (prev.) foi de 86,30%.

Por fim, a partir do planejamento estatístico foi gerada a Equação 2, capaz de descrever a influência de cada fator na resposta (DHM).

$$DHM = 459,6 - 1908 CPC - 72,8 Poloxamer\ 407 - 0,1542 Velocidade - 197,4 Poloxamer\ 407 * Poloxamer\ 407 + 2549 CPC * Poloxamer\ 407 + 0,1699 Poloxamer\ 407 * Velocidade \quad Eq.(2)$$

DHM corresponde ao diâmetro hidrodinâmico médio e CPC à concentração de cloreto de cetilpiridínio. Destaca-se que o coeficiente para a concentração de cloreto de cetilpiridínio (coeficiente= -1908) tem maior influência na redução do DHM quando comparado à concentração de poloxamer 407 e à velocidade de agitação (coeficientes iguais a - 0,1542 e -72,8, respectivamente). Observou-se que o termo quadrático poloxamer 407*poloxamer 407 (coeficiente= -197,4) influenciou positivamente na redução do DHM, enquanto as interações CPC*poloxamer 407 (coeficiente= + 2549) e Poloxamer 407*Velocidade (coeficiente= + 0,1699) resultaram em aumento do DHM.

Embora a associação de poloxamer 407 e cloreto de cetilpiridínio tenha impacto não desejado na redução do DHM das partículas, seu uso associado não pode ser descartado, uma vez que ambos atuam de forma complementar, promovendo estabilização estérica e eletrostática, respectivamente, possivelmente mantendo a estabilidade da formulação por mais tempo (YANG et al., 2018).

5.2.1.1 Verificação do modelo de otimização das formulações de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5 contendo cloreto de cetilpiridínio.

A verificação da confiabilidade do modelo foi realizada com duas formulações, uma contendo o estabilizante poloxamer 407 e outra na ausência do mesmo, a fim de confirmar a validade do modelo sem esse tensoativo.

A Tabela 10 apresenta os valores de concentração de poloxamer 407 (%m/m), cloreto de cetilpiridínio (%m/m) e velocidade de agitação empregada no desenvolvimento das formulações teste e os valores de DHM teóricos e experimentais determinados ao término do processo de moagem (96 horas).

Tabela 10: Variáveis para as formulações desenvolvidas para a verificação do modelo, bem como o valor de DHM teórico e experimental.

Fórmula	Cloreto de cetilpiridínio (% m/m)	Poloxamer 407 (%m/m)	Velocidade (rpm)	DHM teórico (nm)	DHM Experimental (nm)
Fa	0,0922	0	800	160,3	167,1±2,0
Fb	0,080	0,299	800	186,7	173,7±1,5

DHM: diâmetro hidrodinâmico médio.

As duas formulações (Fa e Fb) preparadas para verificar o modelo matemático apresentaram valores de tamanho experimentais próximos aos teóricos e mostraram que o modelo é suficientemente preditivo para ser usado no processo de otimização das formulações de nanocristal do candidato a fármaco Lapdesf GL-FT 5.

A ausência de agregação na amostra foi confirmada realizando a medição do DHM da Fa quatro meses após sua preparação (DHM final: 163,5±4,6 nm). Durante o período, a formulação foi armazenada a 4°C e sob abrigo da luz. O pH dessa formulação é de 4,22 e foi posteriormente ajustado para 7,42 utilizando tampão fosfato 7,4.

5.3 Caracterização da formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5 contendo cloreto de cetilpiridínio.

A formulação Fa contendo 1% (m/m) de Lapdesf GL-FT 5 e cloreto de cetilpiridínio a 0,092% (m/m) foi selecionada como preparação otimizada para as próximas etapas de caracterização. A viscosidade desta preparação foi medida em triplicata, os valores se encontram na Tabela 11.

Tabela 11: Medida da viscosidade da formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5 contendo cloreto de cetilpiridínio.

Medida	Viscosidade (cP)	%
V1	1,42	23,7
V2	1,37	23,0
V3	1,38	23,1
Média \pm DP	1,39 \pm 0,02	23,27 \pm 0,31

DP: Desvio padrão.

Com referência às características das formulações, inerentes às preparações oftálmicas, além do pH e da viscosidade aparente, abordadas no presente estudo, a isotonicidade e a esterilidade são requisitos de qualidade igualmente exigidos para a segurança do paciente. No caso da isotonicidade, o líquido lacrimal apresenta valor de semelhante a solução de cloreto de sódio a 0,9% m/m. No entanto, o olho pode tolerar um intervalo de 0,6% a 1,8% m/m. Em geral na isotonicidade de preparações oftálmicas convencionais é utilizado o cloreto de sódio. Porém em preparações nanoestruturadas o cloreto de sódio pode alterar sua estabilidade físico-química. Assim, são utilizados agentes não-iônicos tais como o glicerol, sorbitol e dextrose (Romero et al, 2016). Quanto à esterilidade, essa deve ser alcançada por meio de processo asséptico e/ou esterilização terminal. Essas etapas serão abordadas em estudo futuro para as formulações desenvolvidas.

5.3.1 Ressonância Magnética Nuclear C^{13} (RMN- C^{13}) da formulação contendo cloreto de cetilpiridínio.

A avaliação da presença do composto Lapdesf GL-FT 5 na formulação e subsequentemente da ocorrência de reação de hidrólise no carbono estérico 1' do composto (Figura 3) foi realizada por meio de RMN- C^{13} . Desse modo, foram obtidos os espectros de RMN- C^{13} da nanossuspensão liofilizada de Lapdesf GL-FT 5, em DMSO de (1,5g de Lapdesf GL-FT 5 para 1g de DMSO).

Observou-se, nos espectros de RMN- C^{13} , que os picos obtidos nas regiões: 203.107 (C_{20}), 185.035(C_3), 170.020 ($C_{1'}$) ,166.494 ($C_{1''}$) ,164.536 (C_5) ,156.388 (C_2) ,136.515 ($C_{2'}$) ,134.831 ($C_{3''}$) ,131.405 ($C_{2''}$) ,129.882 ($C_{3'}$), 128.018 ($C_{5'}$) ,127.961 ($C_{4'}$), 127.063 (C_1), 123.520 ($C_{4''}$), 121.651 (C_{21}), 98.023 (C_{17}), 97.304 (C_{22}), 55.043 (C_9), 46.907 (C_{13}), 45.740 (C_{14}), 43.627 (C_{12}), 34.474 (C_8), 31.216 (C_6), 30.652 (C_{15}), 29.894 (C_7), 20.754 (C_{19}), 16.938(C_{18}), 13.854 (C_{25}) e 13.815 (C_{24}) ppm se mostraram fortemente similares quanto a localização

(ppm) e intensidade, aos obtidos por Machado (2017) pg. 107, os quais podem ser observados na Figura A e B, respectivamente.

Referente ao carbono estérico $C_{1'}$, seu pico está localizado em 170,020 ppm, enquanto no espectro de referência, o pico está contido em 170,24 ppm. Essa proximidade de valores representa forte indício de que a ligação se manteve intacta durante o processo.

Finalmente, pode-se concluir que as similaridades observadas nos espectros de RMN- C^{13} obtidos nesse estudo e por Machado (2017) pg.107 sugerem não somente a presença do composto Lapdesf GL-FT 5 na preparação de nanocristais, como também, que o candidato a fármaco não sofre reação de hidrólise na carbonila contida no carbono $1'$. Assim, pode-se inferir que o processo de moagem em escala reduzida não promoveu a quebra do composto.

Figura 3: Estrutura do composto Lapdesf GL-FT 5 (Desenhado no programa Chem Draw 12.0).

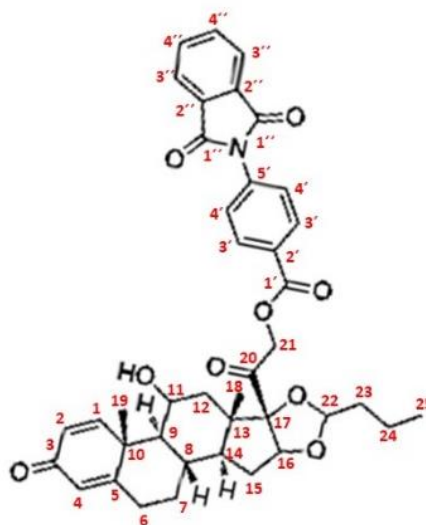
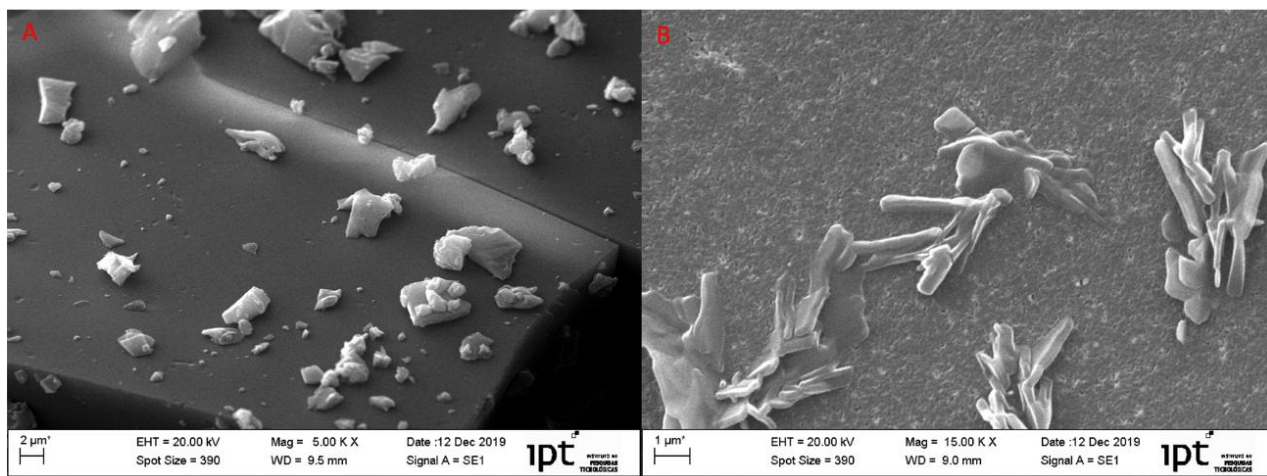


Figura 4: (A) Espectro de Ressonância Magnética Nuclear da formulação de nanocristal de Lapdesf GL-FT 5 (RMN- C^{13} , 75 MHz, DMSO d_6); (B) Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Lapdesf GL-FT 5 (RMN- C^{13} , 75 MHz, DMSO d_6). Retirado de Machado (2017), pg. 107.

Figura 5: (A) MEV do composto híbrido Lapdesf GL-FT 5; (B) MEV de nanocristais de Lapdesf GL-FT 5.



Destaca-se que as imagens obtidas pela MEV indicam que houve redução do tamanho e alteração da morfologia das partículas de Lapdesf GL-FT 5. Além disso, as imagens demonstram que os nanocristais apresentaram aumento da área superficial, o que proporcionaria vantagens termodinâmicas e cinéticas, melhorando a solubilidade de saturação e velocidade de dissolução em água.

6. Conclusão

Os tensoativos utilizados para o desenvolvimento das preparações foram eficientes em promover estabilidade estérica (poloxamer 407) e eletrostática devido à repulsão de cargas positivas do tensoativo catiônico (CPC), permitindo a redução do tamanho da partícula do candidato à fármaco Lapdesf GL-FT 5 e a manutenção da estabilidade.

O delineamento estatístico empregando método de superfície de resposta permitiu avaliar os parâmetros que influenciam a redução do DHM das partículas de Lapdesf GL-FT 5, como a concentração CPC; e a sua interação com a concentração de poloxamer 407, e velocidade de agitação empregada no processo. O modelo matemático gerado permitiu a otimização da preparação de nanocristais de Lapdesf GL-FT 5 com CPC.

Considerando o modelo estatístico, propõe-se que a formulação otimizada de nanocristais de Lapdesf GL-FT 5 compreende: 1,0% (m/m) de Lapdesf GL-FT 5, 0,092% (m/m) de CPC, preparada com velocidade de agitação

de 800 rpm. Os nanocristais de Lapdesf GL-FT 5 apresentam potencial para o desenvolvimento de preparações oftálmicas inovadoras para o tratamento de EMD.

7. Acknowledgement

O presente estudo refere-se ao desenvolvimento de projeto de Iniciação Científica. O projeto foi realizado entre 08/2018 e 03/2020 sob orientação da Prof^a. Dr^a Nádia Araci Bou Chacra, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Esse estudo também foi apoiado pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Informo que fui contemplada com bolsa auxílio fornecida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP, número do subsídio: 2018/24529-4) entre 03/2019 e 03/2020, com a submissão e aprovação de dois Relatórios Científicos durante o período.

8. Referências

BAKER, Carl W. et al. Effect of Initial Management With Aflibercept vs Laser Photocoagulation vs Observation on Vision Loss Among Patients With Diabetic Macular Edema Involving the Center of the Macula and Good Visual Acuity. *Jama*, [S.L.], v. 321, n. 19, p. 1880, 21 maio 2019. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2019.5790>.

BHAGAT, Neelakshi et al. Diabetic Macular Edema: pathogenesis and treatment. *Survey Of Ophthalmology*, [S.L.], v. 54, n. 1, p. 1-32, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.survophthal.2008.10.001>.

CALLEGARI-JACQUES, Sidia M.. Bioestatística: Princípios e aplicações. São Paulo: Artmed, 2007. 251

CHAUDHARI, Smruti P. et al. Application of surfactants in solid dispersion technology for improving solubility of poorly water soluble drugs. *Journal Of Drug Delivery Science And Technology*, [S.L.], v. 41, p. 68-77, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2017.06.010>.

CHO, Nam H. et al. IDF Diabetes Atlas. 9. ed. Bruxelas: International Diabetes Federation,, 2019. 160 p. Disponível em: <https://www.diabetesatlas.org>. Acesso em: 23 mar. 2021.

CHOLKAR, Kishore et al. Eye: anatomy, physiology and barriers to drug delivery. Ocular Transporters And Receptors, [S.L.], p. 1-36, 2013. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1533/9781908818317.1>.

DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. Pharmaceutics, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 57, 18 maio 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.

Diabetic Retinopathy Network Clinical Research et al. Three-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Focal/Grid Photocoagulation and Intravitreal Triamcinolone for Diabetic Macular Edema. Archives Of Ophthalmology, [S.L.], v. 127, n. 3, p. 245, 9 mar. 2009. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/archophthalmol.2008.610>.

DIBAS, Adnan et al. Glucocorticoid therapy and ocular hypertension. European Journal Of Pharmacology, [S.L.], v. 787, p. 57-71, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.06.018>.

FDA, Food And Drug Administration. U.s. Department Of Health And Human Services. Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials Guidance for Industry. 2017. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/109910/download>. Acesso em: 23 mar. 2021.

FDA (org.). Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products. 2021. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm?event=browsebyletter.page&letter=c>. Acesso em: 11 abr. 2021.

FLAXEL, Christine; BEARDSLEY; MESSENGER. Fluocinolone acetonide intravitreal implant for the treatment of diabetic macular edema. Drug Design, Development And Therapy, [S.L.], p. 425, maio 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s44427>.

GARASZCZUK, Izabela K. et al. Evaluating tear clearance rate with optical coherence tomography. Contact Lens And Anterior Eye, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 54-59, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clae.2017.08.004>.

GUNDOGAN, Fatih Cakir et al. DIABETIC MACULAR EDEMA: A SHORT REVIEW. Pakistan Journal Of Medical Sciences, [s.l.], v. 32, n. 2, p.1-6, 31 dez. 2016. Pakistan Journal of Medical Sciences. <http://dx.doi.org/10.12669/pjms.322.8496>.

JANAGAM, Dileep R. et al. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. *Advanced Drug Delivery Reviews*, [S.L.], v. 122, p. 31-64, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2017.04.001>.

JONAS, J. B., Degenring, R., Vossmerbauemer, U., & Kamppeiter, B. (2005). Frequency of Cataract Surgery after Intravitreal Injection of High-Dosage Triamcinolone Acetonide. *European Journal of Ophthalmology*, 15(4), 462–464. doi:10.1177/112067210501500407

JUNG, Jae Hun et al. Proteomic analysis of human lacrimal and tear fluid in dry eye disease. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-11, 17 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-13817-y>.

KAKIZAKI, Hirohiko; ALI, Mohammad Javed. Anatomy, Physiology, and Immunology of the Lacrimal System. *Principles And Practice Of Lacrimal Surgery*, [S.L.], p. 19-39, 25 out. 2017. Springer Singapore. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-5442-6_3.

KLAASSEN, Ingeborg et al. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Progress In Retinal And Eye Research*, [S.L.], v. 34, p. 19-48, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.02.001>.

LEE, Jong Soo et al. The Toxicity of Nonsteroidal Anti-inflammatory Eye Drops against Human Corneal Epithelial Cells in Vitro. *Journal Of Korean Medical Science*, [S.L.], v. 30, n. 12, p. 1856, 2015. Korean Academy of Medical Sciences. <http://dx.doi.org/10.3346/jkms.2015.30.12.1856>

KECK, C. M; MÜLLER, RH. Drug nanocrystal of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 62, n. 1, p.3-16, jan. 2006.

KUBO, Yoshiyuki et al. Influx Transport of Cationic Drug at the Blood–Retinal Barrier: impact on the retinal delivery of neuroprotectants. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, [S.L.], v. 40, n. 8, p. 1139-1145, 2017. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b17-00090>.

MACHADO, Marcella Gabrielle Mendes et al. Synthesis and anti-inflammatory intestinal activity of new glucocorticoid derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 206-216, 22 nov. 2019. Springer

Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-019-02474-7>.

MAZZOLI, Vienna et al. Characterization of Retinal Microvascular Complications and the Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Mouse Models of Diabetic Atherosclerosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, [S.L.], v. 61, n. 10, p. 49, 27 ago. 2020. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.61.10.49>.

MÖSCHWITZER, Jan P. et al. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. *International Journal Of Pharmaceutics*, [S.L.], v. 453, n. 1, p. 142-156, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.09.034>.

NOYES, Arthur A.; WHITNEY, Willis R.. THE RATE OF SOLUTION OF SOLID SUBSTANCES IN THEIR OWN SOLUTIONS. *Journal Of The American Chemical Society*, [s.l.], v. 19, n. 12, p.930-934, dez. 1897. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja02086a003>.

NECELA, B. M.. Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Action in Noninflammatory and Inflammatory Cells. *Proceedings Of The American Thoracic Society*, [S.L.], v. 1, n. 3, p. 239-246, 1 nov. 2004. American Thoracic Society. <http://dx.doi.org/10.1513/pats.200402-005ms>.

PALLANT, J. (2011). SPSS: Survival manual(4^aed.). Crows Nest: Allen & Unwin.

PETERS, Maria Christina Camasmie et al. Advances in ophthalmic preparation: the role of drug nanocrystals and lipid-based nanosystems. *Journal Of Drug Targeting*, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 259-270, 12 set. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/1061186x.2019.1663858>.

PETERS, M.C.C. et al. The glucocorticoid derivative with the phthalimide group cationic nanocrystal for ophthalmic application: a design space development approach. *Materials Today Chemistry*, [S.L.], v. 19, p. 100396, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mtchem.2020.100396>.

ROMERO, Gregori B.; KECK, Cornelia M.; MÜLLER, Rainer H.. Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production. *International Journal Of Pharmaceutics*, [s.l.], v. 501, n. 1-2, p.236-244, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.047>.

SHARMA, U. et al. Recent Advances in the Chemistry of Phthalimide Analogues and their Therapeutic Potential. Mini-Reviews In Medicinal Chemistry, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 678-704, 1 jul. 2010. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/138955710791572442>.

SHARMA, Om Prakash; PATEL, Viral; MEHTA, Tejal. Nanocrystal for ocular drug delivery: hope or hype. Drug Delivery and Translational Research, [s.l.], p.1-15, 10 maio 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13346-016-0292-0>.

SHEGOKAR, Ranjita; MÜLLER, Rainer H.. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. International Journal Of Pharmaceutics, [s.l.], v. 399, n. 1-2, p.129-139, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.07.044>.

SOBOTTA, Johannes. Atlas da Anatomia Humana: Volume 1- Cabeça, pescoço e extremidade superior. 21. ed. Munique: Guanabara Koogan, 2010. 417 p. Editado por R. Putz e R. Pabst com a colaboração de Renate Putz.

SUN, Bo et al. Nanocrystals for the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. Current Opinion In Solid State And Materials Science, [s. l.], v. 6, n. 16, p. 295-301, dez. 2012.

THOMAS, R.L. et al. IDF Diabetes Atlas: a review of studies utilising retinal photography on the global prevalence of diabetes related retinopathy between 2015 and 2018. Diabetes Research And Clinical Practice, [S.L.], v. 157, p. 107840, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107840>

VAN EERDENBRUGH, Bernard et al. A screening study of surface stabilization during the production of drug nanocrystals. Journal Of Pharmaceutical Sciences, [S.L.], v. 98, n. 6, p. 2091-2103, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.21563>.

XU, Qingguo et al. Nanoparticle diffusion in, and microrheology of, the bovine vitreous ex vivo. Journal Of Controlled Release, [S.L.], v. 167, n. 1, p. 76-84, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.01.018>.



Isabela Fernandes de Oliveira

03 de maio de 2022



Profª. Drª Nádia Araci Bou Chacra

03 de maio de 2022