

**Administração Intranasal de Segesterona para
Neuroproteção
Caracterização, Estabilidade, Libertação e Segurança
In Vitro de Formulações**

Samille Ferreira da Silva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biociências
(2^o ciclo de estudos)

Orientadora: Prof.^a Doutora Adriana Oliveira dos Santos
Co-orientadora: Prof.^a Doutora Carina Sofia Gonçalves Peres

Outubro de 2023

Declaração de Integridade

Eu, Samille Ferreira da Silva, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M11142 de/o Mestrado em Biotecnologia da Faculdade Ciências declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 09 /10 /23

Samille Ferreira da Silva

(assinatura conforme Cartão de Cidadão ou preferencialmente assinatura digital no documento original se naquele mesmo formato)

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Adriana Oliveira dos Santos, pelas ideias, pelo apoio, ajuda e motivação ao longo deste projeto.

À minha co-orientadora, Doutora Carina Peres, pelas horas passadas no laboratório, pela disponibilidade, paciência e esforço para que este trabalho conseguisse sempre avançar.

Ao Anderson, que se manteve a meu lado contra todas as adversidades e por acreditar mais do que eu. Agradeço-lhe o amor, a paciência, a compreensão, tranquilidade e a força que sempre me transmitiu.

Por fim, agradeço ao meu pai e à minha mãe por tudo o que fizeram e fazem por mim.

Este trabalho de investigação foi realizado no Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS-UBI), na Universidade da Beira Interior e foi apoiado por fundos nacionais provenientes da base de financiamento (referência UIDB/00709/2020) e financiamento programático através do CICS-UBI (referência UIDP/00709/2020). Inseriu-se ainda no projeto SAIN - Nanoemulsão Inovadora de Acetato de Segesterona (CENTRO-01-0145-FEDER-181231) que foi cofinanciado pelo Programa Operacional CENTRO 2020 e pela União Europeia através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional.

Resumo

O acidente vascular cerebral isquêmico é uma das principais causas de morte e a principal causa de incapacidade a longo prazo em todo o mundo. Em razão do número reduzido de opções terapêuticas e das suas limitações, há necessidade de encontrar formas alternativas de prevenir e tratar casos de acidente vascular cerebral isquêmico.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar e avaliar a estabilidade física e química, a liberação do fármaco, e a segurança de formulações de acetato de segesterona (AS) previamente desenvolvidas, uma microemulsão (ME) e três nanoemulsões O/A, uma neutra (NEn), uma aniônica e viscosa (NEa) e uma catiônica (NEc), diluídas para se atingir uma concentração alvo de AS de cerca de 0,48 mg/mL.

Foi desenvolvido e validado um ensaio de cromatografia líquida acoplado a detecção UV para a quantificação de acetato de segesterona. Testes de estabilidade física e química de longo prazo foram conduzidos a três temperaturas de armazenamento diferentes (4 °C, 25 °C e 40 °C) em dois lotes independentes. Perfis de liberação do AS *in vitro* foram caracterizados usando Câmaras de Ussing horizontal. Adicionalmente, a segurança das formulações foi testada usando um modelo comercial tridimensional de tecido nasal humano cultivado *in vitro* (MucilAir™, Epithelix). Foi feita avaliação da resistência transepitelial (TEER, do Inglês *transepithelial electrical resistance*), da liberação de Lactato Desidrogenase (LDH) para o meio basal e o ensaio de redução da resazurina.

A respeito da estabilidade física, na ME houve aumento de tamanho médio e PDI ao longo do tempo a todas as temperaturas, embora mais acentuado a 40 °C. Foi ainda possível verificar a ocorrência de precipitação do fármaco, principalmente a 4 °C, mas isto poderia ser prevenido reduzindo a concentração inicial do fármaco. Ainda assim, a 4 °C e 25 °C o tamanho médio de gotícula manteve-se < 100 nm e os valores de PDI < 0,3, que podem ser considerados valores aceitáveis. Quanto à NEa, esta foi apenas estável do ponto de vista de tamanho médio (< 200 nm) e PDI (< 0,2) apenas a 4 °C. A sua viscosidade manteve-se estável a 4 °C e 25 °C. A NEc manteve um tamanho médio próximo de 100 nm e PDI < 0,2 às 3 temperaturas, embora o PDI até tenha sido mais baixo a temperaturas ≥ 25 °C. A NEn mostrou um tamanho médio dependente da temperatura, sendo significativamente mais baixo a 4 °C. O PDI não teve grandes variações a não ser a 40 °C, mas mantendo-se inferior a 0,2.

Quanto à estabilidade química, esta foi influenciada pela precipitação observada na ME, que foi responsável pela redução do nível de fármaco quantificado na ME ao longo do tempo. Houve também uma redução da concentração do fármaco na NEa. Nos primeiros lotes de NEc e de NEn, a concentração de fármaco permaneceu relativamente estável ao longo do tempo. Contudo, houve uma diminuição da concentração de AS a 40 °C na NEc no lote 2.

No que diz respeito ao perfil de libertação, foi possível constatar a rápida velocidade de libertação inicial, a partir das nanoemulsões neutras e catiónicas, semelhante ou ainda superior à velocidade conseguida com o controlo positivo, e a redução da velocidade de libertação a partir das formulações aniónicas, mais viscosas. As ME originaram resultados semelhantes aos obtidos com o controlo negativo. Contudo, nenhuma levou a uma libertação completa nas 6 h do estudo.

Quanto à segurança *in vitro*, A ME foi segura à concentração usada e a NEn mais diluída (0,135 mg/mL AS) não levou a uma alteração significativa do TEER nem libertação de LDH, mas afetou inibiu parcialmente a redução da resazurina. As NEa, NEc e NEn impactaram o TEER e a redução da resazurina, mas a mucosa pareceu recuperar. A NEc pareceu mais tóxica, com diminuição mais acentuada do TEER e da metabolização de resazurina.

Concluindo, as formulações mais estáveis foram as nanoemulsões neutras e catiónicas, a 4 °C e 25 °C, respetivamente. O perfil de libertação do fármaco a partir destas formulações é também mais rápido embora, não tenha sido completo. Em relação à segurança das formulações, as ME são mais seguras, o que era esperado. No entanto, todas as formulações foram mais seguras que os controlos positivos usados e permitiram a recuperação do TEER para valores normais. Em suma, tanto a ME como a NEn são bom candidatos para avançar para estudo *in vivo* de administração intranasal de AS, e podem vir a ser uma boa estratégia para explorar as propriedades neuroprotetoras do acetato de segesterona no acidente vascular cerebral isquémico.

Palavras-chave

Acetato de Segesterona; Acidente Vascular Cerebral; Microemulsões; Nanoemulsões; Administração Intranasal

Abstract

Ischemic stroke is a leading cause of death and the leading cause of long-term disability worldwide. Due to the limited number of therapeutic options and their limitations, there is a need to find alternative ways to prevent and treat ischemic stroke.

The objective of this work was to characterize and evaluate the physical and chemical stability, drug release, and safety of previously developed segesteron acetate (SA) formulations, a microemulsion (ME) and three O/W nanoemulsions, one neutral (nNE), one anionic and viscous (aNE) and one cationic (cNE), diluted to reach a target AS concentration of around 0.48 mg/mL.

A liquid chromatography assay coupled to UV detection was developed and validated for the quantification of segesteron acetate (SA). Long-term physical and chemical stability tests were conducted at three different storage temperatures (4 °C, 25 °C and 40 °C) in two independent batches. *In vitro* SA release profiles were characterized using horizontal Ussing Chambers. Additionally, the safety of the formulations was tested using a commercial three-dimensional model of human nasal tissue cultured *in vitro* (MucilAir™, Epithelix). The transepithelial electrical resistance (TEER), the release of Lactate Dehydrogenase (LDH) into the basal medium and the resazurin reduction assay were assessed.

Regarding physical stability, in the ME there was an increase in the average size and PDI over time at all temperatures, although more pronounced at 40 °C. It was also possible to verify the occurrence of drug precipitation, mainly at 4 °C, but this could be prevented by reducing the initial drug concentration. Still, at 4 °C and 25 °C the average droplet size remained < 100 nm and the PDI values < 0,3, which can be considered acceptable values. As for the aNE, it was only stable in terms of medium size (< 200 nm) and PDI (< 0,2) only at 4 °C. Its viscosity remained stable at 4 °C and 25 °C. The cNE maintained an average size close to 100 nm and PDI < 0,2 at the 3 temperatures, although the PDI was even lower at temperatures \geq 25 °C. nNE showed a temperature-dependent average size, being significantly lower at 4 °C. The PDI did not have major variations except at 40 °C, but remained below 0,2.

Chemical stability was influenced by the precipitation observed in the ME, which was responsible for the reduction in the level of the drug quantified in the ME over time. There was also a reduction in the concentration of the drug in aNE. In the first batches of cNE and

NEn, the drug concentration remained relatively stable over time. However, there was a decrease in the concentration of SA at 40 °C in the cNE in batch 2.

With regard to the release profile, it was possible to verify the rapid initial release rate, from the neutral and cationic nanoemulsions, similar to or higher than the speed achieved with the positive control, and the reduction in the release rate from the anionic formulations, more viscous. The ME produced results similar to those obtained with the negative control. However, none led to complete release within the 6 h study.

Regarding in vitro safety, the ME was safe at the concentration used and the more diluted NEn (0.135 mg/mL SA) did not lead to a significant change in TEER or LDH release, but partially inhibited the reduction of resazurin. The aNE, cNE and nNE impacted TEER and resazurin reduction, but the mucosa appeared to recover. The cNE appeared more toxic, with a more pronounced decrease in TEER and resazurin metabolism.

In conclusion, the most stable formulations were neutral and cationic nanoemulsions, at 4 °C and 25 °C, respectively. The drug release profile from these formulations is also faster, although not complete. Regarding the safety of the formulations, the ME is safer, which was expected. However, all formulations were safer than the positive controls used and allowed TEER recovery to normal values. In summary, both ME and SEN are good candidates to advance to in vivo study of intranasal administration of AS, and may prove to be a good strategy to explore the neuroprotective properties of segesterone acetate in ischemic stroke.

Keywords

Intranasal Administration; Microemulsions; Nanoemulsions; Segesterone Acetate; Stroke

Índice

Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Acrónimos	xvii
Introdução	1
1.1 Acidente Vascular Cerebral	2
1.3 Entrega Intranasal.....	5
1.4 Emulsões	8
1.4.1 Microemulsões	8
1.4.2 Nanoemulsões	10
Objetivos.....	13
Materiais e Métodos	15
3.1 Materiais e Reagentes.....	15
3.2 Preparação das Formulações.....	15
3.2.1 Microemulsões	15
3.2.2 Nanoemulsões	16
3.3 Caracterização da Formulações.....	17
3.3.1 Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta.....	17
3.3.2 Caracterização Reológica.....	17
3.4 Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	18
3.4.1 Aparelho e Condições Cromatográficas	18
3.4.2 Soluções Stock, Padrões de Calibração e Controlos de Qualidade.....	18
3.4.3 Validação	19
3.5 Estudos de Estabilidade Física e Química.....	19
3.6 Ensaio de Libertação <i>In Vitro</i>	20
3.7 Ensaio de Segurança <i>In vitro</i>	20
3.7.1 Receção e Cultura do Modelo do Mucilar™.....	21
3.7.2 Medição TEER.....	21
3.7.3 Ensaio de Citotoxicidade do Mucilar™.....	22
3.7.4 Análise da redução de resazurina.....	22
3.7.5 Ensaio de LDH.....	23
3.8 Análises Estatísticas	23

Resultados e Discussão	25
4.1 Validação do método HPLC	25
4.2 Estabilidade Física	26
4.3 Estabilidade Química	31
4.4 Ensaio de Libertação	35
4.5 Ensaios de Segurança <i>In Vitro</i>	36
Conclusão	39
Referências	40
Anexos	46

Lista de Figuras

- Figura 1. Estrutura molecular do acetato de segesterona 5
- Figura 2. Aspectos visuais da ME e NE. Límpida e homogénea (a), opaca, homogénea e acastanhada (b), translúcida, homogénea e acastanhada c) e d), cristais precipitados de AS na ME (e), formação de creme na NEn (f). 26
- Figura 3. Caracterização do tamanho hidrodinâmico médio da gota (Z-Av.), índice de polidispersão (PDI) e Potencial Zeta (PZ) da microemulsão (ME), nanoemulsão aniónica (NEa), nanoemulsão catiónica (NEc) e nanoemulsão neutra (NEn) ao longo do tempo. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão a três temperaturas de armazenamento (4 °C, 25 °C e 40 °C)..... 28
- Figura 4. Caracterização do tamanho hidrodinâmico médio da gota (Z-Av.), índice de polidispersão (PDI) e Potencial Zeta (PZ) da microemulsão (ME), nanoemulsão aniónica (NEa), nanoemulsão catiónica (NEc) e nanoemulsão neutra (NEn) ao longo do tempo. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão a três temperaturas de armazenamento (4 °C, 25 °C e 40 °C)..... 29
- Figura 5. Caracterização da viscosidade da nanoemulsão aniónica (NEa) ao longo do tempo. A. 1º lote; B. 2º lote. As medições foram realizadas a 25 °C, independentemente da temperatura de armazenamento ser 4 °C, 25 °C ou 40 °C, em diferentes pontos de tempo (0, 15, 30, 90 e 180 (A) dias e 0, 15, 30, 90 e 150 (B) dias).31
- Figura 6. Concentração de AS ao longo do tempo usando as quatro formulações diferentes (ME, NEa, NEc e NEn). Os dados correspondem à média \pm desvio padrão. Três temperaturas de armazenamento foram testadas (4 °C, 25 °C e 40 °C) em diferentes pontos de tempo (0, 1, 7, 15, 30, 90 e 180 dias)..... 32
- Figura 7. Concentração de AS ao longo do tempo usando as quatro formulações diferentes (ME, NEa, NEc e NEn). Os dados correspondem à média \pm desvio padrão. Três temperaturas de armazenamento foram testadas (4 °C, 25 °C e 40 °C) em diferentes pontos de tempo (0, 1, 7, 15, 30, 90 e 150 dias)..... 33
- Figura 8. Perfil de libertação percentual de acetato de segesterona. As amostras foram tomadas entre 15 e 360 minutos. Quatro formulações diferentes (NEa/Carb.0.05%,

NEa/Carb.0.1%, NEc e NEn) foram testadas, bem como uma solução de acetato de segesterona preparadas em Transcutol® HP..... 35

Figura 9. Resultados de segurança in vitro no modelo de mucosa nasal humana MucilAir™. A - Resistência transepitelial (TEER) medida a diferentes tempos, 3 dias antes do ensaio, 30 minutos, 24 h, 4 dias e 8 dias após aplicação das formulações. B - Resultados do ensaio da libertação de Lactato Desidrogenase (LDH) após a aplicação das formulações, expressos em percentagem do controlo positivo com Triton X100 1%. C – Viabilidade celular por redução da rezasurina obtida imediatamente após o tratamento. Cl. de Benz., Cloreto de benzalcónio; Triton X100 1%; NEn (0,34mg/mL AS), NEn dil. 4X (0,135 mg/mL AS), NEa (0,44 mg/mL AS), NEc (0,43 mg/mL AS), ME s/ AS e ME (0,44 mg/mL AS). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. controlo negativo (solução salina).....37

Lista de Tabelas

Tabela 1. Percentagens de excipientes usados para preparar as NE concentradas (concentrado com AS).	16
Tabela 2. Percentagens de excipientes usados para preparar as NE propriamente ditas....	17
Tabela 3. Valores de precisão intra e interdia (% CV) e exatidão (% viés) obtidos para amostras de controlo de qualidade (QC, do Inglês Quality Control) no limite inferior de quantificação (QC LLOQ, do Inglês Quality Control Lower Limit Of Quantification), e no limite baixo (QC1), médio (QC2) e níveis altos de concentração (QC3) representativos das faixas de calibração.....	25
Tabela 4. Caracterização do aspeto visual das formulações armazenadas em diferentes condições de temperatura (4 °C, 25 °C e 40 °C) no início (t=0) e no final (lote 1 180 dias, lote 2 150 dias) do ensaio, dias de separação de fases e dia de precipitação do acetato de segesterona.	27
Tabela 5. Variação da concentração do acetato de segesterona (AS) nas formulações armazenadas em diferentes condições de temperatura (4 °C, 25 °C e 40 °C) no início (t=0) e no final (lote 1 t=180 dias, lote 2 t=150 dias) do ensaio. As concentrações são apresentadas como média ± coeficiente de variação (CV). Os valores de CV e variação maiores (superiores a 9%) encontram-se realçados a negrito.	34

Lista de Acrónimos

ANOVA	Análise de Variância, do inglês Analysis of Variance
AHA	Associação Americana de Coração, do Inglês American Heart Association
AIT	Ataque Isquémico Transitório
AS	Acetato de Segesterona
ASA	Associação Americana de AVC, do inglês American Stroke Association
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BHE	Barreira Hematoencefálica
DALY	Anos ajustados á incapacidade, do inglês Disability-adjusted life years
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-lipófilo
EVOM	Do inglês, Epithelial Volt/Ohm Meter
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos, do inglês Food and Drug Administration
GBD	Do inglês <i>Global Burden of Diseases</i>
HIC	Hemorragia Intracerebral
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance, do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HSA	Hemorragia Subaracnóidea
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1, do inglês Insulin-like Growth Factor-1
KRB	Do inglês Krebs-Ringer buffer
LDH	Lactato desidrogenase, do inglês Lactate Dehydrogenase
LLOQ	Limite Inferior de Quantificação, do inglês Lower Limit of Quantification
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês Limit of Quantification
ME	Microemulsão
NE	Nanoemulsão
NEa	Nanoemulsão aniónica
NEc	Nanoemulsão catiónica
NEn	Nanoemulsão neutra
PDI	Índice de Polidispersão, do inglês Polydispersity Index
PIC	Pressão intracraniana
PR	Recetor de Progesterona, do inglês Progesterone Receptor
rNPC	Células Progenitoras Neurais de Rato, do inglês Rat Neural Progenitor Cells
RPM	Rotação Por Minuto, do inglês Rotation Per Minute
SNC	Sistema Nervoso Central
TEER	Resistência Elétrica Transepitelial, do inglês Transepithelial Electrical Resistance
tPA	Ativador de Plasminogénio Tecidual, do inglês Tissue Plasminogen Activator
UE	União Europeia
WHO	Organização Mundial de Saúde, do inglês World Health Organization
Z-Ave	Diâmetro hidrodinâmico médio, do inglês Zeta Average

Capítulo 1

Introdução

O Acidente Vascular cerebral (AVC) é classificado como uma doença cerebrovascular causada por uma obstrução do fluxo sanguíneo cerebral. Este evento altera a perfusão sanguínea normal para uma determinada parte do cérebro, levando a alterações metabólicas e celulares que, se mantidas por tempo suficiente, podem resultar em morte celular [1].

O AVC foi descrito pela Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês World Health Organization) em 1970 como uma síndrome com “sinais clínicos de desenvolvimento rápido de distúrbio focal (ou global) da função cerebral, com duração superior a 24 horas ou levando à morte, sem causa aparente que não seja de origem vascular”. Nos últimos anos, a Associação Americana do Coração (AHA, do inglês American Heart Association) e a Associação Americana de AVC (ASA, do inglês American Stroke Association) consideraram esta definição desatualizada, porque se concentra principalmente nos sintomas clínicos e não reflete avanços significativos. Como resultado, em 2013, a AHA e a ASA reviram a definição de AVC para incluir enfartes silenciosos (cerebrais, espinais e retinais) e hemorragias silenciosas [2].

O AVC isquêmico é o tipo mais comum de AVC e geralmente é causado por um bloqueio da artéria devido a coágulos sanguíneos, resultando em suprimento sanguíneo prejudicado para uma determinada parte do cérebro. Os AVC isquêmicos são causados por eventos trombóticos ou embólicos que levam à redução do suprimento de sangue e oxigênio ao cérebro [3]. A terapia farmacológica atual utilizada em pacientes diagnosticados logo após o início do evento isquêmico é um medicamento trombolítico que atua como ativador do plasminogênio tecidual (tPA, do inglês Tissue Plasminogen Activator), quebrando os coágulos e restabelecendo o fluxo sanguíneo normal. Além de outros riscos, a principal desvantagem desta abordagem terapêutica é a sua curta janela de administração de apenas 4,5 horas após o início do evento de AVC isquêmico. Devido às limitações do tPA e a ausência de alternativas, é necessário explorar e pesquisar novos tratamentos para AVC isquêmico [4]. O acetato de segesterona (AS) surge como uma possível estratégia alternativa de tratamento, uma vez que já foi descrito o seu efeito neuroprotetor e melhoria na recuperação em eventos de AVC isquêmico agudo [5]. Contudo, a sua baixa biodisponibilidade oral e baixa solubilidade aquosa limitam a sua utilização, e tornam importante a investigação de formas alternativas de formulação e administração. De facto, o presente trabalho inseriu-se num projeto que teve como objetivo investigar um sistema

viável de administração intranasal de AS direcionado ao cérebro. Desta forma, pretendeu-se reunir as propriedades benéficas do AS e as múltiplas vantagens dos sistemas de administração intranasal, utilizando micro e nanoemulsões como veículos de administração.

1.1 Acidente Vascular Cerebral

Devido ao envelhecimento da população, espera-se que o número absoluto de AVC aumente dramaticamente nos próximos anos na Europa. Além do prognóstico vital, os pacientes com AVC também correm um risco aumentado de sequelas no primeiro ano do evento, incluindo reinternamento, recorrência do evento, demência e distúrbio cognitivo leve. Isto representa um problema grave, sobretudo onde o rácio de idosos na população tem vindo a aumentar, causando elevados custos de hospitalização e reabilitação, bem como pressão nos cuidados de saúde públicos. Sabe-se que em países mais desenvolvidos, cerca de um terço de todos os AVC ocorrem nessa faixa etária [6].

As estimativas mais recentes da Global Burden of Diseases (GBD) em 2019 mostram que o AVC continua a ser a segunda principal causa de morte (6,6 milhões de pessoas) e a terceira principal causa de incapacidade (143 milhões de anos de vida ajustados à incapacidade (DALY, do inglês Disability-adjusted life years) em todo o mundo [7]. De 1990 a 2019, em termos absolutos, a incidência global de AVC aumentou em 70%, a prevalência aumentou em 85%, a mortalidade aumentou em 43% e os DALY devido ao AVC aumentaram em 32%. Houve grandes diferenças geográficas nas taxas de incidência de AVC padronizadas por idade, mortalidade, prevalência e DALY, com as taxas mais altas na Europa Oriental, Ásia e África Subsariana [7]. Na União Europeia, o AVC afeta aproximadamente 1,1 milhões de habitantes todos os anos e causa cerca de 440 mil mortes. À medida que as populações continuam a envelhecer, espera-se que os eventos de AVC e suas consequências a longo prazo, e os custos equivalentes, aumentem consideravelmente [8].

O AVC pode ser classificado como hemorrágico quando há rutura de um vaso sanguíneo que resulta em sangramento; isquémico, quando há uma obstrução causando falta de oxigênio e fornecimento de energia ao cérebro, ou ataque isquémico transitório (AIT) [1,9].

O AVC hemorrágico compreende 15% de todos os AVC e está relacionado com altas taxas de morbidade e mortalidade [1,9,10,11]. O AVC hemorrágico pode ser subdividido em hemorragia intracerebral (HIC) e hemorragia subaracnóidea (HSA). A lesão primária deve-se à compressão do tecido cerebral pelo hematoma e aumento da pressão intracraniana (PIC). A lesão secundária é causada por inflamação, rutura da barreira hematoencefálica

(BHE), edema, superprodução de radicais livres, como espécies reativas de oxigênio e libertação de hemoglobina e ferro do coágulo. O diagnóstico e o tratamento precoces são essenciais devido à rápida expansão da hemorragia, causando perda súbita da consciência e disfunção neurológica.

O AVC isquêmico é a principal causa de AVC, representando cerca de 85% de todos os eventos de AVC [1,9,11]. A oclusão isquêmica gera condições trombóticas e embólicas no cérebro. Na trombose, o fluxo sanguíneo é afetado pelo estreitamento dos vasos devido à aterosclerose. O acúmulo de placa acabará por contrair a câmara vascular e formar coágulos, causando acidente vascular cerebral trombótico. Num acidente vascular cerebral embólico, a diminuição do fluxo sanguíneo para a região do cérebro causa uma embolia; o fluxo sanguíneo para o cérebro diminui, causando *stress* severo e morte celular prematura (necrose). A necrose é caracterizada por ruptura da membrana plasmática, inchaço dos organelos e vazamento do conteúdo celular para o espaço extracelular, e perda da função neuronal. Outros eventos importantes que contribuem para a patologia do AVC são inflamação, falha de energia, perda de homeostase, acidose, aumento dos níveis intracelulares de cálcio, excitotoxicidade, toxicidade mediada por radicais livres, citotoxicidade mediada por citocinas, ativação do complemento, comprometimento da BHE, ativação de células gliais, *stress* oxidativo e infiltração de leucócitos [9,12].

As razões e os mecanismos para AIT são os mesmos indicados para as duas outras causas de AVC, mas, neste caso, a restrição do fluxo sanguíneo dura menos de 24 horas. Apesar dos sintomas durarem apenas por curtos períodos de tempo (< 1 hora), um AIT pode ser um preditor e alerta para futuros derrames mais graves [9].

As áreas ao redor da oclusão podem ser classificadas em dois tipos com base no grau de isquemia: núcleo e penumbra. O núcleo é a área submetida à isquemia total e aquela que sofre dano irreversível em minutos. A penumbra é uma região envolvendo o núcleo que não está em isquemia total, mas hipoperfundida, levando a danos que podem ser revertidos se o fluxo sanguíneo para a área for restabelecido nas primeiras horas [1,10,13].

A região da penumbra é o foco de muitos fármacos com o objetivo de reduzir/bloquear os eventos isquêmicos em cascata que resultam em morte celular [6,11]. A capacidade de diminuir a lesão cerebral produzida por eventos isquêmicos, sem atingir diretamente a reperfusão tecidual, é chamada de neuroproteção [7,13]. Ao contrário do que ocorre com o uso de agentes direcionados ao restabelecimento do fluxo sanguíneo, os agentes neuroprotetores podem ser aplicados antes, durante e após o evento isquêmico. Isso leva a um aumento da janela de administração e, conseqüentemente, a melhores resultados após o AVC isquêmico [14].

As opções de tratamento do AVC isquêmico visam principalmente a remoção do bloqueio no fluxo sanguíneo cerebral, seja por trombectomia endovascular (remoção cirúrgica do coágulo) ou por trombólise [15]. As opções terapêuticas aprovadas para fase aguda do AVC, essenciais para reduzir o grau de incapacidade e aumentar a sobrevivência, são ainda bastante reduzidas. A aplicação da terapêutica adequada nesta fase deve ser feita o mais rápido possível, uma vez que o tecido cerebral é extremamente vulnerável à interrupção da normal irrigação sanguínea, fazendo com que um número elevado de células seja destruído a cada minuto de isquemia. A nível farmacológico, é maioritariamente utilizada terapêutica fibrinolítica por via endovenosa podendo esta ser ou não associada a intervenções endovasculares, como é o caso trombectomia mecânica [14,16,17]. O ativador de plasminogénio tecidual (tPA), a única terapia medicamentosa aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) para AVC atualmente, tem sido eficaz na dissolução de coágulos e na restauração do fluxo sanguíneo para o cérebro [18]. Embora a janela de tempo de administração de até 3 tenha sido estendida para 4,5 horas após o início dos sintomas, este estreito período administrativo representa um fator significativo que limita sua ampla aplicação, uma vez que muitos pacientes não conseguem procurar atendimento neste período. Além disso, o atraso no tratamento com tPA além de 4,5 horas tem sido associado à transformação hemorrágica, entre outros efeitos colaterais prejudiciais, resultando em altas taxas de mortalidade por AVC. Esta janela terapêutica restrita e diretrizes rigorosas resultam em menos de 5% dos pacientes com AVC qualificados para tPA [19]. As limitações do tPA como opção de tratamento viável para o AVC justificam a exploração de estratégias alternativas para o tratamento do AVC.

1.2 Acetato de Segesterona

Semelhante à progesterona natural, o AS (Figura 1), uma progestina sintética, exibe efeitos proliferativos e protetores neurais comparáveis *in vitro* e *in vivo*, mas sem impacto negativo na função cerebral induzida por outros progestágenos sintéticos [20]. O AS liga-se seletivamente e com grande afinidade ao recetor de progesterona (PR, do inglês Progesterone Receptor) e contorna as atividades androgénica, estrogénica e glicocorticoide associadas a outras progestinas sintéticas. Igualmente importante, o AS também exerce neuroproteção contra uma série de doenças neurológicas caracterizadas por desmielinização, morte celular do neurónio motor e vias patológicas inflamatórias do AVC [21].

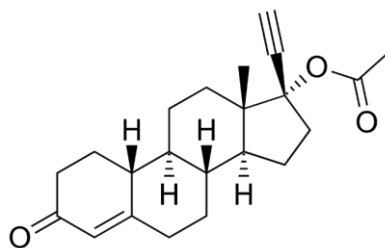


Figura 1. Estrutura molecular do acetato de segesterona

Os mecanismos subjacentes à neuroproteção do AS podem envolver processos multifacetados de reparação cerebral [21]. O AS previne o dano excitotóxico associado ao glutamato às células progenitoras neurais de rato (rNPC, do inglês rat neural progenitor cells) e aumenta a proliferação de rNPC *in vitro*. *In vivo*, o AS aumenta a proliferação celular por meio da expressão regulada positivamente de proteínas do ciclo celular [21]. O AS aumenta a neurogênese, a oligodendrogênese e a mielinização. Aumentos correspondentes no fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1, do inglês insulin-like growth factor-1) sugerem que o AS promove esses resultados regenerativos por meio da sinalização elevada de IGF-1 [21]. Além disso, o AS induz a remielinização para corrigir lesões de desmielinização crônica grave em modelos animais após desmielinização grave. Dados estes resultados e a seletividade do AS para ativação do PR, é provável que os PR mediem o processo de remielinização induzido por AS. Digno de nota, o AS também atenua a inflamação diminuindo astrogliose, microgliose e moléculas pró-inflamatórias [21]. De facto, a inibição de fatores inflamatórios após AVC isquémico reduz a morte celular secundária e, conseqüentemente, o tamanho do enfarto [22]. A alta afinidade do AS pela ligação PR e a ativação de recetores esteroideogénicos, glicocorticóides e GABA implica que apenas o PR facilita esses processos protetores e regenerativos no cérebro, semelhante a como o PR regula exclusivamente os efeitos contraceptivos e hormonais de AS. Por fim, a capacidade do AS de proteger e regenerar neurónios por meio de neurogênese, remielinização e anti-inflamação indica a sua utilidade clínica [21].

1.3 Entrega Intranasal

Conhecer a anatomia e a estrutura celular da cavidade nasal é importante para a compreensão dos vários mecanismos pelos quais os medicamentos são absorvidos através da cavidade nasal até o cérebro. A cavidade nasal estende-se por cerca de 12-14 cm de comprimento, 5 cm de altura, tem um volume total de 15-20 mL e uma área de superfície entre 150 e 200 cm² [23].

A cavidade nasal pode ser dividida em três regiões: vestibular, respiratória e a olfativa. A região vestibular é a porção frontal da cavidade nasal, altamente enriquecida com muco e pelos (células ciliadas) que restringem as partículas estranhas pela depuração mucociliar. O vestíbulo nasal está localizado na parte mais anterior da cavidade nasal e é composto por pelos, glândulas sebáceas e sudoríparas. A região respiratória é a maior área da cavidade nasal, cobrindo cerca de 130 cm² de área. É altamente vascularizado e inclui a enervação pelo nervo trigêmeo. A região olfativa é a região mais alta da cavidade nasal. Cobre cerca de 10 cm², e contém receptores olfativos, responsáveis pelo sentido do olfato [23,24]. Em termos de absorção do fármaco por administração intranasal, as mucosas respiratória e olfativa são os principais locais de interesse.

A mucosa respiratória consiste em 80-90% da área total da superfície da cavidade nasal humana e é altamente vascularizada, tornando-se num local significativo para absorção sistêmica de medicamentos. A mucosa respiratória consiste em vários tipos de células e glândulas, como células basais, células caliciformes, células epiteliais ciliadas e glândulas serosas. As células basais são células progenitoras que podem diferenciar-se em outros tipos de células encontradas no epitélio e também ajudam a fixar as células ciliadas e caliciformes à lâmina basal. As células caliciformes secretam muco composto de mucina, água, sais, um pequeno grupo de proteínas e lipídios. O muco forma uma camada no epitélio respiratório e serve como defesa de primeira linha, aprisionando quaisquer materiais inalados ou irritantes. As células ciliadas ajudam a remover esse muco em direção à nasofaringe, o que resulta na depuração mucociliar. As glândulas serosas secretam fluido aquoso e outras proteínas antimicrobianas, que servem como parte da imunidade inata. A mucosa olfativa está localizada na parte superior da cavidade nasal e ocupa cerca de 5 a 10% da área total da superfície da cavidade nasal humana [25].

A mucosa olfativa consiste em neurónios receptores olfativos, os chamados neurónios sensoriais olfativos (NSO), o epitélio olfativo e a lâmina própria. O nervo olfativo é o primeiro nervo craniano que transmite informações sensoriais relacionadas com o olfato. Os NSO são neurónios não mielinizados e localizados no epitélio nasal. Os NSO têm contato direto com substâncias transportadas pelo ar através de quimiorreceptores odoríferos localizados na superfície apical da mucosa olfativa, e cada NSO expressa apenas um recetor. Os humanos têm aproximadamente 400 receptores olfativos. Cada NSO forma feixes espessos de axónios na lâmina própria, e esses feixes tornam-se nervos olfativos. Eles inervam a placa cribriforme e criam conexões sinápticas com glomérulos de células mitrais e tufadas no bulbo olfativo. Os NSO têm contato direto com o meio ambiente, substâncias irritantes transportadas pelo ar e agentes microbianos, pelo que, esses compostos exógenos podem causar lesões ou morte celular dos NSO. O epitélio olfativo, assim como o epitélio

respiratório, consiste em células colunares ciliadas cobertas por uma camada de muco. No entanto, os cílios no epitélio olfativo não são móveis e são mais longos que os do epitélio respiratório [25].

Quando os fármacos são introduzidos na cavidade nasal pela região vestibular, as moléculas que não são retidas pelo muco e pelas células ciliadas seguem para as regiões respiratória e olfativa. A partir daqui o transporte de fármacos para o cérebro pode seguir diferentes vias: i) transporte mediado pelo nervo trigêmeo; ii) transporte mediado pelo nervo olfativo; e iii) transporte linfático e vascular. Entre estas, as vias trigeminal e olfativa são certamente os mecanismos mais conhecidos e mais estudados para o transporte de fármacos do nariz para o cérebro [26].

Quando os fármacos atingem o epitélio respiratório, alguns deles podem ser transportados através dos ramos dos nervos trigêneos, sendo internalizadas nos neurónios trigêneos periféricos por endocitose, sendo posteriormente entregues ao tronco cerebral. Como o epitélio respiratório é altamente vascularizado, com uma combinação de endotélio contínuo e fenestrado, dá acesso à circulação sanguínea. No entanto, essas substâncias precisam de atravessar a BHE para chegar ao SNC, que é a etapa limitante se a molécula permeia mal a BHE. A via sistêmica ocorre principalmente para as substâncias pequenas e lipofílicas, para que possam cruzar a BHE transcelularmente [27, 29].

Uma pequena porção do fármaco provavelmente atingirá a região olfativa mais interna, onde poderá ser transportada para o cérebro por três rotas diferentes: i) via de transporte intracelular (neuronal) após internalização dos fármacos nos neurónios; ii) transporte extracelular através dos espaços entre as células, particularmente ao longo dos canais próximos aos nervos olfativos; e iii) transporte transcelular através das células epiteliais basais [23]. Fármacos que seguem a via intraneuronal podem entrar nos neurónios sensoriais olfativos por endocitose ou pinocitose e são transportadas ao longo dos neurónios até o bulbo olfativo, onde são libertadas por exocitose e posteriormente distribuídas para as diferentes regiões do cérebro. O transporte intraneuronal de fármacos é relativamente lento. Em contraste, os fármacos transportados através da via extraneuronal requerem apenas alguns minutos para atingir o bulbo olfativo e outras regiões do cérebro. O transporte mais rápido quando comparados com outras vias indica o transporte extracelular como a via dominante que leva ao transporte direto do nariz ao cérebro [27].

A via intranasal apresenta diversas vantagens sobre outras vias. Por exemplo: não invasiva, fácil aplicação e indolor, comparado às vias parenteral e retal; rápido início de ação, superfície de absorção relativamente grande e permeável, alta absorção sistêmica do fármaco, devido à grande área superficial; possibilidade de entrega do fármaco diretamente

ao cérebro; atividade enzimática reduzida e evitação do metabolismo hepático de primeira passagem [28,29]. No entanto, apesar das suas inúmeras vantagens, a administração de fármacos nariz-cérebro pode ser limitada por uma possível baixa biodisponibilidade devido a degradações enzimáticas de fármacos sensíveis na superfície mucosa, elevada depuração mucociliar e restrições determinadas pela anatomia da cavidade nasal. Estes problemas devem ser corretamente abordados na concepção de formulações adequadas. Para superar esses problemas, tem sido sugerido o uso de agentes mucoadesivos e intensificadores de permeação prolongando o tempo de residência da formulação na cavidade nasal. Além disso, lesões da cavidade nasal e a congestão nasal também podem contribuir para diminuir a absorção nasal do fármaco [29, 30].

1.4 Emulsões

1.4.1 Microemulsões

As microemulsões (ME) foram descritas na literatura pela primeira vez por Hoar e Schulman, em 1943, ao descreverem sistemas transparentes formados espontaneamente quando óleo e água eram misturados com quantidades relativamente grandes de tensoativo iônico misturado a um álcool (n-hexanol) de cadeia média para obter uma solução límpida e monofásica. Entretanto, o termo ME foi utilizado somente no final da década de 1950 por Schulman e colaboradores [31,32]. ME podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, transparentes de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme de compostos de tensoativo e, se necessário, co-surfactantes, localizados na interface óleo/água [33,34]. A ME é um sistema de entrega que consiste num sistema disperso envolvendo tensoativo, co-tensoativo, fase oleosa e uma fase aquosa nas proporções necessárias, sendo cuidadosamente selecionados e misturados [35,36]. As ME possuem propriedades significativamente diferentes (tipo, tamanho, formação e estabilidade) em relação às nanoemulsões (NE) e macroemulsões [33]. As ME podem ser classificadas com base na sua estrutura que pode ser: i) tipo I - corresponde a um estado bifásico para uma microemulsão em equilíbrio com uma fase orgânica; ii) tipo II- corresponde a um estado bifásico para uma ME em equilíbrio com uma fase aquosa; iii) tipo III- corresponde a um sistema trifásico com uma fase ME intermediária em equilíbrio com uma fase superior oleosa e uma fase inferior aquosa e, iv) tipo IV- corresponde a um sistema monofásico, em escala macroscópica, constituído por uma fase única. Numa ME A/O, as gotas de água estão dispersas em uma fase oleosa, enquanto numa ME O/A, as gotas de óleo estão dispersas numa fase aquosa contínua. As ME bicontínuas possuem uma estrutura complexa e interconectada, na qual as fases oleosa e aquosa são

contínuas e dispersas por todo o sistema. As ME A/O são normalmente usadas para administrar fármacos hidrofílicos, enquanto as ME O/A são preferidas para moléculas lipofílicas. As ME bicontínuas demonstraram ser eficazes para a entrega de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos [34]. Especificamente, os tamanhos das gotículas de ME variam de 10 a 100 nm de diâmetro [33,37]. Ao contrário da sua terminologia, as ME consistem nos menores tamanhos de gotículas encontrados em sistemas de emulsão, em comparação com macroemulsões e NE. Dado o perfil de energia reversa das ME em comparação com nanoemulsões e macroemulsões, as ME são termodinamicamente estáveis. Num sistema de ME, os componentes estão num estado energético mais alto do que o produto final da ME. Assim, é necessária energia para a dissociação da ME nos componentes originais. A formação de ME é, portanto, um processo direcionado para frente e, de facto, a maioria dos sistemas de ME formam-se espontaneamente sem a entrada de energia [37,38]. A formulação é um aspeto crucial do desenvolvimento de ME para aplicações de entrega de fármacos. Uma formulação bem projetada pode garantir que o sistema de ME possua as propriedades físico-químicas desejadas, como estabilidade, tamanho e dosagem do fármaco. A escolha da composição da ME depende das propriedades físico-químicas do fármaco e da via de administração desejada. A seleção de uma fase oleosa apropriada é baseada em fatores como a solubilidade do fármaco e sua compatibilidade com o tensoativo. O tensoativo é outro componente crítico que reduz a tensão interfacial entre as fases oleosa e aquosa e estabiliza o sistema de ME. A seleção de um tensoativo depende da sua capacidade de formar uma monocamada na interface óleo-água e a sua compatibilidade com o co-tensoativo. O co-tensoativo é tipicamente um álcool de cadeia curta ou um glicol, que aumenta a capacidade de solubilização do tensoativo e ajuda a estabilizar a ME. A fase aquosa pode ser composta por água ou um tampão aquoso, dependendo do pH desejado do sistema. Além disso, a presença de co-solvente, pode melhorar a solubilidade do fármaco na ME [36]. As ME são consideradas sistemas adaptativos que podem ser preparados sem alto consumo de energia de forma económica. [39]. As vantagens das ME são sempre analisadas no início de um processo de formulação, sendo correlacionadas com os ativos que serão integrados e o produto final resultante que pode ser definido como um sistema simples na composição, mas complexo na estrutura.

A seguir, são apresentadas vantagens que caracterizam as ME como veículos ideais para uma entrega de substâncias ativas: i) estabilidade termodinâmica, induzida pela mistura tensoativo/co-tensoativo que proporciona uma baixa tensão interfacial devido a uma monocamada formada no contato das partículas de óleo com as partículas de água; ii) formação espontânea devido ao método de preparação fácil, sem consumo de energia, tornando o processo de fabricação económica, iii) incorporação de compostos hidrofílicos e lipofílicos, resolvendo as desvantagens de solubilidade para fármacos pouco solúveis, iv)

capacidade de solubilização fármaco e a biodisponibilidade superior são proporcionais à alta concentração da mistura tensioativo/co-tensioativo introduzida no sistema e, v) o fármaco selecionado na formulação em ME é protegido contra processos hidrolíticos e oxidativos [40].

1.4.2 Nanoemulsões

Nanoemulsões (NE) são dispersões coloidais de dois líquidos imiscíveis estabilizados por moléculas de tensioativos. São cineticamente mais estáveis do que macroemulsões e podem ser obtidos mesmo em baixas concentrações de tensoativos. A energia livre das fases separadas de óleo e água de uma NE é menor do que a energia livre do sistema de dispersão coloidal, criando um sistema termodinamicamente instável (os componentes devem ser misturados de forma a superar uma barreira energética para que a nanoemulsão seja formada). As NE são transparentes, translúcidas ou leitosas, dependendo do tamanho das gotículas. As NE são classificadas em dois tipos, água em óleo (O/A) e óleo em água (A/O), de acordo com a proporção e natureza química dos componentes. O tamanho de gota muito pequeno das NE (geralmente na faixa de tamanho de 20 a 200 nm) torna-as resistentes à desestabilização física, floculação e formação de creme [41,42].

Compreender os mecanismos essenciais responsáveis pela instabilidade das NE é crucial no desenvolvimento de sistemas que exibem qualidades de estabilidade adequadas [43]. Os fenômenos de instabilidade mais comuns que podem comprometer a qualidade dessas formulações são coalescência, floculação, formação de creme, maturação de Ostwald e inversão de fases [44].

A separação gravitacional ocorre por ação da força da gravidade sobre as gotículas, resultante da diferença de densidade das gotículas e da fase contínua. Se as gotículas possuem densidade maior do que a fase contínua, elas apresentam tendência de se deslocar para baixo, o que é o fenômeno conhecido como sedimentação. Se elas têm uma densidade menor que da fase contínua, tendem a deslocar-se para cima, trata-se da formação de creme [45]. A água tende a mover-se para baixo, enquanto o óleo migra para cima, pois a maioria dos óleos líquidos é menos denso que a água em estado líquido. Portanto, a sedimentação é comum em NE A/O, enquanto O/A exhibe mais casos de formação de creme [46]. Um aumento no tamanho da gota, ou contraste de densidade em conjunto com um declínio na viscosidade da fase aquosa, influenciam a velocidade de movimento das gotas induzidas pela separação gravitacional [46]. Tal fenômeno deve ser controlado, porque faz com que as gotículas permaneçam em contato durante um tempo prolongado, o que pode levar a floculação ou coalescência, e, possivelmente, formação de uma camada de óleo na parte superior da NE [45].

A floculação é o processo em que duas ou mais gotículas se associam, mas mantêm a integridade individual de cada uma. Este fenómeno acarreta um aumento da viscosidade da NE e pode conduzir à formação de um gel, e, assim sendo, pode ser benéfica ou não, dependendo da característica final que se deseja para a NE [45,47].

Por sua vez, a coalescência é o processo em que duas ou mais gotículas se fundem para formar uma gotícula maior e assim, envolve uma diminuição da área de contato entre as fases contínua e dispersa, e então, este fenómeno pode levar rapidamente à formação de creme ou sedimentação, e posteriormente à separação de fases. Este processo só ocorre quando as gotas estão próximas e a interface que as separa é rompida. Via de regra, a ocorrência da coalescência é determinada pelo mecanismo físico responsável pelo contato entre as gotículas e a atuação das forças de curto alcance, como por exemplo, o movimento browniano [45]. Já o amadurecimento de Ostwald provoca um crescimento do tamanho de partícula pelo aumento do tamanho das mesmas, o que ocorre à custa de gotículas pequenas dentro de um sistema, que encolhem e são absorvidas pelas maiores. Este fenómeno é devido à energia livre de gotículas pequenas ser maior do que a de gotículas maiores, o que faz com que as gotículas pequenas sejam absorvidas pelas maiores por competitividade de difusão, o que pode em um tempo infinito, reduzir todas as gotículas para uma única (separação de fase) [45,48]. Portanto, as NE são mais propensas a desestabilização pela maturação de Ostwald devido ao pequeno tamanho das gotículas. Porém, apresentam vantagens quando comparadas com macroemulsões e ME, pois ainda devido a este pequeno tamanho, ocorre a diminuição dos fenómenos de agregação dessas gotículas (floculação e coalescência) e da separação gravitacional, fazendo com que as mesmas sejam mais estáveis cineticamente [45, 48]. Devido aos fenómenos descritos, confirma-se que quanto menor o tamanho das gotículas, maiores os benefícios quanto à estabilidade cinética [44,47,48].

Capítulo 2

Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar e avaliar a libertação e a estabilidade física e química de formulações de acetato de segesteronona previamente desenvolvidas, uma microemulsão e 3 nanoemulsões O/A, uma neutra (NEn), uma catiónica (NEc) e uma aniónica e de maior viscosidade (NEa), diluídas à concentração alvo de AS de cerca de 0,48 mg/mL. O objetivo secundário do trabalho foi avaliar *in vitro* a segurança das formulações para a mucosa nasal. O modelo comercial de tecido nasal humano cultivado *in vitro* (MucilAir™-Epithelix Sàrl, Genève – Suíça) permitiu a conjugação indicadores de toxicidade (resistência transepitelial, morte celular e estado metabólico).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Materiais e Reagentes

As matérias-primas utilizadas na preparação dos pré-concentrados foram: Imwitor® 948 (mono-oleato de glicerol), solicitamente cedido pela CREMER OLEO GmbH & Co. KG (Witten, Alemanha); Kolliphor® RH 40 (hidroxistearato de macroglicérol), solicitamente cedido pela BASF (Ludwigshafen, Alemanha); Capryol™ 90 (monocaprilato de propilenglicol Tipo II) e Transcutol® HP (éter monoetílico de dietilenoglicol), gentilmente cedidos pela Gatefossé® SAS (Saint-Priest, França); acetato de vitamina E (Acetato de alfa-Tocoferol), adquirida à Acofarma® (Terrasa, Barcelona, Espanha), Cloreto de cetalcônio (hidrato de cloreto de benzildimetilhexadecilamônio, 97%) foi adquirida da Acros Organics B.V.B.A (Geel, Bélgica) e AS (pureza [HPLC] Purity (HPLC) 99,63%) adquirido à Bld Pharmatech GmbH (Kaiserslautern, Germany), ou do laboratório Struchem Co., Ltd. (Wujiang China) por intermédio da Laborspirit Lda. (Santo Antão do Tojal, Portugal). A preparação das diversas fases externas envolveu o uso das seguintes matérias-primas: água ultrapura, obtida *in-house* a partir de um sistema de purificação Milli-Q®, filtro de 0,22 µm, da Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha); glicerina (Labchem, Santo Antão do Tojal, Portugal), polietilenoglicol 4000 (PEG) 4000 adquirido à Acofarma® (Terrasa, Barcelona, Espanha), cloreto de sódio) Fisher Scientific, (Leicestershire, United Kingdom).

Os solventes usados foram Acetonitrilo e metanol, ambos para HPLC (Grau gradiente), obtidos por exemplo da Fisher Scientific (Leicestershire, Reino Unido) e Chem-Lab NV (Zedelgem, Bélgica), respetivamente.

3.2 Preparação das Formulações

3.2.1 Microemulsões

Primeiro, os excipientes da fase oleosa foram pesados numa balança de precisão KERN® ABJ 120-NM precision scale (Balingen, Germany). Após a fusão, o Kolliphor® RH 40 (40% m/m) foi o primeiro a ser pesado, devido à sua alta viscosidade. Em seguida, o acetato de Vitamina E 98% (10% m/m) e Transcutol® HP (40% m/m) foram pesados e misturados

com Kolliphor® RH 40 usando um agitador magnético. A proporção dos excipientes resultou de trabalhos anteriores desenvolvidos no grupo de investigação. Após a obtenção de uma mistura homogénea, o AS (18,4 mg/g) foi adicionado à fase oleosa obtida, promovendo-se a sua dissolução por agitação magnética (Dry Block Heater, VWR Analogue, Pennsylvania, Estados Unidos da América). Finalmente, adicionou-se água ultra-pura filtrada através de um filtro de seringa de poros de 0,22 µm (VWR International LLC, Pensilvânia, Estados Unidos da América) na proporção de 10% (m/m) em relação à massa final, e mistura foi promovida agitando o tubo manualmente. Na presente proporção de água (10%), obtém-se uma solução límpida (automicroemulsificante) conhecida como SMEDDS (do inglês *self-microemulsifying drug delivery system*), também chamada de ME pré-concentrada, sendo que a microemulsão propriamente dita só se forma após posterior dispersão em fase aquosa para atingir a concentração final de AS alvo (de 0,48 mg/mL), sendo, neste caso, usada uma solução de NaCl a 0,9%.

3.2.2 Nanoemulsões

A NE consistiu numa mistura de diferentes excipientes para criar a fase oleosa e a fase aquosa. A proporção ideal de excipientes resultou de trabalhos anteriores desenvolvidos no grupo de investigação e foi mantida ao longo deste trabalho.

O procedimento de preparação das nanoemulsões seguiu as mesmas etapas principais das ME. Na preparação dos pré-concentrados os excipientes foram pesados por ordem, de acordo com sua viscosidade: Kolliphor® RH 40 (16,67% m/m), depois Imwitor® 948 (33,33% m/m) e finalmente 50% (m/m) de Capryol® 90 (no caso da NEn e da NEa, que corresponde às NE neutra e aniónica, respetivamente), ou de uma solução de Cloreto de cetoalcónio (CL) a 1% em Capryol® 90 (NEc, que corresponde à NE na versão catiónica). A solubilização do AS seguiu o mesmo procedimento descrito para ME (secção 3.2.1), mas à concentração final de 22,4 mg/g. Na preparação das NE concentradas, primeiro foi adicionado apenas 1/5 da massa final da respetiva fase aquosa (Tabela 1), seguido da mistura, promovida por agitação manual do tubo, e só então os outros 4/5 da fase aquosa foram adicionados. A adição da fase aquosa em duas etapas é o que faz com que a nanoemulsão de O/A se forme por emulsificação de inversão de fase.

Tabela 1. Percentagens de excipientes usados para preparar as NE concentradas (concentrado com AS).

Excipientes	NEa	NEc	NEn
Pré-concentrado (com AS)	50%	50%	50%
Solução aquosa de PEG 4000 (4%)	50%	-	50%
Solução aquosa de Glicerina (2,6%)	-	50%	-

As NE concentradas foram ainda diluídas nas respectivas fases externas (Tabela 2) de forma a atingir a concentração final de AS alvo (de 0,48 mg/mL) nas NE propriamente ditas.

Tabela 2. Percentagens de excipientes usados para preparar as NE propriamente ditas.

Excipientes	NEa	NEc	NEn
NE concentrada com AS	4,3 %	4,3 %	4,3 %
Dispersão de Carbopol® 940 (0,1%, pH 7) em solução de glicerina (2,6%)	95,7 %	-	-
Solução de Glicerina (2,6%)	-	95,7 %	-
Solução de NaCl (0,9%)	-	-	95,7 %

3.3 Caracterização da Formulações

3.3.1 Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta

Tanto o diâmetro hidrodinâmico médio (tamanho da gota) quanto o PDI foram medidos pela técnica de espalhamento dinâmico de luz associada à análise do método de cumulantes. Para tanto, foi utilizado um Zetasizer Nano ZS Malvern® (Malvern, Reino Unido) combinado com o software Zetasizer (versão 7.10). Antes de cada medição, as amostras NE foram diluídas 25 vezes em água ultrapura filtrada através de um filtro de acetato de celulose com poro de 0,2 µm. A ME foi medida sem diluição. Para cada amostra testada, foram preparadas duas cuvetes plásticas independentes e foram realizadas três medições de forma automática em cada uma pelo equipamento, com a temperatura regulada a 25 °C. Como parâmetros de medição definidos no software Zetasizer, a água foi considerada como dispersante (Índice de refração = 1,330 e Viscosidade = 0,8872 cP) e o material foi definido como lípido (Índice de refração = 1,450). A caracterização do potencial zeta foi feita com o mesmo equipamento, com as mesmas etapas de preparação, mas usando Zetasizer Nano Series Dip Cell Kit Malver®. As medições foram feitas a 25 °C e a água foi selecionada como dispersante (constante dielétrica = 78,5) e lípido como material.

3.3.2 Caracterização Reológica

As medições de viscosidade foram realizadas a diferentes velocidades de rotação num Brookfield DV3TRVCP® Cone Plate Viscometer (Toronto, Canadá), usando o fuso cônico CPA-40z (faixa de viscosidade de 1,7-32700 cP) e o Software Rheocalc T® (versão 1.1.13). As medições foram feitas a uma temperatura controlada de 25 °C usando um banho de água termostático (MultiTemp III Thermostatic Circulator, Thermo Fisher Scientific, New Hampshire, EUA). Antes das medições de viscosidade, a calibração do equipamento foi verificada usando o Ametek Brookfield Fluid 500 Viscosity Standard (Middleborough,

Estados Unidos da América). O volume usado foi de 400 µL, visto ter-se verificado ser suficiente para cobrir toda a superfície do cone (confirmado após cada medição por inspeção visual da superfície e da borda do cone [49]). Após estabilização da temperatura a 25 °C as medições foram realizadas desde altas velocidades, que produziam um percentual de torque próximo a 100%, até baixas velocidades com uma percentagem de torque próxima a 10%. A cada velocidade, a viscosidade foi registada após o cone ter tempo suficiente para realizar 5 rotações completas.

3.4 Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O método de cromatografia desenvolvido foi usado para quantificação de AS nas NE e ME, como de amostras colhidas durante o ensaio de libertação. O equipamento foi habitualmente operado por um membro mais experiente da equipa.

3.4.1 Aparelho e Condições Cromatográficas

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês “high performance liquid chromatography”) foi realizada utilizando um sistema de Cromatografia Líquida LC-2010A HT acoplado a um detetor de arranjo de díodos SPD-M20A, controlado automaticamente pelo software de aquisição de dados LabSolutions 5.52, da Shimadzu (Kyoto, Japão). A separação cromatográfica foi realizada a 30 °C em uma coluna de fase reversa (C18, tamanho de partícula de 3 µm, 55 × 4 mm) protegida por uma pré-coluna de fase reversa (C18, tamanho de partícula de 5 µm, 4 × 4 mm), ambos os modelos LiChroCART® Purospher® STAR adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A eluição isocrática foi obtida a uma taxa de fluxo de 1 mL/min usando uma fase móvel composta de 50% de metanol e 50% de água, filtrada usando uma membrana Nylaflo, tamanho de poro de 0,2 µm (Pall, Estados Unidos of America) e desgaseificados por 30 minutos em banho ultrassónico Labbox Labware ULTR (Barcelona, Espanha) antes do uso. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL e a deteção do analito foi realizada 241 nm em corridas de 5 minutos.

3.4.2 Soluções Stock, Padrões de Calibração e Controlos de Qualidade

Foi preparada uma solução “stock” de AS em metanol a 1 mg/mL. A partir desta solução foi preparada uma solução intermediária a 10 µg/mL por diluição em metanol. As diferentes soluções para a reta de calibração (0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 10 e 25 µg/mL) e amostras de

controle de qualidade (QC, do inglês *Quality Control*) foram preparados diluindo as soluções estoque ou intermediária numa mistura de metanol 50% e água 50% (v/v).

3.4.3 Validação

A validação do método foi realizada de acordo com as exigências da EMA e FDA para a validação de métodos bioanalíticos. A seletividade relativamente aos excipientes da composição da formulação foi determinada por execução de amostras em branco diluídas de microemulsão e nanoemulsões. A linearidade foi testada usando curvas de calibração preparadas independentemente em três dias diferentes e compostas por oito padrões de calibração cobrindo uma faixa de concentração de 0,05 - 25 µg/mL. O padrão de calibração mais baixo (0,05 µg/mL) corresponde ao limite de quantificação inferior (LLOQ, do inglês “Lower limit of quantification”) do método. As curvas de calibração foram obtidas plotando as áreas dos picos do AS em relação à concentração nominal correspondente. Posteriormente, os dados foram submetidos a análise de regressão linear ponderada usando diferentes fatores de ponderação ($1/x^2$, $1/x$, $1/\sqrt{x}$, $1/y^2$, $1/y$, e $1/\sqrt{y}$). A precisão e exatidão intradiária e interdiária do LLOQ foram avaliadas com amostras preparadas em quintuplicata (n=5) em três dias independentes. Exatidão e precisão intradiária foram avaliadas analisando quatro amostras de QC cobrindo diferentes concentrações nominais (QC LLOQ = 0,05 µg/mL, QC1 = 0,15 µg/mL, QC2 = 12,5 µg/mL e QC3 = 22,5 µg/mL) preparado em quintuplicata no mesmo dia. A exatidão e a precisão interdiária foram avaliadas através da análise das quatro amostras de QC preparado em triplicado em três dias consecutivos. Finalmente, a estabilidade foi determinada pela exposição de QC1 e QC3 preparados em triplicata (n=3) a diferentes condições experimentais, simulando armazenamento e manuseio de amostras.

3.5 Estudos de Estabilidade Física e Química

Para avaliar a estabilidade química e física, cada formulação foi dividida e armazenada a três temperaturas diferentes (4 °C, 25 °C e 40 °C) por 180 dias (lote 1) e 150 dias (lote 2). A avaliação da estabilidade de longo prazo foi combinada com triagem inicial a fim de determinar formulações com melhores potenciais para serem mais estudados. Em diferentes momentos (0, 1, 7, 15, 30, 90, 150 e 180 dias) o aspeto foi registado, prestando atenção à separação de fases e precipitação do AS. Para cada formulação, tamanho de gota, PDI e potencial zeta também foram caracterizados (como descrito anteriormente). Ao mesmo tempo, a concentração de AS foi determinada usando o método de HPLC, descrito anteriormente.

3.6 Ensaio de Liberação *In Vitro*

O perfil de liberação do fármaco foi estudado usando sistemas de câmaras de Ussing horizontais (Harvard Apparatus, NaviCyte, Hugstetten, Alemanha). Foi utilizada uma configuração composta por câmaras Ussing colocadas em um bloco de aquecimento de água conectado a um circulador termostático de banho-maria Grant Instruments Ltd Y-28-VF (Cambridge, Reino Unido). Para promover a homogeneização, uma microbarra de agitação de 2 mm foi colocada dentro da câmara recetora. Filtros de disco de membrana hidrofílica de polietersulfona Supor® com tamanho de poro de 0,2 µm (Pall Life Sciences, Nova York, Estados Unidos da América) foram usados para criar uma separação física entre a câmara doadora (topo) e a câmara recetora (parte inferior). Uma solução simulante nasal pH 6,5 (Fosfato de Sódio Monobásico 7 mM, Fosfato de Sódio Dibásico 3 mM, Cloreto de Potássio 30 mM, Cloreto de Sódio 107 mM, Cloreto de Cálcio 1,5 mM, Cloreto de Magnésio 0,75 mM e Hidrogenocarbonato de Sódio 5 mM) foi usada para preencher a câmara recetora (1,9 mL). Antes de iniciar o ensaio, 100 µL de solução tampão nasal foram colocados na câmara doadora (para promover o equilíbrio da membrana) e a temperatura foi estabilizada. Numa das câmaras contendo apenas tampão foi utilizado um sensor para monitorizar a temperatura (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG EKT Hei-Con, Schwabach, Alemanha). A temperatura do banho-maria foi corrigida para manter o líquido no interior das câmaras a 32 °C (temperatura média da cavidade nasal [50]) e a velocidade de agitação foi fixada em 200 rpm, evitando a formação de bolhas no seu interior.

O ensaio começou substituindo os 100 µL de tampão nasal colocados na câmara doadora por 100 µL da formulação teste diluída à concentração de 0,24 µg/mL. Esta diluição foi necessária para se garantirem as condições de imersão (ou seja, que a concentração medida na câmara recetora seria sempre largamente inferior à solubilidade aquosa do AS (estimada em 2,31 µg/mL [51]). Então, em tempos diferentes (15, 30, 60, 120, 240 e 360 min), 100 µL da câmara recetora foram coletados e substituídos por 100 µL de solução tampão nasal para manter o mesmo volume total. Os 100 µL coletados foram centrifugados (13500 rpm, durante 3 minutos) e quantificados diretamente por HPLC, usando o método descrito na seção 3.4.1

3.7 Ensaios de Segurança *In vitro*

A cultura celular e manipulação dos tecidos nas experiências tiveram a colaboração da co-orientadora. Contudo, a preparação e caracterização das formulações testadas foram da responsabilidade da autora desta dissertação.

3.7.1 Receção e Cultura do Modelo do Mucilar™

O modelo comercial MucilAir™ (Epithelix Sàrl, Genève – Suíça) consiste num modelo *in vitro* tridimensional de células de epitélio nasal humano, mantidas em cultura numa interface ar-líquido. Foi adquirido o modelo no formato de pool de dadores, em *inserts* com 0,33 cm², que são enviados refrigerados em placa de 24 poços em meio gelificado. Durante a sua manutenção e utilização, foram seguidas as indicações e recomendações do fabricante. Após deixar a placa aquecer por 1 h em incubadora, a 37 °C com 5% de CO₂, abriu-se uma placa de 24 poços estéril na câmara de fluxo, sendo colocado 0,7 mL do meio comercializado com o modelo, também este pré-aquecido a 37 °C, em cada poço. Em seguida, a placa do MucilAir™ foi introduzida na câmara de fluxo por forma a remover os *inserts* dessa placa e colocá-los na nova placa de 24 poços, já com o meio. Terminado este procedimento, a nova placa com os *inserts* foi colocada a incubar a 37 °C com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Numa nova placa de 24 poços, foram colocados 0,7 mL do meio comercializado com o modelo em novos poços, transferindo-se posteriormente os *inserts* para esses novos poços, com o auxílio de uma pinça. A cada 3 semanas, foi feita a lavagem de muco do lado apical dos *inserts*. Esta lavagem foi feita com 200 µL de KRB, pH 7, previamente equilibrado na incubadora a 37 °C com 5% de CO₂, no lado apical dos *inserts*, ficando 20 minutos na incubadora. Estes 200 µL de KRB foram posteriormente removidos cuidadosamente, com o auxílio de uma pinça para levantar e inclinar o *insert*, e a placa era reposta na incubadora.

3.7.2 Medição TEER

A medição do TEER foi feita com recurso ao medidor EVOM, do inglês Epithelial Volt/Ohm (TEER) Meter (World Precision Instruments, Sarasota, Flórida – Estados Unidos da América). Colocou-se KRB numa placa de Petri e incubou-se a mesma a 37 °C com 5% de CO₂ por cerca de 15 minutos para equilibrar. O elétrodo do EVOM foi descontaminado por 15 minutos num *falcon* com 15 mL de etanol a 70%, tendo sido colocado de seguida em KRB à temperatura ambiente por cerca de 2 a 3 minutos. O volume de KRB deve ser sempre inferior ao do etanol utilizado para a esterilização do elétrodo. Para a medição, foram colocados 200 µL de KRB previamente equilibrado na incubadora no lado apical dos *inserts*, seguindo-se a inserção do elétrodo do EVOM e registo do valor medido. De seguida, o elétrodo foi novamente descontaminado, o KRB previamente colocado no lado apical dos *inserts* foi retirado cuidadosamente sem danificar o tecido, com o auxílio de uma pinça para levantar e inclinar o *insert*, e a placa colocada novamente na incubadora. O TEER foi calculado através das leituras de resistência (Ω) obtidas com o EVOM, às quais se subtraiu o valor de resistência do *insert* (100), multiplicando-se, em seguida, pela área do *insert* (0,33 cm²), obtendo-se assim o TEER em $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

3.7.3 Ensaio de Citotoxicidade do Mucilar™

O ensaio de citotoxicidade com o MucilAir™ combinou a utilização da resazurina para verificar o metabolismo celular com a medição do TEER e da LDH. Para a preparação do ensaio, foi feita a remoção do muco associada à leitura da resistência para cálculo do TEER três dias antes do ensaio, conforme descrito na secção 3.8.1.

No dia do ensaio foi colocada uma placa de 24 poços com 0,4 mL meio de cultura na incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ por cerca de 15 minutos para equilibrar. Para o tratamento, colocaram-se 16,5 µL dos compostos a testar ou de soluções controlo (NaCl 0,9%, cloreto benzalcónio 0,2%, Triton X- 100 no lado apical dos *inserts* (equivalente a 50 µL/cm²) e incubou-se a placa por 30 minutos nas condições descritas anteriormente. Em seguida, preparou-se uma nova placa de 24 poços para onde os *inserts* foram transferidos por forma a realizar uma lavagem com 200 µL de KRB equilibrado, como descrito na secção 3.8.1. O meio remanescente do lado basal foi guardado a 4 °C até realização do ensaio de quantificação da LDH (secção 3.7.5).

Terminada a lavagem e retirado todo o volume de líquido do lado apical dos *inserts*, colocou-se 400 µL de resazurina a 50 µM diluída no KRB equilibrado nos poços. Os *inserts* foram transferidos para estes poços e foi colocado 200 µL de resazurina no lado apical. A placa foi então colocada a incubar por 2 h.

No fim da incubação, cento e oitenta µL da solução de resazurina removida do lado apical foram transferidos para uma placa de 96 poços para análise da redução a resazurin (secção 3.7.4). Os *inserts* foram então transferidos para os poços com KRB previamente preparados e fez-se uma nova lavagem. Neste momento, o EVOM foi preparado e o valor de TEER foi determinado, seguindo o descrito no ponto 3.8.2 e, por fim, os *inserts* foram novamente colocados em meio de cultura nos poços de uma placa de 24 poços e esta foi colocada na incubadora.

3.7.4 Análise da redução de resazurina

Com a placa contendo a solução de resazurina removida do lado apical foram efetuadas medições de fluorescência (excitação de 544 nm e emissão a 549 nm), recorrendo a leitor de placas. Foi calculada a percentagem de viabilidade em comparação com o controlo negativo com a seguinte equação (Eq. 3).

$$\text{Viabilidade (\%)} = (\text{Fluorescência}(\text{teste}) - \text{Fluorescência}(\text{meio})) / (\text{Fluorescência média dos controlos}) \times 100 \quad (\text{Eq.3})$$

3.7.5 Ensaio de LDH

Foram recolhidos, em triplicado, 50 µL do meio de cultura do lado basal de cada um dos inserts e colocados numa placa de 96 poços de baixa absorção na zona do UV (UVSTAR®, Greiner Bio-One). Um poço controlo foi lisado com Triton X-100 1%, diluído em KRB e diluído a diferentes concentrações (0 – 100% LDH). A cada um destes poços com meio, foram adicionados 200 µL de NADH (252,84 mM) e, em seguida, 25 µL de piruvato (14,99 mM). Por último, realizou-se uma leitura de absorbância em um espectrofotómetro a 340 nm. A partir das diferentes concentrações obtidas através da lise do poço controlo, foi construída uma reta de calibração para a interpretação dos resultados. Foi obtida linearidade entre as concentrações de 0% e 50%. A equação da reta obtida nesta gama de concentrações foi a utilizada para a interpretação dos resultados.

3.8 Análises Estatísticas

A análise gráfica e estatística dos dados foi realizada com o software GraphPad Prism® (versão 8.01). Na validação de método de HPLC, ensaio de libertação de fármaco *in vitro*, caracterização reológica, estudos de estabilidade física e química e ensaio de segurança *in vitro* os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

Nos estudos de estabilidade física e química, a análise estatística das diferenças significativas entre o tamanho médio das gotas e o PDI entre as formulações e ao longo do tempo foram avaliadas por ANOVA bidirecional seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. O impacto do tempo e da temperatura na estabilidade química do acetato de segesterona foi avaliado por ANOVA de dois fatores.

Durante a caracterização reológica, o comportamento newtoniano (dilatante/pseudoplástico) foi determinado ajustando uma regressão linear (Newtoniana), uma equação de crescimento exponencial regressão não linear (dilatante) ou uma regressão não linear polinomial de segunda ordem (pseudoplástico), aos dados de “taxa de cisalhamento *versus* tensão de cisalhamento” e, em seguida, comparando os coeficientes de correlação.

No ensaio de libertação de fármaco *in vitro*, a libertação do fármaco foi determinada com base na dosagem inicial do fármaco.

No modelo MucilAir™ (medição do TEER, ensaio de citotoxicidade e ensaio de LDH) foi realizada uma ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Dunnett para cada um dos ensaios.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Validação do método HPLC

O método HPLC apresentou boa especificidade para o AS, sendo capaz de detetá-lo separadamente de outros constituintes da matriz. A seletividade foi garantida uma vez que, no tempo de retenção (TR) do AS, tanto as amostras em branco da microemulsão quanto das nanoemulsões, a diluições inferiores à realizadas para a quantificação, apresentaram ausência de interferências, possibilitando a quantificação seletiva do AS.

As curvas de calibração elaboradas nos três diferentes dias de validação apresentaram linearidade para a faixa de concentrações utilizadas (0,15-25 µg/mL). Após testar diferentes fatores de ponderação, $1/x^2$ foi selecionado por apresentar a melhor linearidade e coeficiente de determinação ($r^2 = 0,9969$), obtendo-se a equação:

$$y = 47435,2723 x - 128,9787 \text{ (Eq. 3)}$$

A sensibilidade foi reconhecida após o valor LOQ ter sido estabelecido em 0,05 µg/mL, com precisão e exatidão aceitáveis (Tabela 8) dentro da faixa estabelecida pelas diretrizes da EMA e FDA. O presente método mostrou-se preciso e exato para quantificação do AS com os valores de CV e viés intradiários e interdiários calculados para QC1, QC2 e QC3 atendendo às diretrizes internacionais mencionadas (Tabela 6).

Tabela 3. Valores de precisão intra e interdia (% CV) e exatidão (% viés) obtidos para amostras de controle de qualidade (QC, do Inglês *Quality Control*) no limite inferior de quantificação (QC LLOQ, do Inglês *Quality Control Lower Limit Of Quantification*), e no limite baixo (QC1), médio (QC2) e níveis altos de concentração (QC3) representativos das faixas de calibração.

Controlos de qualidade (QC)	Interdia (n=3)				Intradia (n=5)		
	C (µg/mL)	Cexp (Média ± DP, µg/mL)	Precisão (% CV)	Exatidão (% viés)	Cexp (Média ± DP µg /mL)	Precisão (% CV)	Exatidão (% viés)
QC LLOQ	0,05	0,05 ± 0,00	8,5	-2,3	0,05 ± 0,00	16,7	3,0
QC1	0,15	0,15 ± 0,01	54	-3,2	0,14 ± 0,00	1,9	-6,8
QC2	12,5	12,05 ± 0,36	3,0	6,2	11,61 ± 0,39	3,3	-6,8
QC3	22,5	23,81 ± 0,80	3,4	1,9	23,52 ± 0,73	3,1	4,9

CC, concentração; Cexp, Concentração experimental; CV, Coeficiente de Variação; DP, Desvio padrão

4.2 Estabilidade Física

A estabilidade física foi avaliada por inspeção visual, tamanho médio da gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta em dois lotes independentes 180 dias (lote 1) e 150 dias (lote 2). No caso da NEa, foi ainda avaliada a viscosidade da preparação.

O aspeto visual inicial das formulações foi sempre homogêneo, mas variou entre o límpido, sem qualquer cor (Figura 2a), o opaco ligeiramente acastanhado (Figura 2b) ou translúcido ligeiramente acastanhado (Figura 2c e 2d). Os sinais de desestabilização física visíveis a olho nu ao longo dos estudos de estabilidade foram a precipitação (Figura 2e) e a formação de creme (Figura 2f)

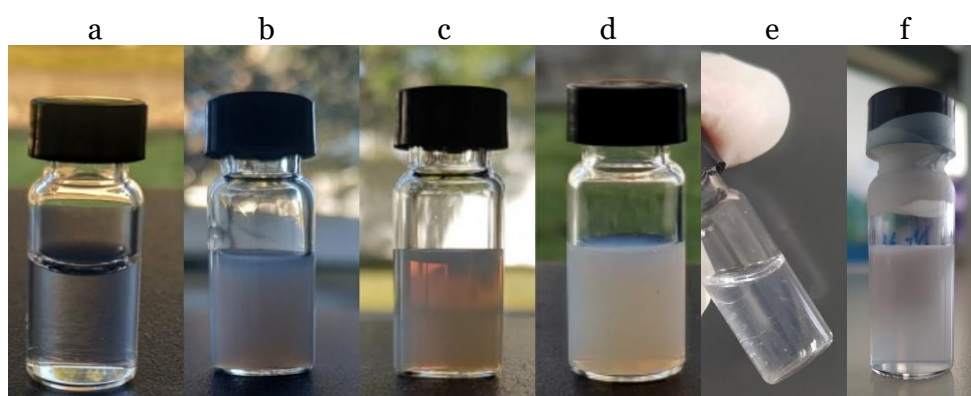


Figura 2. Aspetos visuais da ME e NE. Límpida e homogênea (a), opaca, homogênea e acastanhada (b), translúcida, homogênea e acastanhada (c) e d), cristais precipitados de AS na ME (e), formação de creme na NEN (f).

O aspeto visual inicial e final, tempo de precipitação do AS e tempo para observação de separação de fases estão resumidos na Tabela 7. Foi possível verificar a ocorrência de precipitação do AS na ME, de aspeto límpido (30 dias a 4 °C no lote 1 e a partir dos 7º ou 15º no lote 2). Deve ser, contudo, ser tido em conta que a ocorrência de precipitação de AS seria mais difícil de detetar a olho nu nas NE devido à sua maior opacidade. No caso da NEN armazenada a 40 °C, a partir do 30º dia, observou-se formação de creme (Figura 2f), que corresponde a um fator de instabilidade que ocorre em NE. No entanto, a formação de creme, são processos reversíveis, que através de uma agitação é possível restaurar a aparência inicial da NE.

Tabela 4. Caracterização do aspeto visual das formulações armazenadas em diferentes condições de temperatura (4 °C, 25 °C e 40 °C) no início (t=0) e no final (lote 1 180 dias, lote 2 150 dias) do ensaio, dias de separação de fases e dia de precipitação do acetato de segesterona.

Formulação	T (°C)	Aspeto visual			Sinais de desestabilização física				
		T=0		Final		Precipitação (dias)		Separação de fases (dias)	
		Lotes 1 e 2		Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
ME	4		Sobrenadante límpido e sedimento sólido	Sobrenadante límpido e sedimento sólido	30 ^e	7 ^e	-	-	
	25	Límpida e homogénea ^a	Límpida e homogénea	Sobrenadante límpido e sedimento sólido	-	7 ^e	-	-	
	40		Límpida e homogénea	Sobrenadante límpido e sedimento sólido	-	15 ^e	-	-	
NEa	4		Opaca, homogénea e acastanhada	Opaca, homogénea e acastanhada	-	-	-	-	
	25	Opaca, homogénea e acastanhada ^b	Opaca e heterogénea	Opaca e heterogénea	-	-	-	-	
	40		Opaca e heterogénea	Opaca e heterogénea	-	-	-	-	
NEc	4		Translúcida, homogénea e acastanhada	Translúcida, homogénea e acastanhada	-	-	-	-	
	25	Translúcida, homogénea e acastanhada ^c	Translúcida, homogénea e acastanhada	Translúcida, homogénea e acastanhada	-	-	-	-	
	40		Translúcida, homogénea e acastanhada	Translúcida, homogénea e acastanhada	-	-	-	-	
NEn	4		Translúcida, homogénea e acastanhada	Translúcida, homogénea e acastanhada ⁻	-	-	-	-	
	25	Translúcida, homogénea e acastanhada ^d	Translúcida, homogénea e acastanhada	Translúcida, homogénea e acastanhada	-	-	-	-	
	40		Opaca ⁺⁺ , heterogénea, translúcida e acastanhada ⁻	Opaca ⁺⁺ , heterogénea, translúcida e acastanhada ⁻	-	-	30 ^f	30 ^f	

Na ME, o tamanho da gotícula e o PDI foram afetados tanto pelo tempo quanto pela temperatura ($p < 0,05$) (Figura 3ME, e Figura 4ME). Apesar do tamanho de gotícula permanecer durante todo o tempo inferior a 100 nm, houve aumento de tamanho médio e PDI, mais acentuada ao longo do 30º dia e a temperaturas mais elevadas, ainda assim, os valores de PDI permaneceram, de forma aceitável, inferiores a 0,2. Contudo, a precipitação

do fármaco pode ter contribuído para a variação de tamanho e PDI, o que poderia ser corrigido reduzindo a concentração e fármaco no pré-concentrado. Já o potencial zeta permaneceu estável e neutro durante todo o tempo, ou seja, não foi influenciado pelo tempo e temperatura ($p > 0,05$).

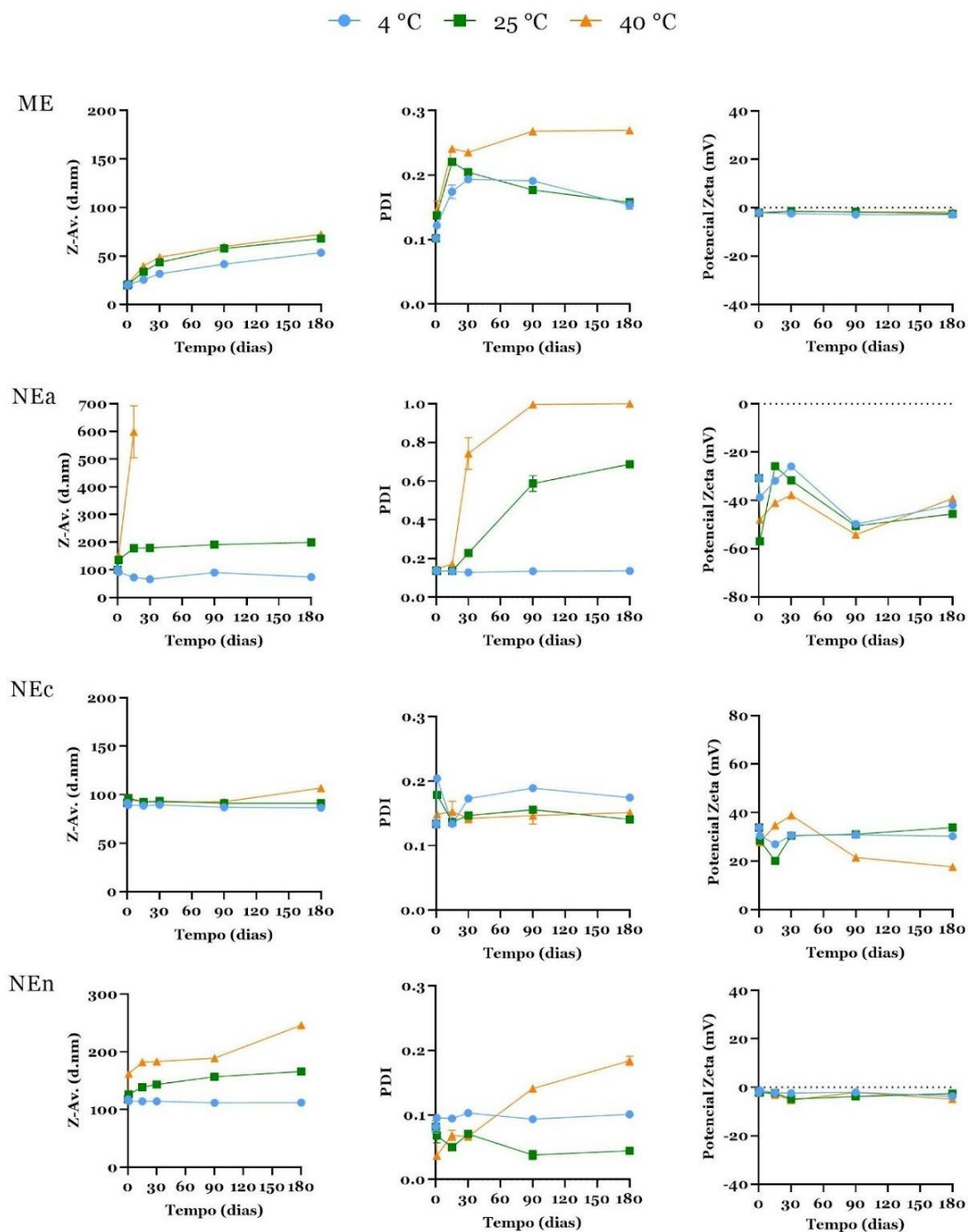
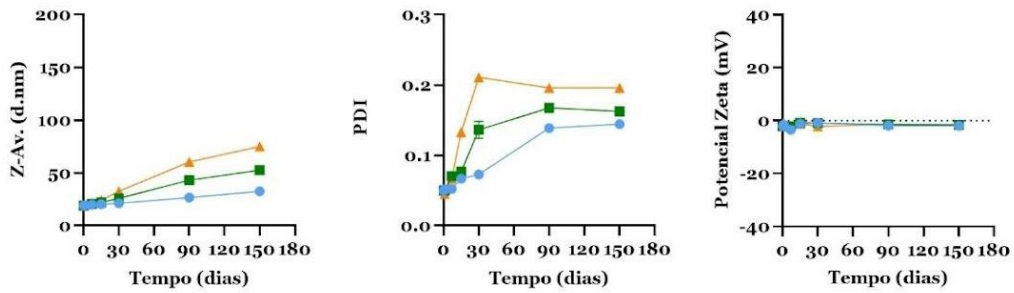


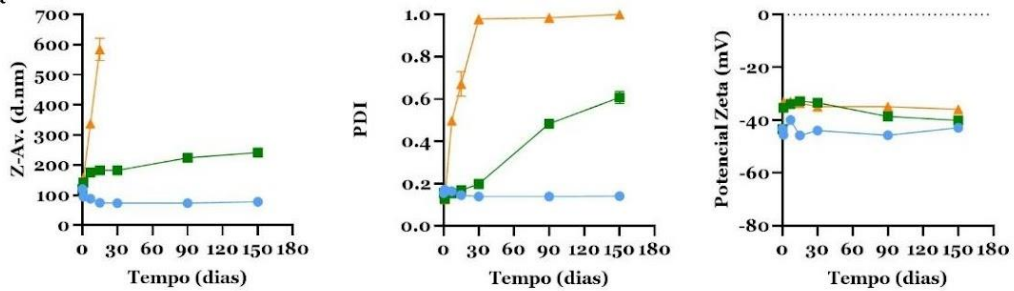
Figura 3. Caracterização do tamanho hidrodinâmico médio da gota (Z-Av.), índice de polidispersão (PDI) e Potencial Zeta (PZ) da microemulsão (ME), nanoemulsão aniônica (NEa), nanoemulsão catiônica (NEc) e nanoemulsão neutra (NEn) ao longo do tempo. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão a três temperaturas de armazenamento (4 °C, 25 °C e 40 °C).

● 4 °C ■ 25 °C ▲ 40 °C

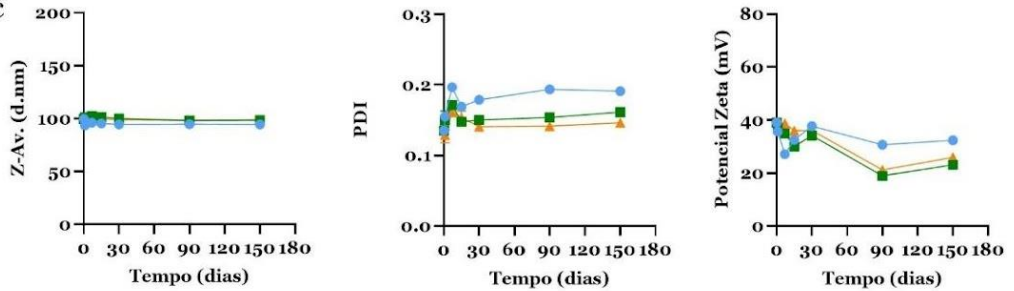
ME



NEa



NEc



NEn

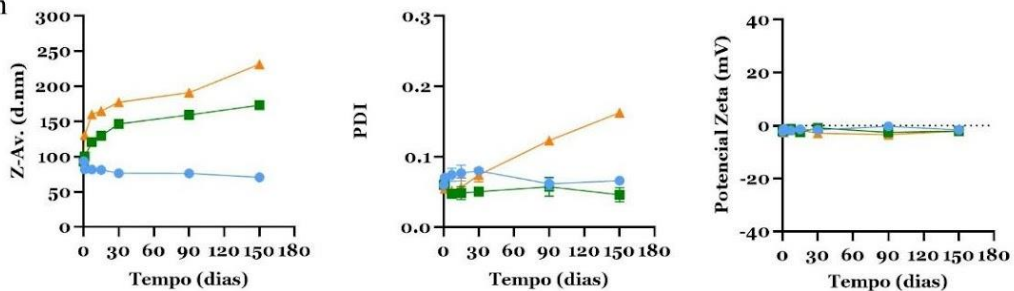


Figura 4. Caracterização do tamanho hidrodinâmico médio da gota (Z-Av.), índice de polidispersão (PDI) e Potencial Zeta (PZ) da microemulsão (ME), nanoemulsão aniônica (NEa), nanoemulsão catiônica (NEc) e nanoemulsão neutra (NEn) ao longo do tempo. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão a três temperaturas de armazenamento (4 °C, 25 °C e 40 °C).

Quanto à NEa, o tamanho da gotícula e o PDI foram afetados tanto pelo tempo quanto pela temperatura ($p < 0,05$). Houve uma ligeira diminuição do tamanho de gotícula logo no 1º dia quando armazenada a 4 °C, e durante os primeiros 15 a 30 dias houve aumento do tamanho da gotícula a 25 °C e 40 °C, bastante mais acentuado à temperatura superior

(Figura 3NEa, e Figura 4NEa). Enquanto a 25 °C as gotículas permaneceram com um tamanho próximo dos 200 nm, o PDI subiu claramente acima de 0,4 ao 90º dia, e a 40 °C o tamanho já era cerca de 600 nm ao 15º dia, tendo deixado de ser possível de determinar devido à elevada heterogeneidade da preparação. A NEa apresentou, contudo, estabilidade quando armazenada a 4 °C, com PDI inferior a 0,2 e tamanho inferior a 100 nm. O potencial zeta da NEa permaneceu relativamente estável e próximo dos -40 mV às 3 temperaturas, embora ligeiramente mais baixo na NEa armazenada a 4 °C.

Na NEc, o tamanho da gotícula e o PDI foram afetados tanto pelo tempo quanto pela temperatura ($p < 0,05$). Houve uma ligeira diminuição, quase impercetível, do tamanho de gotícula a 4 °C e um ligeiro aumento do tamanho de gotícula a 40 °C, que permaneceram muito próximo dos 100 nm no fim da experiência. Já, o PDI aumentou um pouco nos primeiros dias, sendo ligeiramente superior na NEc armazenada a 4 °C, mas manteve valores estáveis a partir do 15º ou 30º dia de armazenamento em valores aceitáveis (inferiores 0,2). O potencial zeta manteve-se positivo entre 20 mV e 40 mV durante todo o tempo.

Por fim, na NEn, o tamanho da gotícula e o PDI foram claramente dependentes do tempo e temperatura ($p < 0,05$). Uma vez que, apesar de o tamanho inicial ser muito próximo de 100 nm, o tamanho aumentou após armazenamento a 25 °C e mais ainda a 40 °C (superior a 200 nm). O PDI não teve grandes variações a não ser a 40 °C, onde aumentou a partir dos 90 dias, mas mantendo-se inferior a 0,3. Já, a NEn armazenada a 4 °C manteve-se com tamanhos de gotículas e PDI próximo aos iniciais. O potencial zeta permaneceu neutro como esperado. Uma vez que a fase aquosa com PEG tornou o tamanho e PDI da NE concentrada independente da temperatura, [51] que parecia ser mantido na NE propriamente dita mais diluída num primeiro instante (logo após a preparação), poderá fazer sentido testar a manutenção do PEG na fase aquosa para a obtenção da NE propriamente dita em vez da solução salina usada, testando se isso evitaria o aumento do tamanho observado às temperaturas de 25 °C e 40 °C, tendo estes resultados sido mostrados por Pires et al [51].

Foi ainda avaliada ao longo do tempo a viscosidade da preparação NEa, a única com viscosidade mensurável, a duas velocidades de rotação distintas (15 S⁻¹ e 150 S⁻¹). A viscosidade da NEa, no decorrer dos 180 e 150 de análise, estão graficamente representados na Figura 5. Verifica-se que as formulações que permaneceram na temperatura de 40 °C tiveram uma diminuição de viscosidade em comparação as formulações que permaneceram na temperatura de 4 °C e 25 °C. Este fato indica que a temperatura de armazenamento de 40 °C influencia a viscosidade das formulações.

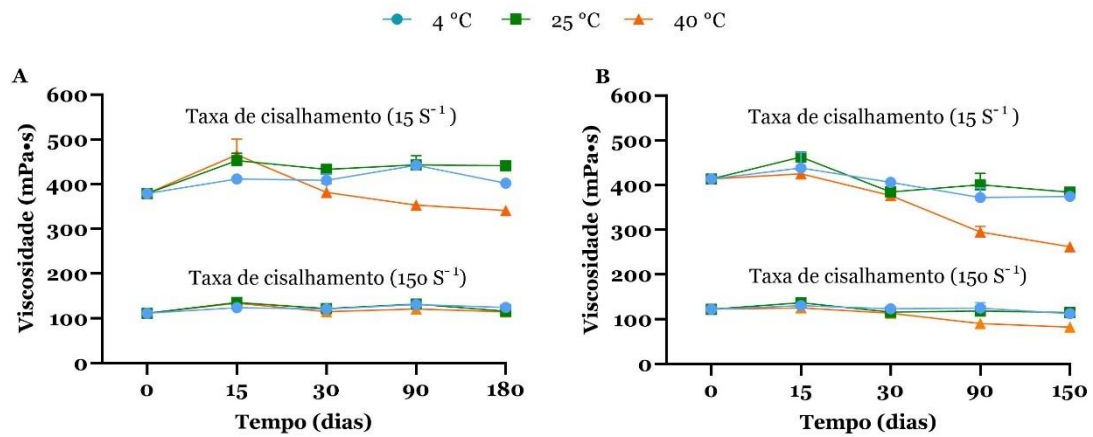


Figura 5. Caracterização da viscosidade da nanoemulsão aniônica (NEa) ao longo do tempo. A. 1^o lote; B. 2^o lote. As medições foram realizadas a 25 °C, independentemente da temperatura de armazenamento ser 4 °C, 25 °C ou 40 °C, em diferentes pontos de tempo (0, 15, 30, 90 e 180 (A) dias e 0, 15, 30, 90 e 150 (B) dias).

4.3 Estabilidade Química

A estabilidade química do AS na ME e NE também foram acompanhadas ao longo de 180 dias (Figura 5) e 150 dias (Figura 6).

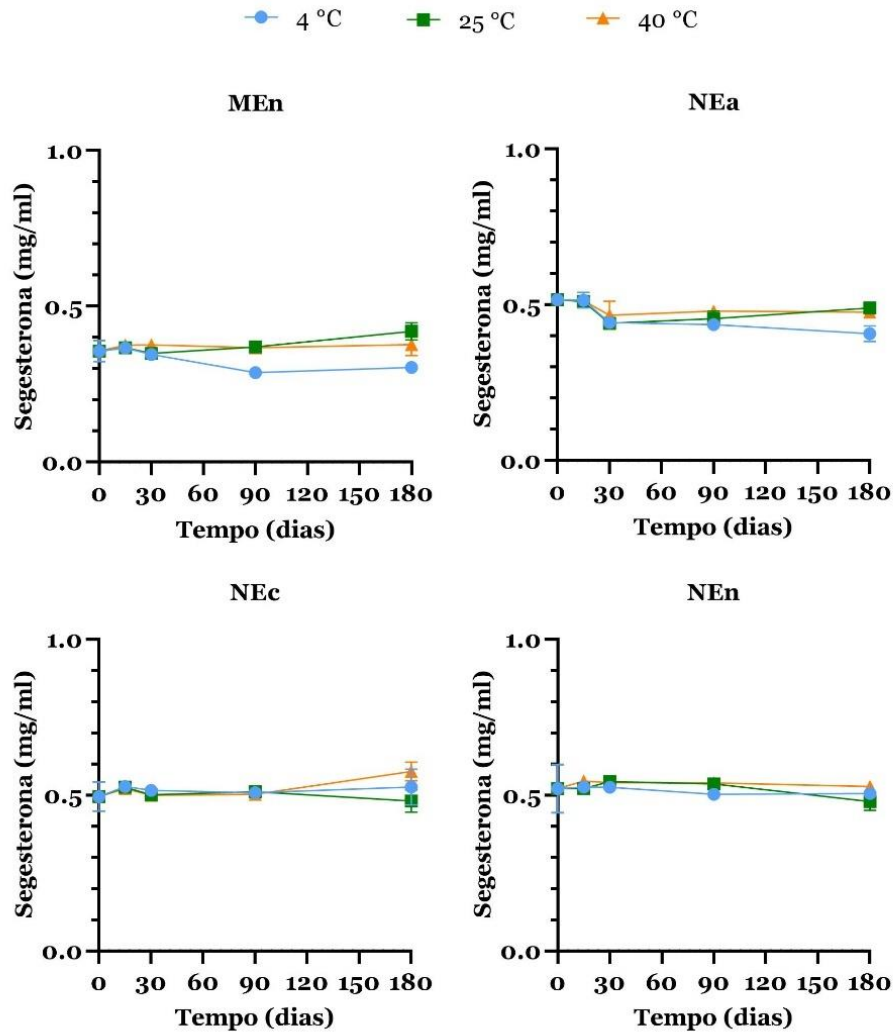


Figura 6. Concentração de AS ao longo do tempo usando as quatro formulações diferentes (ME, NEa, NEc e NEn). Os dados correspondem à média \pm desvio padrão. Três temperaturas de armazenamento foram testadas (4 °C, 25 °C e 40 °C) em diferentes pontos de te de tempo (0, 1, 7, 15, 30, 90 e 180 dias).

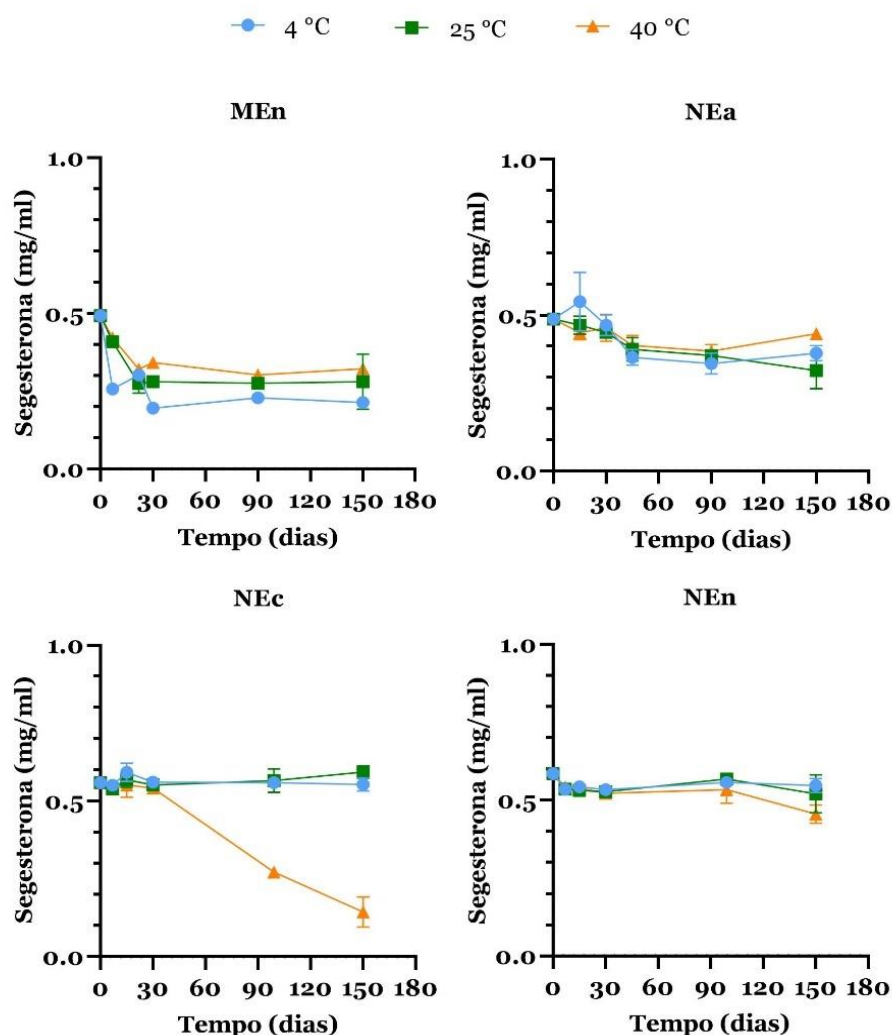


Figura 7. Concentração de AS ao longo do tempo usando as quatro formulações diferentes (ME, NEa, NEc e NEn). Os dados correspondem à média \pm desvio padrão. Três temperaturas de armazenamento foram testadas (4 °C, 25 °C e 40 °C) em diferentes pontos de tempo (0, 1, 7, 15, 30, 90 e 150 dias).

Sabe-se, devido à experiência anterior com o fármaco, que AS tem elevada estabilidade química, mesmo em meio aquoso. Contudo, foi possível verificar a ocorrência de precipitação ao fim de algum tempo na ME, de aspecto translúcido (30 dias a 4 °C no lote 1 e a partir dos 7 ou 15 no lote 2, de maior concentração inicial de fármaco, a todas as temperaturas). Esta precipitação demonstra o menor poder solubilizante da ME em comparação com a NE, e foi responsável pela redução do nível de fármaco quantificado na ME ao longo do tempo (Figura 5). Isto sugere que, no futuro, seria importante reduzir um pouco a concentração de fármaco adicionado ao pré-concentrado da ME, por exemplo para cerca de metade, ou diluir mais a preparação final se tal for possível (dependendo da dosagem que venha a ser estabelecida para se alcançarem efeitos terapêuticos). Realçar, contudo, que a ocorrência de precipitação seria mais difícil de detetar a olho nu nas NE devido à sua maior opacidade. Seja como for, precipitação ou incompatibilidade química,

houve uma ligeira redução da concentração do fármaco na NEa. Já nos primeiros lotes de NEc e de NEn, mesmo a 40 °C, a concentração de fármaco permaneceu estável ao longo do tempo. Contudo, houve uma clara diminuição da concentração de AS a 40 ° na NEc no lote 2, cuja causa não foi explicada. De qualquer forma, a preparação demonstrou ser estável quimicamente a 4 °C e a 25 °C. A diretriz da EMA ICH Q1E [53] estabelece uma tolerância máxima de 5% no conteúdo do fármaco a partir do seu valor inicial para ser considerado estável. A variação percentual da concentração de AS entre o final e o início do estudo foi calculada (Tabela 5). Contudo, o mesmo critério da tolerância de 5% é difícil de ser usado aqui devido a uma elevada variabilidade na quantificação das amostras (por vezes o coeficiente de variação, mesmo na quantificação da concentração inicial foi superior a 5%, em particular no lote 1) e às condições preliminares do estudo, bem como interferência da destabilização física. Assim, a principal conclusão foi que a 4 e 25 °C o AS apresentou a melhor estabilidade na NEc, e a NEn deverá provavelmente ser igualmente estável, pelo menos a 4 °C. No futuro deveria ser estudada microscopicamente a possível ocorrência de precipitação também nas NE. A redução da concentração inicial de AS, nesse caso, poderá resolver o problema de estabilidade observado.

Tabela 5. Variação da concentração do acetato de segesterona (AS) nas formulações armazenadas em diferentes condições de temperatura (4 °C, 25 °C e 40 °C) no início (t=0) e no final (lote 1 t=180 dias, lote 2 t=150 dias) do ensaio. As concentrações são apresentadas como média ± coeficiente de variação (CV). Os valores de CV e variação maiores (superiores a 9%) encontram-se realçados a negrito.

Formulação	T (°C)	AS (mg/mL) - Lote 1		Variação (%)	AS (mg/mL) - Lote 2		Variação (%)
		T=0	T=180 dias		T=0	T=150 dias	
ME	4		0,304 ± 4,3%	-14,7		0,213 ± 2,3%	-56,7
	25	0,357 ± 9,4%	0,373 ± 3,4%	4,6	0,493 ± 2,1%	0,306 ± 8,1%	-38,0
	40		0,374 ± 8,3%	4,9		0,316 ± 2,7%	-35,9
NEa	4		0,407 ± 6,3%	-21,1		0,379 ± 6,5%	-22,3
	25	0,516 ± 3,4%	0,490 ± 1,3%	-5,0	0,488 ± 1,7%	0,355 ± 4,4%	-27,3
	40		0,477 ± 2,5%	-7,6		0,441 ± 1,1%	-9,6
NEc	4		0,526 ± 4,2%	0,8		0,572 ± 6,3%	2,3
	25	0,496 ± 9,4%	0,501 ± 2,3%	1,0	0,559 ± 0,6%	0,593 ± 3,3%	6,1
	40		0,510 ± 0,4%	2,8		0,143 ± 34%	-74,4
NEn	4		0,505 ± 1,4%	-3,1		0,547 ± 4,1%	-6,5
	25	0,521 ± 14,9%	0,480 ± 5,9%	-7,9	0,585 ± 0,3%	0,486 ± 2,3%	-16,9
	40		0,528 ± 0,3%	1,3		0,456 ± 8,3%	-22,1

4.4 Ensaio de Libertação

Ensaios de libertação são importantes para prever de que forma o fármaco é libertado da formulação quando em contato com meio aquoso, como a mucosa nasal, deduzindo-se assim a quantidade de fármaco disponível para absorção quando administrado *in vivo*. Na figura 8 encontra-se representada a percentagem de libertação de AS ao longo do tempo a partir de quatro NE diferentes, diluídas em simulante de fluido nasal à concentração de 0,24 µg/mL. Simultaneamente foi usada uma solução de AS em Transcutol® HP (0,24 µg/mL) como controlo positivo, que libertou um máximo de 88,10%.

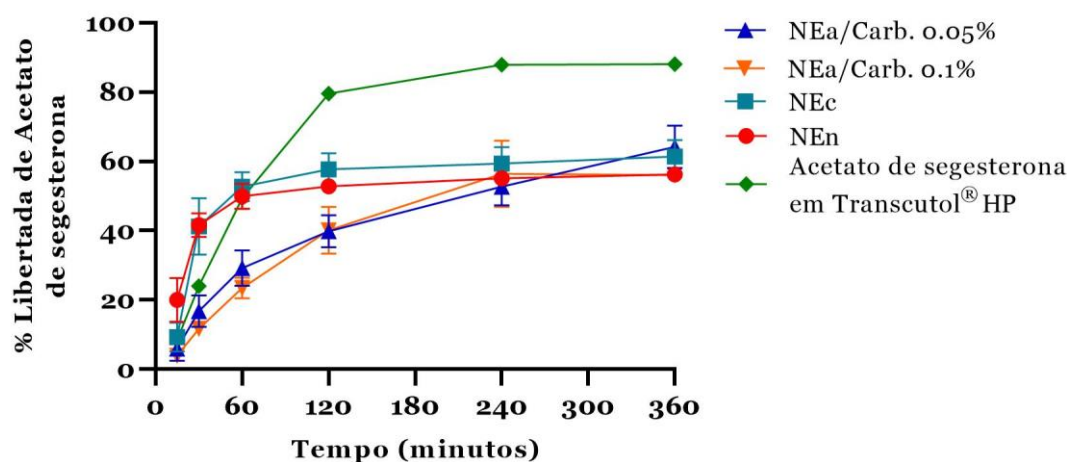


Figura 8. Perfil de libertação percentual de acetato de segesterona. As amostras foram tomadas entre 15 e 360 minutos. Quatro formulações diferentes (NEa/Carb.0.05%, NEa/Carb.0.1%, NEc e NEn) foram testadas, bem como uma solução de acetato de segesterona preparadas em Transcutol® HP.

A libertação de AS não foi completa em nenhuma das formulações testadas após 360 minutos, alcançando percentagens de libertação ao tempo final semelhantes (entre 50 e 60%). Apesar da percentagem de libertação final semelhante, a libertação foi mais rápida na NEn e na NEc do que nas NEa. Nos primeiros 30 minutos a NEn e NEc libertaram 42% e 41% respetivamente, comparadas com a NEa/Carb. 0.05% e NEa/Carb. 0.1%, que libertaram apenas 15% e 12%, respetivamente. A libertação a partir da NEn e da NEc começou a desacelerar, sendo de 49,47% e 53%, respetivamente aos 60 minutos, e 53% e 58%, respetivamente, aos 120 minutos. A NEa/Carb. 0.05% e a NEa/Carb. 0.1%, que apresentou um perfil de libertação de AS mais lento, nos primeiros 30 minutos do ensaio, libertaram 38% e 40 % aos 120 minutos vindo a atingir uma percentagem de libertação final semelhante às anteriores.

Várias hipóteses podem ser discutidas para explicar os perfis de libertação obtidos para as formulações. É descrito que a viscosidade pode afetar a libertação do fármaco, explicando a libertação mais lenta a partir das NE aniónicas, mais viscosas. No entanto, como as

formulações foram diluídas em tampão nasal, espera-se que a viscosidade seja baixa e não muito diferente entre as duas formulações aniônicas.

O AS tem potencialmente duas formas diferentes de passar pela membrana: pode ser transportada dentro das gotículas de óleo da NEa ou pode ser libertada das gotículas e passar livremente pela membrana. Devido à sua alta lipofilicidade, o AS tem maior probabilidade de ser solubilizada dentro das gotículas de óleo das nanoemulsões. Portanto, o tamanho e a homogeneidade das gotas também podem desempenhar um papel nos diferentes perfis de libertação. Nanoemulsões de menor tamanho e alta homogeneidade poderiam passar melhor pelos poros da membrana do que as gotas de nanoemulsões que têm tamanhos maiores e são ligeiramente mais heterogêneas, dificultando a passagem das gotas pela membrana.

4.5 Ensaios de Segurança *In Vitro*

Realizamos ensaios de segurança *in vitro* para avaliar possíveis problemas de toxicidade das formulações. O modelo *in vitro* MucilAir™ (Epithelix) (Figura 9), foi testado quanto à resistência elétrica transepitelial (TEER) a vários tempos (Figura 9A), à libertação de lactato desidrogenase (LDH) para o meio basal (Figura 9B) e à viabilidade celular pelo ensaio de redução da resazurina (Figura 9C).

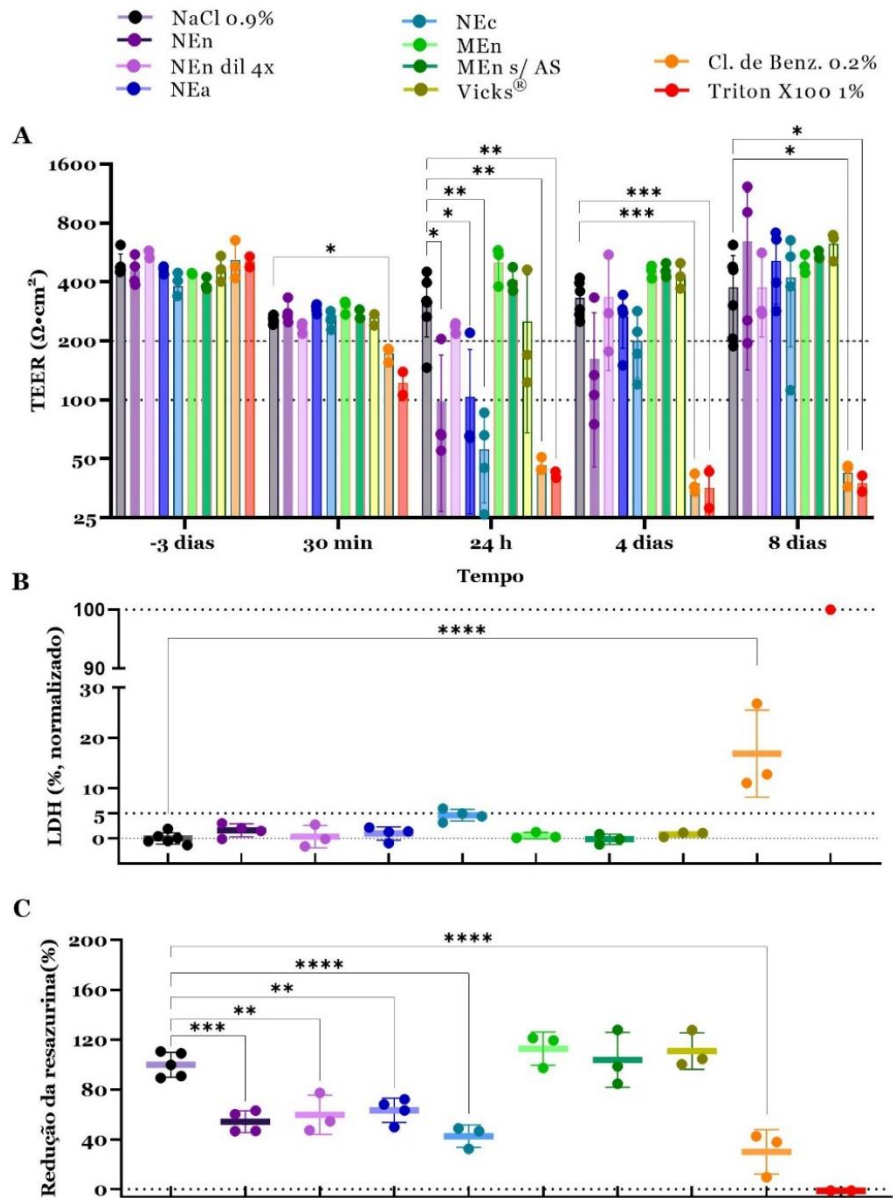


Figura 9. Resultados de segurança *in vitro* no modelo de mucosa nasal humana MucilAir™. A - Resistência transepitelial (TEER) medida a diferentes tempos, 3 dias antes do ensaio, 30 minutos, 24 h, 4 dias e 8 dias após aplicação das formulações. B - Resultados do ensaio da liberação de Lactato Desidrogenase (LDH) após a aplicação das formulações, expressos em percentagem do controlo positivo com Triton X100 1%. C - Viabilidade celular por redução da resazurina obtida imediatamente após o tratamento. Cl. de Benz., Cloreto de benzalcónio; Triton X100 1%; NEn (0,34mg/mL AS), NEn dil. 4X (0,135 mg/mL AS), NEa (0,44 mg/mL AS), NEc (0,43 mg/mL AS), ME s/ AS e ME (0,44 mg/mL AS). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. controlo negativo (solução salina).

Para uma correta interpretação dos resultados de TEER e do ensaio da LDH foi necessário ter em conta informação fornecida pelo fabricante (disponível no Anexo 1). As ME (com e sem AS) e o produto do mercado usado como referência (Vicks) originaram resultados semelhantes aos obtidos com o controlo negativo (solução salina), com TEER superiores a $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$, o que demonstra a elevada segurança das ME à concentração empregue. A NEn diluída não levou a uma alteração significativa do TEER, tendo o valor permanecido

superior a $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nem à libertação de LDH (inferior a 5%), mas afetou a redução da resazurina. As NEn e NEc impactaram o TEER às 24 horas, (valores inferiores a $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$) e a redução da resazurina, mas a mucosa pareceu recuperar, uma vez que o TEER voltou a valores normais (superiores a $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$) aos 4 ou 8 dias. A NEc pareceu ligeiramente mais tóxica que as anteriores, mas o epitélio também recuperou da diminuição acentuada do TEER provocada pela preparação. Todas as formulações foram claramente mais seguras que os controlos positivos usados, uma solução de cloreto de benzalcónio a 0,2% (10 vezes superior à empregue como conservante nas preparações nasais) e Triton X100 que liza claramente as células.

Capítulo 5

Conclusão

Apesar de terem sido selecionadas 4 estratégias de formulação com características de tamanho adequados quando da preparação, considerando os atributos avaliados, bem como a estabilidade, conclui-se que as melhores formulações foram a NEc armazenada à temperatura ambiente e a NEn com armazenamento refrigerado, sendo aceitável também a conservação à temperatura ambiente. A ME poderá ser considerada se se reduzir a concentração inicial de AG no pré-concentrado. O perfil de libertação do fármaco a partir destas formulações é também mais rápido embora, não tenha sido completo. Compreender as razões do perfil de libertação incompleta do acetato de segesterona usando as câmaras de Ussing horizontal é um tópico que precisa de mais estudo e otimização.

Relativamente à segurança, a maior segurança da ME já era esperada e foi confirmada. Todas as formulações foram mais seguras que os controlos positivos usados e permitiram a recuperação do TEER para valores normais. De facto, a NEn poderá ser suficientemente segura para administração nasal, dependendo da concentração que venha a ser necessário ser usada, em função da dose terapêutica que venha a ser estabelecida com este fármaco.

Concluindo, este trabalho permitiu demonstrar que, apesar de alguma otimização e mais estudos serem ainda necessários, tanto a ME (após otimização) como a NEn, em conjunto com administração intranasal, podem vir a ser uma boa estratégia para explorar as propriedades neuroprotetoras do acetato de segesterona no acidente vascular cerebral isquémico.

Referências

1. Correa-Paz, Clara, Andrés Da Silva-Candal, Ester Polo, Jérôme Parcq, Denis Vivien, Dusica Maysinger, Beatriz Pelaz, e Francisco Campos. 2021. “New Approaches in Nanomedicine for Ischemic Stroke.” *Pharmaceutics* 13 (5): 757. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050757>.
2. Amado, Beatriz, Lúcia Melo, Raquel Pinto, Andrea Lobo, Pedro Barros, e João R. Gomes. 2022. “Ischemic Stroke, Lessons from the Past towards Effective Preclinical Models.” *Biomedicines* 10 (10): 2561. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102561>.
3. Ntaios, George. 2020. “Embolic Stroke of Undetermined Source.” *Journal of the American College of Cardiology* 75 (3): 333–40. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.11.024>.
4. Gravanis, Iordanis, e Stella E Tsirka. 2008. “Tissue-Type Plasminogen Activator as a Therapeutic Target in Stroke.” *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 12 (2): 159–70. <https://doi.org/10.1517/14728222.12.2.159>.
5. Liu, Lifei, Liqin Zhao, Hongyun She, Shuhua Chen, Jun Ming Wang, Charisse Wong, Kelsey McClure, Regine Sitruk-Ware, e Roberta Diaz Brinton. 2010. “Clinically Relevant Progestins Regulate Neurogenic and Neuroprotective Responses in Vitro and in Vivo.” *Endocrinology* 151 (12): 5782–94. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0005>.
6. Cernigliaro, Massimiliano, Carmelo Stanca, Andrea Galbiati, Marco Spinetta, Carolina Coda, Davide Negroni, Domenico Laganà, et al. 2023. “Innovation in Acute Ischemic Stroke Patients over 80 y/o—A Retrospective Monocentric Study on Mechanical Thrombectomy of Consecutive Patients: Is Age an Adequate Selection Criterion?” *Journal of Clinical Medicine* 12 (11): 3688. <https://doi.org/10.3390/jcm12113688>.
7. Feigin, Valery L, Benjamin A Stark, Catherine Owens Johnson, Gregory A Roth, Catherine Bisignano, Gdiom Gebreheat Abady, Mitra Abbasifard, et al. 2021. “Global, Regional, and National Burden of Stroke and Its Risk Factors, 1990–2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019.” *The Lancet Neurology* 20 (10): 795–820. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00252-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00252-0).
8. Wafa, Hatem A., Charles D.A. Wolfe, Eva Emmett, Gregory A. Roth, Catherine O. Johnson, e Yanzhong Wang. 2020. “Burden of Stroke in Europe: Thirty-Year Projections of Incidence, Prevalence, Deaths, and Disability-Adjusted Life Years.” *Stroke* 51 (8): 2418–27. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.029606>.
9. Kuriakose, Diji, e Zhicheng Xiao. 2020. “Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives.” *International Journal of Molecular Sciences* 21 (20): 7609. <https://doi.org/10.3390/ijms21207609>.
10. Barthels, Derek, e Hiranmoy Das. 2020. “Current Advances in Ischemic Stroke Research and Therapies.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1866 (4): 165260. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.012>.

11. Montaña A, Hanley DF, Hemphill JC. 2021. "Hemorrhagic stroke". *Handb Clin Neurol*. 176:229-248. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64034-5.00019-5>.
12. Grysiewicz, Rebecca A., Kurian Thomas, e Dilip K. Pandey. 2008. "Epidemiology of Ischemic and Hemorrhagic Stroke: Incidence, Prevalence, Mortality, and Risk Factors." *Neurologic Clinics* 26 (4): 871–95. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2008.07.003>.
13. Datta, Aishika, Deepaneeta Sarmah, Leela Mounica, Harpreet Kaur, Radhika Kesharwani, Geetesh Verma, Pabbala Veeresh, et al. 2020. "Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy." *Translational Stroke Research* 11 (6): 1185–1202. <https://doi.org/10.1007/s12975-020-00806-z>.
14. Paul, Surojit, e Eduardo Candelario-Jalil. 2021. "Emerging Neuroprotective Strategies for the Treatment of Ischemic Stroke: An Overview of Clinical and Preclinical Studies." *Experimental Neurology* 335 (): 113518. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113518>.
15. Smith, Wade S. 2019. "Endovascular Stroke Therapy." *Neurotherapeutics* 16 (2): 360–68. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00724-5>.
16. Bevers, Matthew B., e W. Taylor Kimberly. 2017. "Critical Care Management of Acute Ischemic Stroke." *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine* 19 (6): 41. <https://doi.org/10.1007/s11936-017-0542-6>.
17. Norrving, Bo, Jon Barrick, Antoni Davalos, Martin Dichgans, Charlotte Cordonnier, Alla Guekht, Kursad Kutluk, et al. 2018. "Action Plan for Stroke in Europe 2018–2030." *European Stroke Journal* 3 (4): 309–36. <https://doi.org/10.1177/2396987318808719>.
18. Sitruk-Ware, Regine, Brooke Bonsack, Roberta Brinton, Michael Schumacher, Narender Kumar, Jea-Young Lee, Vanessa Castelli, et al. 2021. "Progress in Progestin-Based Therapies for Neurological Disorders." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 122 (3): 38–65. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.12.007>.
19. Zaheer, Zahid, Thompson Robinson, e Amit K. Mistri. 2011. "Thrombolysis in Acute Ischaemic Stroke: An Update." *Therapeutic Advances in Chronic Disease* 2, no. 2 (3): 119–31. <https://doi.org/10.1177/2040622310394032>.
20. Chen, Shuhua, Narender Kumar, Zisu Mao, Regine Sitruk-Ware, e Roberta Diaz Brinton. 2018. "Therapeutic Progestin Segesterone Acetate Promotes Neurogenesis: Implications for Sustaining Regeneration in Female Brain." *Menopause* 25 (10): 1138–51. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000001135>.
21. Lee, Jea-Young, Vanessa Castelli, Narender Kumar, Regine Sitruk-Ware, e Cesario V. Borlongan. 2022. "Contraceptive Drug, Nestorone, Enhances Stem Cell-Mediated Remodeling of the Stroke Brain by Dampening Inflammation and Rescuing Mitochondria." *Free Radical Biology and Medicine* 183 (4): 138–45. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.03.020>.
22. Zhu, Xiaoyan, Magalie Fréchou, Philippe Liere, Shaodong Zhang, Antoine Pianos, Neiké Fernandez, Christian Denier, Claudia Mattern, Michael Schumacher, e Rachida Guennoun. 2017. "A Role of Endogenous Progesterone in Stroke Cerebroprotection Revealed by the Neural-Specific Deletion of Its Intracellular

- Receptors.” *The Journal of Neuroscience* 37 (45): 10998–20. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3874-16.2017>.
23. Gizurarson, Sveinbjorn. 2012. “Anatomical and Histological Factors Affecting Intranasal Drug and Vaccine Delivery.” *Current Drug Delivery* 9 (6): 566–82. <https://doi.org/10.2174/156720112803529828>.
 24. Agrawal, Mukta, Swarnlata Saraf, Shailendra Saraf, Sophia G. Antimisiaris, Mahavir Bhupal Chougule, Sunday A. Shoyele, e Amit Alexander. 2018. “Nose-to-Brain Drug Delivery: An Update on Clinical Challenges and Progress towards Approval of Anti-Alzheimer Drugs.” *Journal of Controlled Release* 281 (7): 139–77. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.011>.
 25. Lee, David, e Tamara Minko. 2021. “Nanotherapeutics for Nose-to-Brain Drug Delivery: An Approach to Bypass the Blood Brain Barrier.” *Pharmaceutics* 13 (12): 2049. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122049>.
 26. Montegiove, Nicolò, Eleonora Calzoni, Carla Emiliani, e Alessio Cesaretti. 2022. “Biopolymer Nanoparticles for Nose-to-Brain Drug Delivery: A New Promising Approach for the Treatment of Neurological Diseases.” *Journal of Functional Biomaterials* 13 (3): 125. <https://doi.org/10.3390/jfb13030125>.
 27. Hong, Soon-Seok, Kyung Taek Oh, Han-Gon Choi, e Soo-Jeong Lim. 2019. “Liposomal Formulations for Nose-to-Brain Delivery: Recent Advances and Future Perspectives.” *Pharmaceutics* 11 (10): 540. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11100540>.
 28. Marcello, Elena, e Valeria Chiono. 2023. “Biomaterials-Enhanced Intranasal Delivery of Drugs as a Direct Route for Brain Targeting.” *International Journal of Molecular Sciences* 24 (4): 3390. <https://doi.org/10.3390/ijms24043390>.
 29. Costa, C., J.N. Moreira, M.H. Amaral, J.M. Sousa Lobo, e A.C. Silva. 2019. “Nose-to-Brain Delivery of Lipid-Based Nanosystems for Epileptic Seizures and Anxiety Crisis.” *Journal of Controlled Release* 295 (February): 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.049>.
 30. Bonferoni, Maria, Silvia Rossi, Giuseppina Sandri, Franca Ferrari, Elisabetta Gavini, Giovanna Rassu, e Paolo Giunchedi. 2019. “Nanoemulsions for ‘Nose-to-Brain’ Drug Delivery.” *Pharmaceutics* 11 (2): 84. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11020084>.
 31. Gibaud, Stéphane, and David Attivi. 2012. “Microemulsions for Oral Administration e Their Therapeutic Applications.” *Expert Opinion on Drug Delivery* 9 (8): 937–51. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.694865>.
 32. Moghimipour, Eskandar, Anayatollah Salimi, e Soroosh Eftekhari. 2013. “Design and Characterization of Microemulsion Systems for Naproxen.” *Text/html. Advanced Pharmaceutical Bulletin; eISSN 2251-7308*. <https://doi.org/10.5681/APB.2013.011>.
 33. Froelich, Anna, Tomasz Osmalek, Barbara Jadach, Vinam Puri, e Bozena Michniak-Kohn. 2021. “Microemulsion-Based Media in Nose-to-Brain Drug Delivery.” *Pharmaceutics* 13 (2): 201. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020201>.
 34. Constantinides, Panayiotis P., Gus Welzel, Harma Ellens, Philip L. Smith, Sandra Sturgis, Seang H. Yiv, e Albert B. Owen. 1996. “Water-in-oil Microemulsions

- Containing Medium-chain Fatty Acids/salts: Formulation and Intestinal Absorption Enhancement evaluation. *Pharmaceutical Research* 13 (2): 210–15. <https://doi.org/10.1023/A:1016030812272>.
35. Callender, Shannon P., Jessica A. Mathews, Katherine Kobernyk, e Shawn D. Wettig. 2017. “Microemulsion Utility in Pharmaceuticals: Implications for Multi-Drug Delivery.” *International Journal of Pharmaceutics* 526 (1–2): 425–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.005>.
 36. McClements, David Julian. 2012. “Nanoemulsions versus Microemulsions: Terminology, Differences, e Similarities.” *Soft Matter* 8 (6): 1719–29. <https://doi.org/10.1039/C2SM06903B>.
 37. Souto, Eliana B., Amanda Cano, Carlos Martins-Gomes, Tiago E. Coutinho, Aleksandra Zielińska, e Amélia M. Silva. 2022. “Microemulsions e Nanoemulsions in Skin Drug Delivery.” *Bioengineering* 9 (4): 158. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9040158>.
 38. Ait-Touchente, Zouhair, Nadia Zine, Nicole Jaffrezic-Renault, Abdelhamid Errachid, Nouredine Lebaz, Hatem Fessi, e Abdelhamid Elaissari. 2023. “Exploring the Versatility of Microemulsions in Cutaneous Drug Delivery: Opportunities and Challenges.” *Nanomaterials* 13 (10): 1688. <https://doi.org/10.3390/nano13101688>.
 39. Pavoni, Lucia, Diego Romano Perinelli, Giulia Bonacucina, Marco Cespi, e Giovanni Filippo Palmieri. 2020. “An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability.” *Nanomaterials* 10 (1): 135. <https://doi.org/10.3390/nano10010135>.
 40. Talianu, Marina-Theodora, Cristina-Elena Dinu-Pîrvu, Mihaela Violeta Ghica, Valentina Anuța, Viorel Jinga, e Lăcrămioara Popa. 2020. “Foray into Concepts of Design and Evaluation of Microemulsions as a Modern Approach for Topical Applications in Acne Pathology.” *Nanomaterials* 10 (11): 2292. <https://doi.org/10.3390/nano10112292>.
 41. Demisli, Sotiria, Evgenia Mitsou, Vasiliki Pletsas, Aristotelis Xenakis, e Vassiliki Papadimitriou. 2020. “Development and Study of Nanoemulsions e Nanoemulsion-Based Hydrogels for the Encapsulation of Lipophilic Compounds.” *Nanomaterials* 10 (12): 2464. <https://doi.org/10.3390/nano10122464>.
 42. Gupta, Ankur, H. Burak Eral, T. Alan Hatton, e Patrick S. Doyle. 2016. “Nanoemulsions: Formation, Properties e Applications.” *Soft Matter* 12 (11): 2826–41. <https://doi.org/10.1039/C5SM02958A>.
 43. Liu, Huang, Chen, Lin, e Wang. 2019. “Food-Grade Nanoemulsions: Preparation, Stability e Application in Encapsulation of Bioactive Compounds.” *Molecules* 24 (23): 4242. <https://doi.org/10.3390/molecules24234242>.
 44. McClements, David Julian, e Jiajia Rao. 2011. “Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, e Potential Toxicity.” *Critical Reviews in Food Science e Nutrition* 51 (4): 285–330. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.559558>.
 45. McClements, David J., Jochen Weiss, e Maria G. Corradini. 2020. “Lipid Emulsions.” In *Bailey’s Industrial Oil and Fat Products*, edited by Fereidoon Shahidi, 1.^a ed., 1–40. Wiley. <https://doi.org/10.1002/047167849X.bio019.pub2>.

46. Jafari, Seid Mahdi, e David Julian McClements, eds. 2018. *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization*. London San Diego, CA Cambridge, MA Oxford: AP, Academic Press, an imprint of Elsevier.
47. Friberg, Stig, Kåre Larsson, e Johan Sjöblom, eds. 2004. *Food Emulsions*. 4th ed., rev.Expanded. *Food Science and Technology* 132. New York: Marcel Dekker.
48. McClements, David Julian, e Jiajia Rao. 2011. "Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51(4):285–330. doi: 10.1080/10408398.2011.559558.
49. Francisco Gama Souza. 2022. "Intranasal Administration of Simvastatin for Neuroprotection - Development of Micro and Nanoemulsions for Intranasal Delivery of Simvastatin in Ischemic Stroke." *Mestre em Ciências Biomédicas, Covilhã, Portugal: Universidade da Beira Interior*. <http://hdl.handle.net/10400.6/12470>.
50. Lindemann, Joerg, Tilman Keck, Kerstin Wiesmiller, Bjoern Sander, Hans-Juergen Brambs, Gerhard Rettinger, e Daniela Pless. 2004. "A Numerical Simulation of Intranasal Air Temperature During Inspiration." *The Laryngoscope* 114 (6): 1037–41. <https://doi.org/10.1097/00005537-200406000-00015>.
51. Drugbank. 2023. "Segesterone Acetate." <https://go.drugbank.com/drugs/DB14583>.
52. Pires, Patrícia C., Mariana Fernandes, Francisca Nina, Francisco Gama, Maria F. Gomes, Lina E. Rodrigues, Sara Meirinho, Samuel Silvestre, Gilberto Alves, e Adriana O. Santos. 2023. "Innovative Aqueous Nanoemulsion Prepared by Phase Inversion Emulsification with Exceptional Homogeneity." *Pharmaceutics* 15 (7): 1878. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071878>.
53. EMA. Note For Guidance on Evaluation of Stability Data (CPMP/ICH/420/02). Ema. 2003;(August 2002):1–17.

Anexos

Tabela A1– Critérios para interpretação dos resultados obtidos com o modelo MucilAir™ (Epithelix, comunicação escrita).

TEER ($\Omega\cdot\text{cm}^2$)	LDH (%)	O que é espectável ter acontecido:
>200	< 5	Tecido saudável
>200	>5	Sinais precoces de toxicidade; Se TEER >1500-2000, pode representar uma alteração na funcionalidade dos canais iónicos
[100-200]	< 5	Ativação excessiva dos canais iónicos
[100-200]	>5	Sinais precoces de toxicidade.
<100	>5	Sinal claro de toxicidade, com perda da impermeabilidade do tecido.
<100	< 5	Dano no tecido (por exemplo, perfuração) ou morte do tecido (cessação da produção de LDH).