

**UFG/UFRGS/UFSC/USP-RP/UNESP-Ar/UFOP/UFRN/UFPE  
Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica  
Universidade Federal de Goiás**

**LEONARDO GOMES SOUZA**

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA  
SEGURANÇA DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS E POLIMÉRICAS  
CONTENDO O ANTIANGIOGÊNICO SUNITINIBE PARA APLICAÇÃO  
TÓPICA OCULAR: UM ESTUDO COMPARATIVO**

**Goiânia  
2014**

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**

### 2. Identificação da Tese ou Dissertação

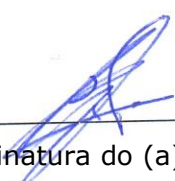
Nome completo do autor: Leonardo Gomes Souza

Título do trabalho: **Obtenção, caracterização e avaliação pré-clínica da segurança de nanopartículas lipídicas e poliméricas contendo o antiangiogênico sunitinibe para aplicação tópica ocular: um estudo comparativo**

### 3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do (a) autor (a) <sup>2</sup>

Data: 02/05/2023

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

**LEONARDO GOMES SOUZA**

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA  
SEGURANÇA DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS E POLIMÉRICAS  
CONTENDO O ANTIANGIOGÊNICO SUNITINIBE PARA APLICAÇÃO  
TÓPICA OCULAR: UM ESTUDO COMPARATIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica da UFG/UFRGS/UFMS/UFSC/USP-RP/UNESP-Ar/UFOP/UFRN/UFPE, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Nanotecnologia Farmacêutica.

Área de Concentração: Nanotecnologia Aplicada às Ciências Farmacêuticas

**Orientadora: Profa. Dra. Eliana Martins Lima**

**Goiânia  
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**GPT/BC/UFG**

S729o Souza, Leonardo Gomes.  
Obtenção, caracterização e avaliação pré-clínica da segurança de nanopartículas lipídicas e poliméricas contendo o antiangiogênico sunitinibe para aplicação tópica ocular [manuscrito]: um estudo comparativo / Leonardo Gomes Souza. - 2014.  
113 f. : il.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eliana Martins Lima.  
Tese (Doutorado) ó Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2014.

Bibliografia.

Inclui listas.

1. Fármacos 2. Nanopartículas lipídicas sólidas. 3. Vascularização corneana - medicamentos. I. Título.

CDU - 615:617.7

*A todos que não fazem dos seus objetivos motivos apenas para sonharem, mas que lutam e se esforçam para torná-los realidade.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Profa. Dra. Eliana Martins Lima, por sempre me instigar e levar a estudar mais com sua pergunta "vamos pensar?". Obrigado por todo aprendizado ao seu lado e por ser exemplo de determinação, foco e perseverança.

Aos colegas de laboratório Marcelo Vieira, Lívia Palmerston e Rafael Ducas pela colaboração na realização dos testes de irritação ocular.

Ao Jorge Luíz Vieira pela realização das análises de espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica.

À Bertilha Cintra, pelo auxílio na execução deste trabalho.

A todos da família FarmaTec, pelas discussões enriquecedoras no laboratório e pelos momentos de descontração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro concedido a este projeto.

*Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem 'Por  
quê?' Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo  
'Por que não?'*

*George Bernard Shaw*

## RESUMO

A vascularização corneana (VC) é uma causa comum de diminuição da acuidade visual e cegueira. O sunitinibe (SUB) é um fármaco antiangiogênico que têm demonstrado redução significativa da VC em coelhos. A incorporação do SUB em sistemas nanoestruturados pode aumentar sua retenção corneana e diminuir a resistência provocada pela glicoproteína-P e a conversão para o isômero inativo E(trans) quando o fármaco é exposto à luz. No presente trabalho, foram desenvolvidos lipossomas (LIPO), nanoesferas poliméricas (NE) e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo SUB. Os sistemas apresentaram tamanho de partícula entre 70 e 200 nm e Pdl abaixo de 0,3, assim como elevada eficiência de encapsulação. As NE apresentaram maior capacidade de incorporação do sunitinibe quando comparadas aos lipossomas e às NLS. Esse sistema apresentou carga de fármaco de 4,3% enquanto os LIPO e NLS apresentaram 2,87% e 1,66%, respectivamente. O perfil de liberação do sunitinibe foi diferente nos três sistemas desenvolvidos. Os lipossomas sustentaram a liberação do fármaco por período maior que o observado para as nanoesferas poliméricas e nanopartículas lipídicas sólidas. As NLS proporcionaram maior retenção corneana do SUB em comparação aos outros sistemas. No período de trinta minutos a retenção corneana do SUB a partir das NLS ( $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) foi mais que o dobro daquela observada para os lipossomas ( $6,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). As NE também apresentaram retenção corneana do SUB ( $12,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) superior aos lipossomas. Os estudos de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) comparando lipossomas e NLS demonstraram que nas NLS a organização dos lipídeos estruturais é mais fluida que os lipossomas. Esses estudos também indicaram que o SUB se localiza na bicamada lipídica dos lipossomas próximo à interface polar, aumentando o empacotamento dos fosfolipídeos e ocasionando aumento de rigidez da membrana. Nas NLS o fármaco também, provavelmente, está localizado na região próxima da interface, mas neste caso levando a um aumento da fluidez pela maior desorganização dos lipídeos. Esses resultados justificam o perfil de liberação mais rápido observado para o SUB a partir das NLS e também a maior retenção corneana do fármaco a partir desses nanosistemas. Empregando métodos alternativos ao uso de animais para a determinação da segurança das formulações, os três sistemas desenvolvidos não apresentaram potencial para irritação ocular nos testes de opacidade e permeabilidade em córneas de olhos bovinos (BCOP), na avaliação do potencial hemolítico e no teste em membrana corioalantóide de ovo de galinha (HET-CAM). Dentre os sistemas desenvolvidos neste trabalho as NLS contendo SUB apresentam maior potencial para aplicação clínica no tratamento da VC.

Palavras-chave: Vascularização Corneana. Sunitinibe. Nanopartículas lipídicas sólidas. Lipossomas. Nanoesferas poliméricas. Ensaio pré-clínicos de segurança.

## ABSTRACT

Corneal vascularization (CV) is a common cause of visual impairment and blindness. Sunitinib (SUB) is an antiangiogenic agent that has demonstrated a significant reduction of VC in rabbits. Incorporation of SUB in nanosystems can increase your corneal retention and decrease P-glycoprotein resistance and it conversion to inactive isomer E (trans) when the drug is exposed to light. In this work, liposomes (LIPO), polymeric nanospheres (NE) and solid lipid nanoparticles (SLN) containing SUB was developed. Systems presented particle size between 70 and 200 nm and Pdl below 0.3 and a high encapsulation efficiency. NE had a greater capacity to incorporate sunitinib when compared to liposomes and SLN. This system had drug loading of 4.3% while LIPO and SLN showed 2.87% and 1.66%, respectively. Release profile of sunitinib was different in three developed systems. Liposomes sustained drug release greater than that observed for the polymer nanospheres and solid lipid nanoparticles in the same period. SLN showed higher corneal retention of SUB when compared to other systems. Within thirty minutes corneal retention of SUB from SLN ( $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) was more than twice that observed for liposomes ( $6.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). NE also showed corneal retention of SUB ( $12.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) superior to liposomes. Spectroscopic studies of electron paramagnetic resonance (EPR) comparing liposomes and SLN demonstrated that SLN are more flexible than liposomes. These studies also indicated that sub is located in the lipid bilayer of liposomes near the phospholipid-water interface, leading to increased rigidity. In SLN the drug is also probably located near the lipid-water interface, altering the crstaline organiation of the lipids and increased fluidity. These results justify the faster release profile observed for SUB from SLN and higher corneal retention of drug from these nanosystems. Employing alternative methods to the use of animals for determining the safety of the formulations, all three formulations developed showed no potential for ocular irritation in tests of bovine corneal opacity and permeability test method (BCOP), in the evaluation of hemolytic potential and in the test in chorioallantoic membrane of chicken egg (HET-CAM). Among the systems developed in this work containing SUB, SLN seems to present a greatest potential for clinical application in the treatment of VC.

Keywords: Corneal vascularization. Sunitinib. Solid lipid nanoparticles. Liposomes. Polymeric nanospheres. Preclinical safety testing.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura anatômica do olho. Segmento anterior: corpo ciliar, córnea, pupila, íris, cristalino e humor aquoso. Segmento posterior: humor vítreo, nervo óptico, retina e coróide. Fonte: Nucleus Medica Media, 2013..... 18
- Figura 2** - Barreiras para liberação tópica ocular de fármacos. (A) Filme lacrimal: a alta taxa de renovação do filme e a camada mucosa fazem do filme lacrimal uma barreira para liberação tópica ocular de fármacos. (B) Barreira corneana: a junções estreitas entre as células epiteliais e cinco camadas com polaridades alternadas fazem da córnea uma barreira para liberação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos. Fonte: adaptado de Gan e colaboradores (2013)..... 20
- Figura 3** - Comparação entre a membrana corioalantóide de embrião de galinha (A) e olho humano (B). Fonte: VIEIRA, 2014. .... 23
- Figura 4** - (A) Diferenciação entre tensoativos de cadeia simples e fosfolipídeos de cadeia dupla. Os tensoativos de cadeia simples possuem forma cônica e em meio aquoso tendem a formar micelas. Fosfolipídeos de cadeia dupla em meio aquoso tendem a formar bicamadas lipídicas. (B) Estrutura do fosfolipídeo: cabeça polar e cauda apolar. Diferenciação entre vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares grandes (LUV). Adaptado de Produção de Lipossomas. Disponível em: <http://www.avantilipids.com>, acesso em 04 de novembro de 2013..... 28
- Figura 5** - Produção de lipossomas por hidratação do filme lipídico. A - Produção de vesículas multilamelares (MLV): produção do filme lipídico seguida de hidratação com meio aquoso e agitação. B e C - produção de vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas unilamelares pequenas (SUV) por sonicação, extrusão e homogeneização das MLV. Adaptado de Produção de Lipossomas. Disponível em: <http://www.avantilipids.com>, acesso em 04 de novembro de 2013 ..... 29
- Figura 6**- Esquema representativo de nanoemulsão (A) e nanopartícula lipídica sólida (B). Fonte: adaptado de Müller et al, 2000 ..... 31
- Figura 7**- Interação entre nanocarreadores lipídicos e filme lacrimal. (a) Após a instilação a fase contínua (aquosa) do sistema se incorpora à camada aquosa do filme, aumentando a hidratação corneana. (b) O lipídeo, depois de liberar o fármaco encapsulado, pode-se unir à camada lipídica do filme lacrimal, diminuindo a perda por evaporação da camada aquosa. (c) Tensoativos podem aumentar a permeação do fármaco. Adaptado de Gan e colaboradores (2013) ..... 33
- Figura 8** - Esquema representativo da inserção de sondas paramagnéticas em nanopartículas lipídicas sólidas e lipossomas. Dependendo da posição do grupo paramagnético na cauda hidrofóbica da sonda ele estará localizado mais próximo da superfície da partícula ou em uma região mais interna. .... 34
- Figura 9** - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas. Nanocápsulas: formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso. O fármaco pode estar dissolvido no núcleo ou adsorvido à parede

polimérica. Nanoesferas: formadas por uma matriz polimérica onde o fármaco pode estar retido ou adsorvido. Fonte: adaptado de Oliveira e colaboradores (2012). ..... 36

**Figura 10** - Vascularização corneana. a: fotografia de lâmpada de fenda de paciente com vascularização corneana. b: visão ampliada da vascularização corneana. Fonte: (KEATING;JACOBS, 2011)..... 38

**Figura 11**- Estrutura química do sunitinibe. Estereoisômeros Z(cis) e E(trans). Massa molar: 398,47 g/mol; LogP: 2,5; pKa: 9,3.(REMKO; BOHAC; KOVACIKOVA, 2011) ..... 40

**Figura 12**- Mecanismo de ação do sunitinibe. A: O sunitinibe é um inibidor de múltiplas tirosina quinases ligadas ao receptor (TKR) que interage com os domínios TK intracelulares dos receptores do fator de crescimento endotelial e vascular (VEGFR), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial (RET). B: Os domínios TK intracelulares autofosforilam quando um ligante liga-se ao domínio extracelular. O sunitinibe compete com a adenosina trifosfato pelo sitio de ativação do domínio TK e impede sua autofosforilação, impedindo consequentemente a cascata de ativação que leva a estimulação dos sinais angiogênicos, proliferação celular e outros. CSF1 r: receptor do fator 1 de estimulação de colônias; P: fosforilação. Fonte: adaptado de (ADAMS;LEGGAS, 2007). ..... 41

**Figura 13** - Modelo esquemático da produção de lipossomas por hidratação do filme lipídico seguida de extrusão. Fonte: GAETI, 2011. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 14** - Modelo esquemático da produção de nanopartículas lipídicas sólidas pela técnica de emulsificação / evaporação de solvente. Fonte: OLIVEIRA, 2013. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 15** - Modelo esquemático da produção de nanoesferas pela técnica emulsificação/evaporação de solvente. Fonte: adaptado de OLIVEIRA, 2013. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 16** - Estruturas químicas das sondas paramagnéticas, 16-DSA e 5DSA.. **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 17** . Célula de fluxo estático tipo Franz. Fonte: Adaptado do manual Microette, Hanson Research..... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 18** . Células de fluxo estático tipo Franz acopladas em equipamento de coleta automatizada, Hanson Research. Fonte: Manual Microette, Hanson Research. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 19** - Modelo esquemático da permeação corneana. A - olho de porco após enucleação. B - córnea sendo extraída do olho de porco. C - córneas extraídas com pequeno excesso de esclera. D - córnea colocada sobre o compartimento receptor da célula de fluxo estático tipo "Franz" modificada. E - célula de fluxo estático tipo "Franz" modificada montada para o experimento. Córnea colocada entre compartimento doador e receptor. F - excesso de esclera sendo retirado da córnea para subsequente processo de extração do fármaco. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 20** - Modelo esquemático do teste de opacidade e permeabilidade em córneas (BCOP). A - Excisão da córnea. B - Acoplamento da córnea ao *holder* e montagem do *holder*. C- *Holder* montado pronto para o experimento. Acesso às câmaras com seringa e agulha. D - Opacitômetro. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 21** - Modelo esquemático do teste em membrana corioalantóide de ovos de galinha (HET-CAM). A - Incubadora de ovos. B - Delimitação da câmara de ar interna. Casca sendo retirada. C - Exposição da membrana corioalantóide. Aplicação das amostras. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 22** . Perfil cromatográfico do sunitinibe e seu isômero E(trans) obtido por CLAE-PDA (  $\lambda = 433$  nm) utilizando coluna C18 (100x4,6 mm, 3,5  $\mu$ m), fase móvel TAA:ACN na razão de 72:28, com fluxo de 1,5 mL/min... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 23** - Perfil cromatográfico do sunitinibe e seu isômero E(trans), e das formulações brancas de lipossomas, nanoesferas e nanopartículas lipídicas sólidas após sofrerem processo para extração de fármaco total com metanol. Perfil cromatográfico obtido por CLAE-PDA (  $\lambda = 433$  nm) utilizando coluna C18 (100x4,6 mm, 3,5  $\mu$ m), fase móvel TAA:ACN na razão de 72:28, com fluxo de 1,5 mL/min. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 24** . Curva de calibração do sunitinibe.  $r = 0,9994$ **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 25** - Fotoestabilidade de bancada do sunitinibe. Fármaco exposto à luz direta do laboratório, protegido em frascos âmbar ou envolvido com papel alumínio.....**Erro! Indicador não definido.**

**Figura 26** - Perfil cromatográfico do sunitinibe e seu isômero E(trans) após 15 minutos e 72 horas do estudo de fotoestabilidade de bancada, com amostras expostas à luz fluorescente, obtido por CLAE-PDA (  $\lambda = 433$  nm) utilizando coluna C18 (100x4,6 mm, 3,5  $\mu$ m), fase móvel TAA:ACN na razão de 72:28, com fluxo de 1,5 mL/min..... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 27** - Distribuição de tamanho das nanoesferas de sunitinibe em função da intensidade de espalhamento de luz. Formulações NE1, NE2 e NE3.**Erro! Indicador não definido.**

**Figura 28** - Fotomicrografias obtidas ao microscópio óptico. A -Cristais de sunitinibe dispersos em água. B - Cristais de sunitinibe presentes na formulação NE3. Aumento de 400x ..... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 29** - Eficiência de encapsulação e carga de fármaco das formulações de lipossomas: LIPO1, LIPO2 e LIPO3..... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 30** - Distribuição de tamanho das nanopartículas lipídicas sólidas contendo sunitinibe em função da intensidade de espalhamento de luz. Formulações NLS1, NLS2, NLS3, NLS4 e NLS5. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 31** - Eficiência de encapsulação das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas: NLS1, NLS2, NLS3, NLS4 e NLS5. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 32** - Distribuição de tamanho em função da intensidade de espalhamento de luz das formulações LIPO2, NE1 e NLS5..... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 33** - Carga de fármaco das formulações NLS5, LIPO2 e NE1.**Erro! Indicador não definido.**

**Figura 34** - Espectros de RPE experimentais (linhas pretas) e de melhor-ajuste (linhas vermelhas) para os marcadores 5-DSA (a, b, e, f) e 16-DSA (c, d, g, h) incorporados em lipossomas (coluna direita) e em NLS (coluna esquerda), contendo ou não Sunitinibe. Os valores da média (N=3) do tempo de correlação rotacional ( $\tau_c$ ), obtido através da simulação dos espectros, estão indicados. O erro experimental estimado de  $\tau_c$  é 0,2 ns. O campo total de varredura foi igual a 100 G. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 35** - Comparação dos perfis de liberação *in vitro* do sunitinibe, em fluido lacrimal simulado, a partir das formulações NE1, LIPO2 e NLS5**Erro! Indicador não definido.**

**Figura 36** - Perfil cromatográfico do sunitinibe e seu produto de fotodegradação, do metanol e das amostras de córneas após processo de extração com metanol. Perfil cromatográfico obtido por CLAE-PDA ( =433 nm) utilizando coluna C18 (100x4,6 mm, 3,5  $\mu$ m), fase móvel TAA:ACN na razão de 72:28, com fluxo de 1,5 mL/min. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 37** - Sunitinibe retido nas córneas em trinta minutos e uma hora após aplicação das formulações NLS5, NE1 e LIPO2. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 38** - Imagens capturadas do teste em membrana corioalantóide de ovos de galinha (HET-CAM). Coluna A - antes da aplicação das amostras. Coluna B - após aplicação das amostras..... **Erro! Indicador não definido.**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
BCOP	Teste de Opacidade e Permeabilidade em Córneas de Olhos Bovinos
CF%	Carga de Fármaco
CAM	Membrana Corioalantóide
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLN	Carreador Lipídico Nanoestruturado
DMM	Diluição de Microemulsão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EE%	Eficiência de Encapsulação
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
Fe	Fármaco Encapsulado
FLS	Fluido Lacrimal Simulado
Ft	Fármaco Total
HET-CAM	Teste em Membrana Corioalantóide de Ovo de Galinha
LIPO	Lipossomas
LUV	Vesículas Unilamelares Grandes
MG	Monoestearato de Glicerila
MLV	Vesículas Multilamelares
NE	Nanoesferas poliméricas
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
NP	Nanopartículas Poliméricas

NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
PC	Fosfatidilcolina
PCL	Poli ( -caprolactona)
PDA	Arranjo de Fotodiodos
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PDGFR	Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PdI	Índice de Polidispersividade
PFGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
P-gp	Glicoproteína-P
PLA	Poli (ácido lático)
PLGA	Poli (ácido lático-co-ácido glicólico)
PVDF	Difluoreto de Polivinilideno
Rd%	Rendimento
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
SUB	Sunitinibe
SUV	Vesículas Unilamelares Pequenas
TAA	Trietilamina
TES	N-tris[hidroximetil]metil-2-aminoetano sulfonato
TKR	Tirosina-Quinase ligada ao Receptor
VC	Vascularização Corneana
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial e Vascular
VEGFR	Receptor do Fator de Crescimento Endotelial e Vascular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1 OLHO: ANATOMIA, FISIOLOGIA E APLICAÇÃO TÓPICA DE FÁRMACOS .....	18
<b>2.1.1 Avaliação da toxicidade ocular</b> .....	21
2.2 EMPREGO DA NANOTECNOLOGIA NO DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA APLICAÇÃO TÓPICA OCULAR DE FÁRMACOS.....	24
<b>2.2.1 Sistemas Lipídicos</b> .....	27
2.2.1.1 Lipossomas.....	27
2.2.1.2 Nanopartículas lipídicas sólidas.....	31
2.2.1.3 Avaliação da dinâmica de sistemas lipídicos por espectroscopia de RPE .....	33
<b>2.2.3 Nanopartículas poliméricas</b> .....	35
2.3 APLICAÇÃO DA NANOTECNOLOGIA NO TRATAMENTO DA VASCULARIZAÇÃO CORNEANA.....	37
2.4 SUNITINIBE.....	40
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	43
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1 MATERIAL.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>4.1.1 Substâncias e reagentes</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>4.1.2 Equipamentos e utensílios diversos</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>4.2.1 Quantificação do sunitinibe por cromatografia líquida de alta eficiência</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>4.2.2 Validação da metodologia analítica</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.2.1 Seletividade .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.2.2 Linearidade .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.2.3 Limite de quantificação.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.2.4 Precisão e Exatidão.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.3 FOTOESTABILIDADE DE BANCADA.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

4.4 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO SUNITINIBE.....	Erro!
Indicador não definido.	
4.4.1 Preparação dos lipossomas contendo sunitinibe	Erro! Indicador não definido.
4.4.2 Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas contendo sunitinibe	Erro! Indicador não definido.
4.4.3 Preparação das nanoesferas contendo sunitinibe	Erro! Indicador não definido.
4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	Erro! Indicador não definido.
4.5.1 Avaliação da distribuição de tamanho por espalhamento dinâmico de luz	Erro! Indicador não definido.
4.5.2 Avaliação do Potencial Zeta .....	Erro! Indicador não definido.
4.5.3 Contagem de nanopartículas por rastreamento ( <i>Nanoparticle tracking analysis</i> )	Erro! Indicador não definido.
4.5.4 Análise da eficiência de encapsulação do sunitinibe	Erro! Indicador não definido.
4.5.5 Carga de Fármaco .....	Erro! Indicador não definido.
4.5.6 Rendimento .....	Erro! Indicador não definido.
4.5.7 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).....	Erro! Indicador não definido.
4.6 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO CORNEANA	Erro! Indicador não definido.
4.6.1 Estudo de solubilidade .....	Erro! Indicador não definido.
4.6.2 Perfil de liberação <i>in vitro</i> .....	Erro! Indicador não definido.
4.6.3 Extração do fármaco a partir da matriz corneana: recuperação e seletividade frente a interferentes da matriz biológica	Erro! Indicador não definido.
4.6.4 Permeação corneana <i>ex vivo</i> .....	Erro! Indicador não definido.
4.7 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA OCULAR DOS NANOSSISTEMAS DESENVOLVIDOS.....	Erro! Indicador não definido.
4.7.1 BCOP - Teste de opacidade e permeabilidade em córneas de olhos bovinos .....	Erro! Indicador não definido.
4.7.2 HET-CAM: Teste com ovo de galinha em membrana corioalantóide	Erro! Indicador não definido.
4.7.3 Potencial Hemolítico .....	Erro! Indicador não definido.
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	Erro! Indicador não definido.
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	Erro! Indicador não definido.
5.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA .....	Erro! Indicador não definido.
5.1.1 Quantificação do sunitinibe por cromatografia líquida de alta eficiência	Erro! Indicador não definido.
5.1.2 Validação da metodologia analítica .....	Erro! Indicador não definido.
5.1.2.1 Seletividade .....	Erro! Indicador não definido.

5.1.2.2 Linearidade .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.2.3 Precisão e exatidão .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.2.4 Limite de quantificação.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.2 FOTOESTABILIDADE DE BANCADA.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO SUNITINIBE .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.4 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO CORNEANA	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.4.1 Estudo de Solubilidade e verificação da condição <i>sink</i>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.4.2 Perfil de liberação <i>in vitro</i> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.4.3 Extração do fármaco a partir da matriz corneana: recuperação e seletividade frente a interferentes da matriz biológica	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.4.4 Permeação corneana <i>ex vivo</i> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.5 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA OCULAR DOS NANOSSISTEMAS DESENVOLVIDOS.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>96</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>98</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A vascularização corneana (VC) é uma causa comum de diminuição da acuidade visual e cegueira (GONZALEZ et al., 2013; PAPATHANASSIOU et al., 2013). Ela é causada por uma variedade de doenças oculares que levam ao desequilíbrio entre estímulos angiogênicos e antiangiogênicos, induzindo a superexpressão de fatores pró-angiogênicos. Os vasos formados na córnea podem bloquear a luz, comprometer a acuidade visual, levar ao desenvolvimento de inflamações, cicatrizes corneanas, edema e nos casos mais graves à cegueira (CHANG et al., 2012).

O tratamento da VC pode ser realizado com esteróides, antiinflamatórios não esteroides (AINES), terapia fotodinâmica, fotocoagulação a laser e inibidores do fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF). Grande parte da terapia medicamentosa é realizada através da aplicação tópica de soluções oftalmológicas (colírios) (KEATING; JACOBS, 2011).

Devido a sua simplicidade, segurança e aceitabilidade por parte dos pacientes, os colírios respondem por cerca de 90% das formulações comerciais disponíveis para tratamento de afecções oculares. Contudo, a complexa estrutura do globo ocular, que inclui algumas barreiras à absorção de fármacos, limita a biodisponibilidade de muitos compostos (GAN et al., 2013). Após a instilação de um colírio, geralmente menos de cinco por cento do fármaco aplicado penetra a córnea e alcança os tecidos intraoculares (JARVINEN; JARVINEN; URTTI, 1995).

Diante disso, o principal objetivo da terapia ocular consiste em manter uma concentração efetiva de fármaco no sítio de ação por período de tempo apropriado, objetivando-se alcançar o efeito farmacológico (DU TOIT et al., 2011). O uso de nanosistemas tem atraído atenção como forma de aumentar a biodisponibilidade de fármacos administrados topicamente (HIRONAKA et al., 2009). Esses sistemas apresentam vantagens na aplicação tópica ocular de fármacos, como a proteção do composto encapsulado facilitando seu transporte a diferentes regiões oculares, liberação alvo específica de composto bioativos, aumento da biodisponibilidade de fármacos insolúveis, liberação controlada e redução de efeitos colaterais (SAHOO; DIINAWAZ; KRISHNAKUMAR, 2008; DU TOIT et al., 2011; GAN et al., 2013). Os nanocarreadores ainda podem ser administrados na forma líquida, do mesmo modo que os colírios tradicionais (DU TOIT et al., 2011).

Existem atualmente diferentes tipos de nanopartículas e algumas já foram testadas como carreadores de fármacos para o tratamento tópico da VC, como dendrímeros, nanoesferas, micelas, lipossomas e entre outros (GONZALEZ et al., 2013). Entretanto, na literatura pesquisada não foram encontrados trabalhos que comparem diferentes tipos de nanocarreadores contendo um mesmo fármaco modelo para o tratamento tópico da VC.

O sunitinibe (SUB) é um inibidor de múltiplas tirosina-quinases ligadas ao receptor (TKRs), tendo atividades antitumoral e antiangiogênica. Dentre os receptores que esse fármaco inibe pode-se citar o do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e do fator de crescimento vascular e endotelial (VEGFR). Esse fármaco é aprovado para o tratamento de tumores gastrintestinais e renais (BLANCHET et al., 2009; ETIENNE-GRIMALDI et al., 2009). Além da sua indicação para tratamento do câncer, o SUB tem sido testado com bons resultados no tratamento da vascularização corneana (PEREZ-SANTONJA et al., 2010; DETRY et al., 2013; KO et al., 2013).

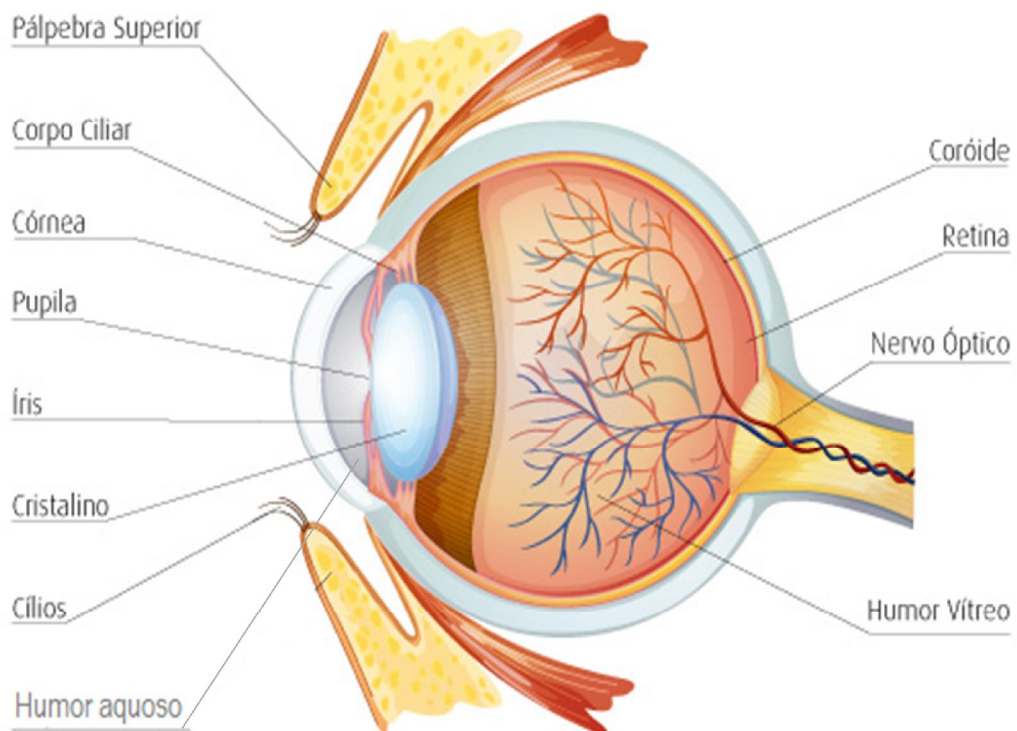
Em estudo comparativo de inibição da vascularização corneana realizado por Perez-Santonja e colaboradores (2010) em coelhos, o uso tópico do SUB inibiu três vezes mais a VC quando comparado ao anticorpo monoclonal bevacizumabe, um inibidor de VEGF. Porém, a molécula deste fármaco apresenta fotoinstabilidade em solução (RODAMER et al., 2011), o que poderia reduzir sua atividade quando aplicado na via tópica ocular. Segundo Thanki e colaboradores (2013), o SUB também sofre resistência mediada pela glicoproteína P (P-gp). Todos esses fatores fazem do SUB forte candidato a fármaco modelo para a encapsulação em nanopartículas objetivando-se o tratamento da VC.

A aplicação de nanocarreadores no tratamento tópico da vascularização corneana é estratégia promissora para melhorar a eficácia clínica do tratamento desta afecção ocular, visto que a terapia convencional em muitos casos não consegue driblar as barreiras oculares à absorção de fármacos pela via tópica. Foram avaliados neste trabalho três diferentes nanosistemas contendo sunitinibe para o tratamento tópico da VC: lipossomas (LIPO), nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e nanoesferas (NE). Através de estudos comparativos buscou-se determinar qual sistema apresenta maior potencial para aplicação no tratamento tópico da vascularização corneana.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 OLHO: ANATOMIA, FISIOLOGIA E APLICAÇÃO TÓPICA DE FÁRMACOS

O olho é um órgão sensorial especializado e anatomicamente isolado, o que lhe confere propriedades biofarmacêuticas e farmacodinâmicas únicas (DU TOIT et al., 2011). Conforme ilustrado na Figura 1, este órgão pode ser dividido em dois segmentos: anterior e posterior. O segmento anterior consiste no terço frontal do olho que inclui a pupila, córnea, íris, corpo ciliar, humor aquoso e cristalino. Os outros dois terços correspondem ao segmento posterior constituído pelo humor vítreo, retina, coróide e nervo óptico (GAUDANA et al., 2009).



**Figura 1** - Estrutura anatômica do olho. Segmento anterior: corpo ciliar, córnea, pupila, íris, cristalino e humor aquoso. Segmento posterior: humor vítreo, nervo óptico, retina e coróide. Fonte: Nucleus Medica Media, 2013.

O isolamento anatômico e fisiológico do olho deve-se, principalmente, às barreiras existentes neste órgão. Essas barreiras consistem na camada muco-aquosa formada pela filme lacrimal que protege a superfície anterior do olho, a

córnea que apresenta múltiplas camadas e epitélio com junções estreitas e desmossomas e os vasos sanguíneos da íris que não possuem fenestrações. Ainda pode-se citar a barreira hemato-aquosa e hemato-retiniana. A barreira hemato-aquosa é constituída pelo epitélio ciliar, que limita a passagem de moléculas do sangue para o interior do olho. A barreira hemato-retiniana é composta pelo epitélio pigmentado da retina juntamente com o endotélio dos vasos retinianos, que limitam a passagem de moléculas do sangue para a retina e sucessivamente para o vítreo (SASAKI et al., 1996; DIEBOLD; CALONGE, 2010; DU TOIT et al., 2011).

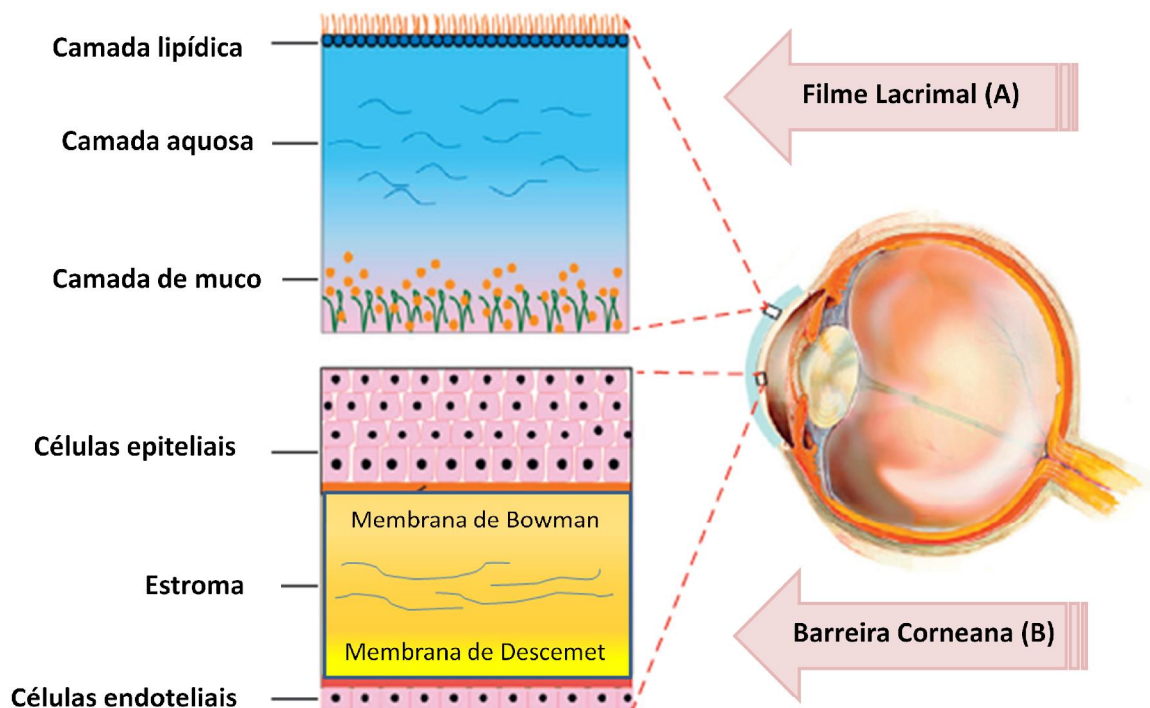
Além do mais, foram identificados também transportadores de efluxo presentes nos tecido oculares, inclusive na córnea, como a P-gp, a proteína de resistência a múltiplos fármacos (MRP) e a proteína de resistência do câncer de mama (BCRP) (KATRAGADDA; TALLURI ;MITRA, 2006; JIAO, 2008; CHOLKAR et al., 2013). Essas proteínas, presentes em muitas membranas celulares, bombeiam moléculas para fora da célula por mecanismo ATP (adenosina trifosfato) dependente (SCHELLENS et al., 2000).

A administração tópica de fármacos na forma de colírios é o método comumente empregado no tratamento de doenças oculares. Entretanto, os sítios de ação da maioria dos fármacos utilizados no tratamento oftálmico estão localizados no interior do olho. Embora a superfície externa deste órgão seja mais acessível para aplicação de medicamentos, a barreira corneana e o filme lacrimal podem limitar a absorção de fármacos administrados topicamente (LANG, 1995), conforme ilustrado na Figura 2. Somente cinco por cento da dose administrada topicamente alcança o segmento anterior do olho e apenas uma fração dessa dose pode se particionar para o segmento posterior (DU TOIT et al., 2011).

O filme lacrimal é composto por três camadas: uma camada de mucina, uma camada média formada por água e uma camada superficial lipídica (Figura 2 A). A camada lipídica é secretada pelas glândulas de Meibomius e a mucina pelas células caliciformes da conjuntiva. A quantidade de mucina secretada varia entre 2 a 3  $\mu\text{L}$  por dia. Essa glicoproteína exerce papel protetor formando uma camada de gel hidrofílico sobre a superfície ocular que impede a adesão de corpos estranhos e patógenos, assim como a absorção de fármacos (DU TOIT et al., 2011; GAN et al., 2013). A porção aquosa contém solução salina secretada pelas glândulas lacrimais (SASAKI et al., 1996).

O filme lacrimal possui alta taxa de renovação, sendo que o fluxo basal varia entre 0,5 a 2,2  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Isso resulta em uma renovação de 16% do filme lacrimal por minuto durante as horas de vigília. A estimulação reflexa ainda pode aumentar a taxa de lacrimação para 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Em virtude disso, a maioria das soluções administradas topicamente são lavadas da superfície ocular e também drenadas pelo canal nasolacrimal entre trinta a noventa segundos após aplicação (JARVINEN; JARVINEN; URTTI, 1995; SASAKI et al., 1996; GAN et al., 2013).

A córnea possui diâmetro e espessura de aproximadamente 11,7 e 0,7 mm, respectivamente (JARVINEN; JARVINEN; URTTI, 1995), é composta por cinco camadas que possuem polaridades alternadas: epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio, conforme ilustrado na Figura 2 B. Essa estrutura atua como barreira tanto para fármacos hidrofílicos quanto lipofílicos (GAN et al., 2013). Sendo que as camadas que efetivamente exercem a função de barreira são o epitélio, o endotélio e o estroma. (SASAKI et al., 1996)



**Figura 2** - Barreiras para liberação tópica ocular de fármacos. (A) Filme lacrimal: a alta taxa de renovação do filme e a camada mucosa fazem do filme lacrimal uma barreira para liberação tópica ocular de fármacos. (B) Barreira corneana: a junções estreitas entre as células epiteliais e cinco camadas com polaridades alternadas fazem da córnea uma barreira para absorção de fármacos hidrofílicos e lipofílicos. Fonte: adaptado de Gan e colaboradores (2013).

O epitélio corneano é constituído por cinco a seis camadas de células intimamente compactadas e conectadas por junções estreitas e desmossomas, que torna essa estrutura impermeável a qualquer substância maior que 500 Da, que inclui a maioria dos fármacos (HAMALAINEN et al., 1997). O estroma corneano é bastante hidrofílico, sua composição consiste em fibras de colágeno, queratócitos, glicosaminoglicanas e água, constituindo-se em uma barreira para absorção de fármacos lipofílicos. Ele representa cerca de 90% da espessura da córnea. O endotélio corneano é composto por uma única camada de células hexagonais cobrindo a superfície posterior da córnea (JARVINEN; JARVINEN; URTTI, 1995; SASAKI et al., 1996).

Os fármacos administrados topicamente na via ocular também podem ser absorvidos pela conjuntiva e pela esclera. A conjuntiva é uma fina membrana, altamente vascularizada, que reveste o interior das pálpebras. Essa membrana é mais permeável que a córnea e possui área de superfície de nove a dezessete vezes maior que a superfície corneana. Todavia, fármacos absorvidos pela conjuntiva são eliminados pela circulação sistêmica e não alcançam os tecidos oculares. De outro modo, os absorvidos pela esclera podem alcançar o humor vítreo (JARVINEN; JARVINEN; URTTI, 1995; SASAKI et al., 1996; DIEBOLD; CALONGE, 2010).

A administração tópica ocular de fármacos configura-se como verdadeiro desafio na tecnologia farmacêutica, que busca desenvolver sistemas eficientes de liberação de fármacos. Diversas alternativas já foram propostas e testadas para melhorar a absorção de fármacos nesta via, dentre elas o uso de tensoativos, emulsões, géis, implantes poliméricos, pró-fármacos, lentes de contato e ciclodextrinas. Não obstante, a aplicação da nanotecnologia no desenvolvimento de formulações cada vez mais elaboradas vem ganhando destaque no cenário científico como uma das principais alternativas para a aplicação tópica oftálmica de fármacos (WEINER; GILGER, 2010; CHOLKAR et al., 2013).

### **2.1.1 Avaliação da toxicidade ocular**

Formulações desenvolvidas para aplicação tópica ocular merecem atenção especial quanto ao potencial de desenvolvimento de toxicidade ocular. Os

excipientes, assim como os fármacos, presentes nessas formulações podem levar a irritações, queimaduras e lacrimejamento. Alguns componentes das formulações, como os tensoativos, podem causar danos à superfície epitelial da córnea e conjuntiva ocasionando o desenvolvimento de doenças, como a síndrome do olho seco (JIAO, 2008).

O potencial de causar irritação ocular é o principal fator avaliado em formulações desenvolvidas para aplicação nessa via. Por muitos anos esse fator tem sido avaliado pelo teste de Draize, realizado em olhos de coelhos. Entretanto, o interesse pelo desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais tem aumentado (DA NOBREGA et al., 2012; VERSTRAELEN et al., 2013).

Existem descritos alguns métodos alternativos para se avaliar o potencial de substâncias em causar irritação ocular. Todavia, nenhum dos métodos podem sozinhos substituir o teste de Draize, que avalia um conjunto de fatores potenciais em ocasionar lesões oculares. Sendo assim, deve-se utilizar uma combinação desses métodos quando se busca prever o potencial irritante ocular de substâncias (HAYASHI et al., 2012). Dentre os métodos alternativos desenvolvidos pode-se citar: teste de opacidade e permeabilidade em córneas de olhos bovinos (BCOP); teste em membrana corioalantoide de ovo de galinha (HET-CAM) e potencial hemolítico.

O BCOP é um método que permite avaliar a manutenção da função fisiológica e bioquímica de córneas bovinas *in vitro*. Neste método as lesões causadas pela amostra em teste são medidas quantitativamente por mudanças na opacidade e permeabilidade corneana utilizando-se opacitômetro e espectrofotômetro de luz visível, respectivamente. Este teste avalia somente danos causados à cornea (OECD TG 437, 2013).

O HET-CAM tem sido descrito como método adequado para avaliar a irritação ocular especialmente de formulações contendo tensoativos (DA NOBREGA et al., 2012). Este teste utiliza a membrana corioalantóide (CAM) de embriões de galinha. Essa membrana é altamente vascularizada, contendo artérias, veias e capilares e tecnicamente fácil de estudar. Ela responde a lesões com processos inflamatórios semelhantes aos observados em conjuntivas de coelhos (ARAUJO et al., 2009). No teste são avaliados os seguintes parâmetros: desnaturação protéica, rompimento de vasos e hemorragias (ICCVAM, 2010). A Figura 3 apresenta uma comparação entre a CAM e olho humano.



**Figura 3** - Comparação entre a membrana corioalantóide de embrião de galinha (A) e olho humano (B). Fonte: VIEIRA, 2014.

A ideia de se usar o eritrócito como indicador de irritação ocular não é nova e testes que envolvem hemólise têm sido descritos. O teste de potencial hemolítico baseia-se na integridade da membrana dos eritrócitos e avalia danos causados à córnea. O parâmetro avaliado consiste na porcentagem de hemólise causada pela amostra teste (SINGLETON et al., 1994; DA NOBREGA et al., 2012).

Apesar dos métodos descritos consistirem em alternativas viáveis ao teste de Draize, os órgãos regulatórios ainda não os consideram como testes oficiais. Contudo, esses testes são bastante úteis na triagem de formulações desenvolvidas para aplicação tópica ocular.

## 2.2 EMPREGO DA NANOTECNOLOGIA NO DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA APLICAÇÃO TÓPICA OCULAR DE FÁRMACOS

O termo nanotecnologia deriva da palavra grega nano, que significa anão. Essa ciência aplica os princípios da engenharia, eletrônica, física e ciência dos materiais no desenvolvimento de estruturas submicrométricas (ARAUJO et al., 2009). A ciência farmacêutica considera nano aquelas partículas com tamanho abaixo de um micrômetro (SEYFODDIN; SHAW; AL-KASSAS, 2010).

A nanotecnologia tem realizado avanços significativos na área biomédica, incluindo a terapia genética, liberação de fármacos e diagnóstico por imagem. A estimativa para os últimos cinco anos era de uma movimentação no mercado mundial de mais três bilhões de dólares na área da nanotecnologia para aplicação farmacêutica (SAHOO; DIINAWAZ; KRISHNAKUMAR, 2008).

O uso de nanosistemas como carreadores de fármacos para administração tópica ocular alcança os principais objetivos desse tipo de aplicação: aumentar a permeação, proporcionar liberação controlada e alvo específica do fármaco (KAUR et al., 2004). O sistema nanoestruturado ainda apresenta baixo potencial em causar irritação ocular, devido ao seu tamanho nanométrico, e proporciona biodisponibilidade e compatibilidade adequadas com os tecidos oculares. Além do mais, esses sistemas podem ser disponibilizados na forma de colírios (SAHOO; DIINAWAZ; KRISHNAKUMAR, 2008).

O tamanho de partícula influencia a absorção e permeação através das barreiras oculares. Estudos de permeação em olhos de coelhos utilizando nanopartículas de PLGA (poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)) demonstrou que partículas menores (100 nm) proporcionam maior absorção de fármacos pela córnea quando comparadas a partículas maiores (800 nm) (NAGARWAL et al., 2009). Os nanocarreadores também interagem com mucina presente na córnea e conjuntiva formando um depósito pré-corneano, resultando na liberação controlada do fármaco encapsulado (BUCOLO et al., 2004).

A maioria das formulações de nanocarreadores apresenta tensoativos em sua composição. Esses tensoativos podem reduzir o ângulo de contato da gota formado pela formulação com a córnea. Essa redução no ângulo de contato aumenta a espalhabilidade e molhabilidade da gota, conseqüentemente aumentando o tempo de permanência da formulação no sítio de aplicação (GAN et al., 2013). Os

tensoativos, sobretudo os não-iônicos, também podem inibir a atividade da P-gp e abrir as junções estreitas das células epiteliais corneanas, acarretando em aumento da penetração do fármaco (JIAO, 2008). A revisão de Jiao e colaboradores (2008) apresenta vários exemplos de aplicações desses tensoativos.

Nanopartículas carregadas positivamente podem interagir eletrostaticamente (pontes de hidrogênio e interações iônicas) com a superfície da córnea, que é negativa devido aos resíduos de ácido siálico da mucina presente no muco do filme lacrimal (DE CAMPOS et al., 2004). A interação entre nanocarreadores catiônicos e a superfície aniônica da córnea também pode levar à redução no ângulo de contato da formulação com a córnea e aumentar o tempo de permanência do fármaco (GAN et al., 2013). Esses nanossistemas mucoadesivos podem ser desenvolvidos com tensoativos catiônicos, polímeros com carga residual positiva (quitosana) ou mesmo através do recobrimento de partículas aniônicas com polímeros positivos ou mucoadesivos (LUDWIG, 2005).

Apesar das nanopartículas apresentarem inúmeras vantagens para aplicação ocular, deve-se avaliar também a toxicidade desses sistemas, conforme demonstrado no item 2.1.1. A toxicidade de nanopartículas nos tecidos oculares pode ser afetada por muitos fatores, incluindo o tamanho e superfície da partícula, dose, tempo de exposição e padrão de distribuição das partículas no olho. Alguns estudos têm realizados avaliações nesse sentido, baseando-se em estudos histológicos, imunológicos e inflamatórios (PROW, 2010; XU; KAMBHAMPATI; KANNAN, 2013). O trabalho de Prow (2010) apresenta uma revisão a respeito da toxicidade ocular de nanomateriais.

Diversos nanossistemas foram desenvolvidos nos últimos anos e muitos foram testados na aplicação tópica ocular de fármacos. Dentre os sistemas desenvolvidos pode-se citar: lipossomas, nanoesferas, nanocápsulas, nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados, dendrímeros, niossomas, cubossomas, nanopartículas híbridas polímero-lipídeo e entre outros (KAUR et al., 2004; SAHOO; DIINAWAZ; KRISHNAKUMAR, 2008; ARAUJO et al., 2009; DU TOIT et al., 2011; GAN et al., 2013; HONDA et al., 2013). O presente trabalho concentrou-se principalmente no desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas, nanoesferas e lipossomas para aplicação tópica ocular. Inúmeros fármacos já foram encapsulados nesses carreadores visando aplicação na mesma via. O Quadro 1 apresenta exemplos dessas aplicações.

<b>Nanosistema</b>	<b>Lipídeo ou Polímero Base</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Indicação Terapêutica</b>	<b>Referência</b>
<b>Nanopartículas Lipídicas Sólidas e Carreadores Lipídicos Nanoestruturados</b>	Compritol 888 ATO	Ciclosporina	Anti-inflamatório	(GOKCE et al., 2009)
	Diversos	Flurbiprofeno	Anti-inflamatório	(GONZALEZ-MIRA et al., 2010)
	Diversos	Gatifloxacino	Antibacteriano	(KALAM et al., 2010)
	Diversos	Ibuprofeno	Anti-inflamatório	(LI, X. et al., 2008)
	Diversos	Indometacina	Anti-inflamatório	(HIPALGAONKAR et al., 2013)
	Compritol 888 ATO e álcool cetosteárilico	Metazolamida	Antiglaucomatoso	(YOUSHA et al., 2012)
	Phospholipon 90G	Timolol	Antiglaucomatoso	(ATTAMA;REICHL;MULLER-GOYMAN, 2009)
	Diversos	Triamcinolona	Antiinflamatório	(ARAUJO et al., 2010)
<b>Nanoesferas</b>	PLGA	Claritromicina	Antibacteriano	(MOHAMMADI et al., 2011)
	Eudragit RL100	Cloricromeno	Anti-inflamatório	(BUCCOLO et al., 2004)
	Eudragit RS100/RL100	Flurbiprofeno	Anti-inflamatório	(PIGNATELLO et al., 2002)
	Eudragit RS100	Ibuprofeno	Anti-inflamatório	(PIGNATELLO et al., 2002)
	PLGA	Melatonina	Antiglaucomatoso	(MUSUMECI et al., 2013)
	Eudragit RS100	Terbinafina	Antifúngico	(TAYEL et al., 2013)
	PLGA	Triamcinolona	Antiangiogênico	(SABZEVARI et al., 2013)
<b>Lipossomas</b>	DMPC	Clorafenicol	Antibacteriano	(MAHMOUD et al., 2008)
	PC Epikuron 200	Ganciclovir	Antiviral	(SHEN;TU, 2007)
	PC de ovo	Ofloxacino	Antibacteriano	(HOSNY, 2009)
	PC S100	Tacrolimus	Imunossupressor	(DAI et al., 2013)
	PC de ovo	Tetraciclina	Antibacteriano	(SHAFAA et al., 2011)

**Quadro 1** - Nanossistemas desenvolvidos para administração na via tópica ocular.

## 2.2.1 Sistemas Lipídicos

### 2.2.1.1 Lipossomas

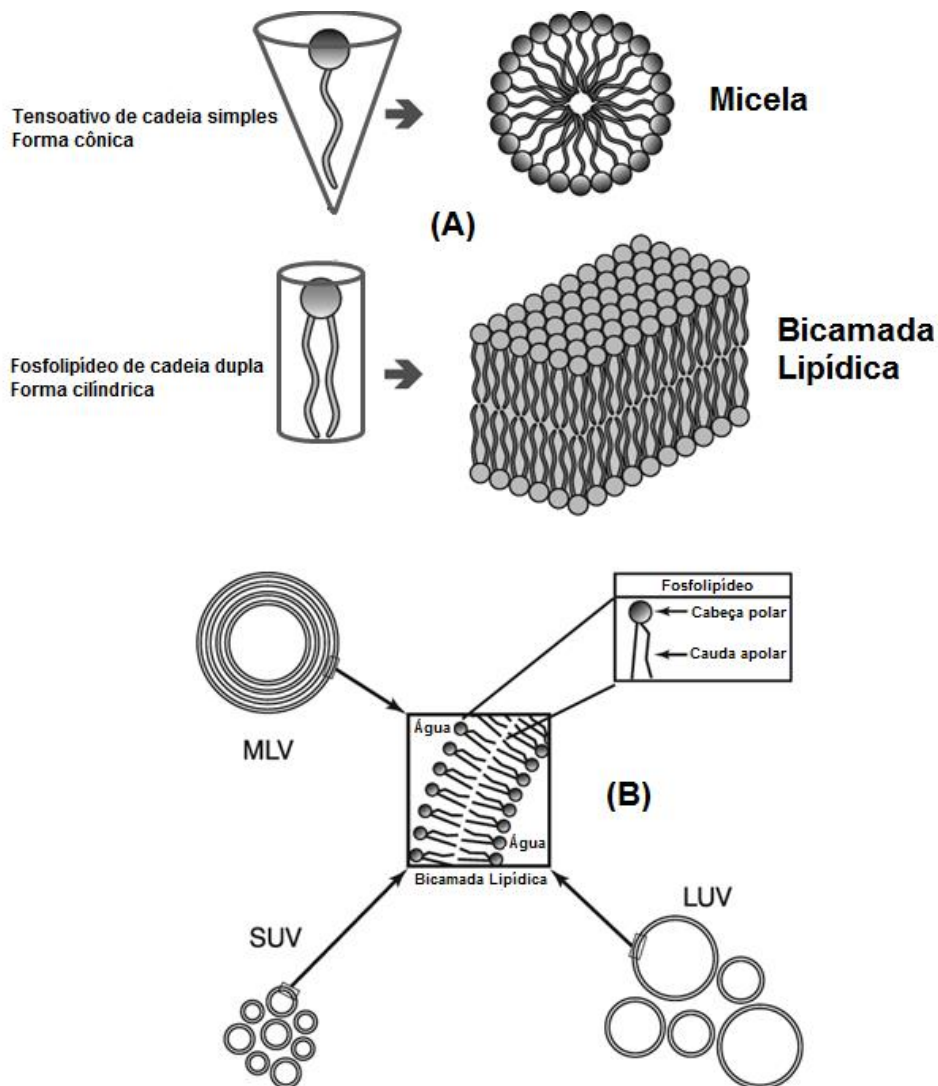
Os lipossomas foram desenvolvidos por Bangham em meados da década de 1960 enquanto investigava o papel dos fosfolipídeos na coagulação sanguínea (EBRAHIM; PEYMAN; LEE, 2005). Entretanto, sua utilização como carreadores de fármacos foi proposta e demonstrada no início dos anos 70 (GREGORIADIS, 1995; LASIC, 1998) .

Os lipossomas podem ser definidos como vesículas esféricas, variando de 0,05 a 5,0  $\mu\text{m}$ , constituídas de uma ou mais bicamadas lipídicas que encapsulam um núcleo aquoso em seu interior (SHARMA; SHARMA, 1997; GULATI et al., 1998). Eles são biocompatíveis e biodegradáveis, sendo constituídos por fosfolipídeos sintéticos ou naturais (SHARMA; SHARMA, 1997).

Os fosfolipídeos possuem propriedades anfifílicas, tendo uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica, que espontaneamente se organizam em bicamadas quando em soluções aquosas, semelhante às membranas biológicas. As cadeias de ácidos graxos ficam localizadas no interior da membrana enquanto a cabeça polar fica orientada para o exterior aquoso (JONES, 1995; DU TOIT et al., 2011). Essas estruturas assumem essa orientação devido à dupla cadeia de ácido graxo que confere às moléculas formas cilíndricas, ao contrário dos tensoativos que possuem somente uma cadeia de ácido graxo, possuindo forma cônica. Devido à sua forma cilíndrica, os fosfolipídeos tendem a se organizar em bicamadas (conformação de menor energia) e não formam micelas, como ocorre com os tensoativos que possuem somente um cauda hidrofóbica (LASIC, 1998), conforme ilustrado na Figura 4.

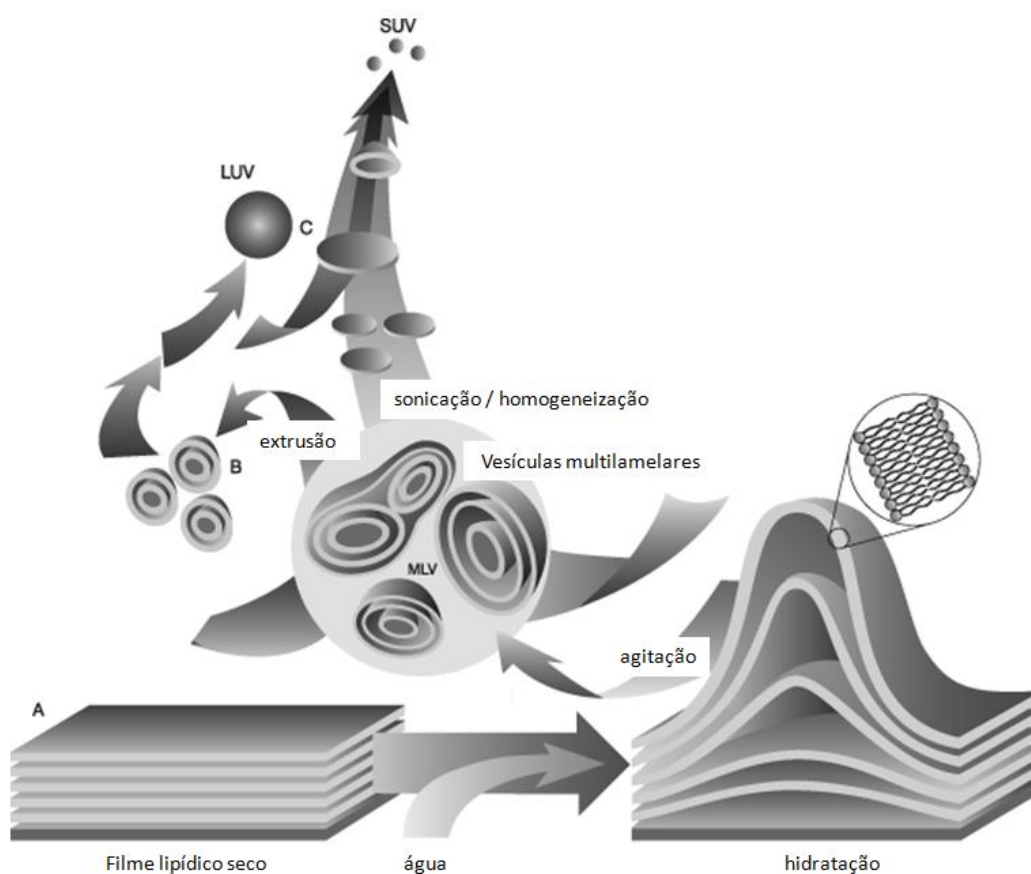
Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o tamanho e número de bicamadas. Vesículas unilamelares possuem somente uma bicamada envolvendo o núcleo aquoso, enquanto vesículas multilamelares (MLV) possuem mais de uma bicamada. De acordo com o tamanho, as vesículas unilamelares podem ser classificadas como vesículas unilamelares pequenas (SUV) (10 a 100 nm) ou vesículas unilamelares grandes (LUV) (100 a 300 nm) (DU TOIT et al., 2011), conforme ilustrado na Figura 4.

Devido a sua composição, núcleo aquoso e bicamada lipídica, os lipossomas permitem a encapsulação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos (WOODLE, 1995). Dependendo da solubilidade e das características de partição do fármaco, as moléculas ficarão localizadas em diferentes regiões dos lipossomas, podendo estar na bicamada lipídica, no compartimento aquoso ou na interface (SHARMA; SHARMA, 1997; GULATI et al., 1998).



**Figura 4** - (A) Diferenciação entre tensoativos de cadeia simples e fosfolípidos de cadeia dupla. Os tensoativos de cadeia simples possuem forma cônica e em meio aquoso tendem a formar micelas. Fosfolípidos de cadeia dupla em meio aquoso tendem a formar bicamadas lipídicas. (B) Estrutura do fosfolípido: cabeça polar e cauda apolar. Diferenciação entre vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares grandes (LUV). Adaptado de Produção de Lipossomas. Disponível em: <http://www.avantilipids.com>, acesso em 04 de novembro de 2013.

Existem vários métodos para produção de lipossomas, podendo-se citar: hidratação do filme lipídico, sonicação, injeção de etanol, evaporação de fase-reversa e extrusão (EBRAHIM; PEYMAN; LEE, 2005). O método mais simples e amplamente empregado é a hidratação do filme lipídico para a produção de MLV. Nesse método o filme lipídico é hidratado com tampão aquoso a uma temperatura acima da temperatura de transição vítrea dos lipídeos. O fármaco encapsulado pode ser adicionado no tampão de hidratação (fármacos hidrofílicos) ou no filme lipídico (fármacos lipofílicos). Esse método produz uma população heterogênea de MLV que depois podem ser sonicadas, homogeneizadas ou extrudadas através de membranas de policarbonato com poro definido, produzindo-se uma população homogênea de SUV ou LUV (SHARMA; SHARMA, 1997; GULATI et al., 1998), conforme ilustrado na Figura 5.



**Figura 5-** Produção de lipossomas por hidratação do filme lipídico. A - Produção de vesículas multilamelares (MLV): produção do filme lipídico seguida de hidratação com meio aquoso e agitação. B e C - produção de vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas unilamelares pequenas (SUV) por sonicação, extrusão e homogeneização das MLV. Adaptado de Produção de Lipossomas. Disponível em: <http://www.avantilipids.com>, acesso em 04 de novembro de 2013

Os fosfolipídeos podem se apresentar como uma fase gel/sólido ou fluido/líquido cristalino. A temperatura de transição vítrea é o ponto onde ocorre essa transição de fases, sendo que acima dessa temperatura o fosfolipídeo comporta-se como fluido/líquido cristalino e abaixo como gel/sólido (EBRAHIM; PEYMAN; LEE, 2005). Por isso, a temperatura empregada na produção dos lipossomas deve estar acima da temperatura de transição vítrea dos lipídeos utilizados (JONES, 1995; FREZARD, 1999).

A maioria dos métodos de produção de lipossomas envolve a dissolução prévia dos lipídios em solventes orgânicos (geralmente clorofórmio) com subsequente remoção do solvente. Deve-se garantir que todo solvente foi eliminado da formulação, evitando possíveis reações tóxicas (VAN SWAAY; DEMELLO, 2013).

Os lipossomas apresentam potencial para aplicação tópica ocular de fármacos. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado o papel dos lipossomas nessa via de administração. Esses sistemas podem melhorar a adesão e penetração corneana e conseqüentemente alterar a farmacocinética ocular de alguns fármacos (KAUR et al., 2004; EBRAHIM; PEYMAN; LEE, 2005). Contudo, o mecanismo pelo qual os lipossomas aumentam a absorção corneana de fármacos ainda não está completamente elucidado (DU TOIT et al., 2011).

O trabalho de Smolin e colaboradores (1981) foi o primeiro relato da aplicação de lipossomas na terapia oftálmica. Esses autores demonstraram que a idoxuridina lipossomal tópica foi mais eficiente para o tratamento de ceratitides herpéticas (crônicas e agudas) em olhos de coelhos quando comparada à solução do fármaco (SMOLIN et al., 1981 *apud* MEISNER; MEZEI, 1995). Em outro estudo, Hirnle e colaboradores (1991) observaram que lipossomas marcados com caboxifluoresceína foram detectados nos tecidos oculares em até sete dias após injeção subconjuntival da formulação. Hironaka e colaboradores (2009) demonstraram que a cumarina encapsulada em lipossomas pode alcançar a região posterior do olho após administração tópica.

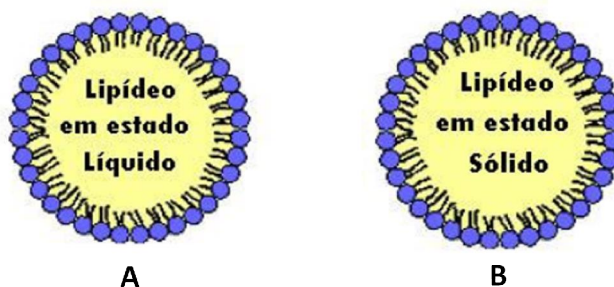
Existem inúmeros trabalhos na literatura comprovando a eficácia da aplicação tópica ocular dos lipossomas no tratamento de várias afecções oculares que acometem o segmento anterior do olho. Está disponível no mercado o produto Tears Again<sup>®</sup> da empresa Ocusoft (Texas, EUA). Este produto contém lipossomas contendo vitaminas (A, C e E) na forma farmacêutica de spray e é indicado para o

tratamento da síndrome do olho seco e irritações oculares (EBRAHIM; PEYMAN; LEE, 2005).

### 2.2.1.2 Nanopartículas lipídicas sólidas

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram desenvolvidas no início da década de noventa por diferentes grupos de pesquisa que buscavam obter sistemas compostos por lipídeos sólidos sob temperatura ambiente e corporal (SCHWARZ et al., 1994; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000). Esses sistemas têm se destacado no meio científico, sendo cada vez maior o número de publicações a respeito desses nanocarreadores (MEHNERT; MÄDER, 2012).

As NLS se assemelham às nanoemulsões empregadas na nutrição parenteral, no entanto, o lipídeo líquido é substituído por um lipídeo sólido (MÜLLER et al, 2000), conforme ilustrado na Figura 6. De forma similar ao que acontece com lipossomas e nanoemulsões, lipídeos biocompatíveis são empregados na produção das NLS. O uso de matrizes lipídicas sólidas proporciona retenção dos fármacos encapsulados e garante estabilidade física das partículas (MEHNERT; MÄDER, 2001).



**Figura 6-** Esquema representativo de nanoemulsão (A) e nanopartícula lipídica sólida (B).  
Fonte: adaptado de Müller et al, 2000

Os componentes usuais das NLS são lipídeos sólidos, tensoativos e água. Os lipídeos mais utilizados são os triglicerídeos (triestearina), ácidos graxos (ácido esteárico), esteróides (colesterol) e ceras (cetilpalmitato). Todas as classes de tensoativos têm sido utilizadas para estabilizar a dispersão lipídica, sendo que a combinação de tensoativos é mais eficiente em prevenir a agregação das partículas (MEHNERT; MÄDER, 2001).

As NLS podem ser produzidas por diferentes técnicas, entre elas a homogeneização sob alta pressão a quente ou a frio, diluição de microemulsão, preparo de emulsão múltipla e emulsificação/evaporação de solvente (LIPPACHER; MÜLLER; MÄDER, 2001; MEHNERT; MÄDER, 2012). Na técnica de emulsificação / evaporação do solvente, utilizada neste trabalho, o material lipídico é dissolvido em solvente orgânico e depois emulsionado com a fase aquosa. Após eliminação do solvente orgânico por evaporação, a dispersão de nanopartículas forma-se pela precipitação do lipídeo no meio aquoso (SJOSTROM; BERGENSTAHL, 1992).

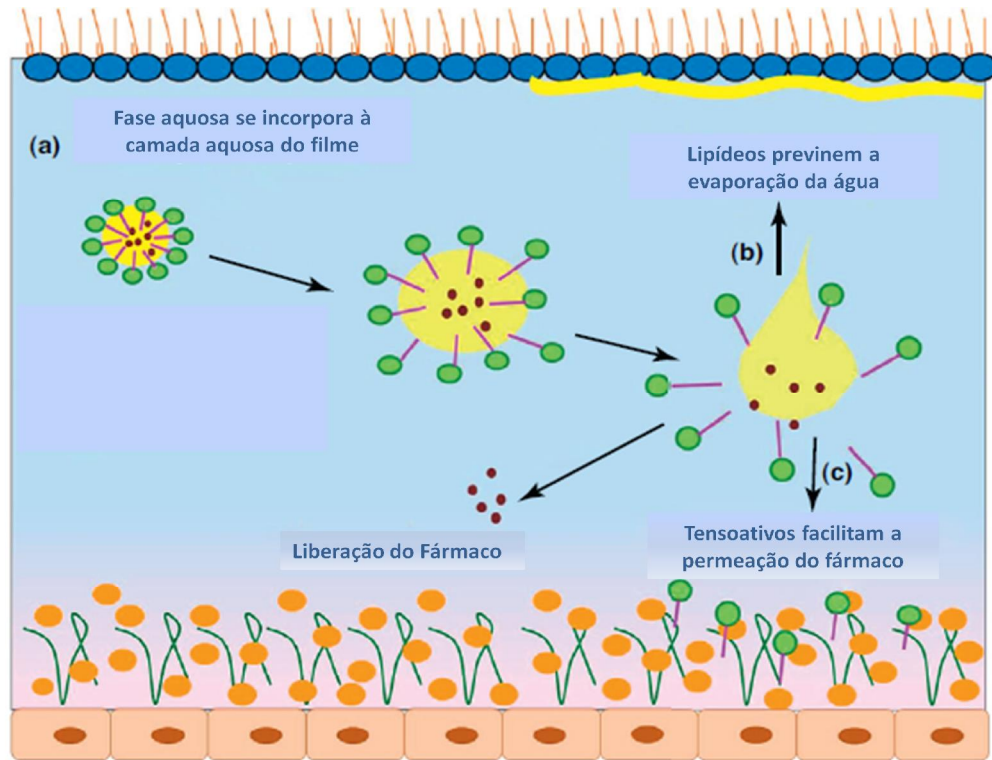
As NLS podem ser utilizadas na liberação ocular de fármacos devido ao seu tamanho nanométrico e ao seu caráter lipofílico, que pode aumentar a absorção corneana e a biodisponibilidade ocular, prolongar o tempo de permanência na córnea e promover liberação sustentada dos fármacos encapsulados (SEYFODDIN; SHAW; AL-KASSAS, 2010).

O primeiro trabalho desenvolvido com NLS para aplicação ocular foi realizado por Cavalli e colaboradores (1995), esses autores desenvolveram NLS contendo pilocarpina para o tratamento do glaucoma.

Os nanocarreadores lipídicos apresentam propriedades semelhantes às do filme lacrimal, que podem facilitar a permeação corneana de fármacos encapsulados nesses sistemas, conforme ilustrado na Figura 7. Após a instilação, a fase contínua (aquosa) do sistema pode aumentar a camada aquosa do filme lacrimal levando a maior hidratação da córnea, aumentando sua permeabilidade (Figura 7a). O lipídeo, depois de liberar o fármaco encapsulado, pode-se unir à camada lipídica do filme lacrimal, diminuindo a perda por evaporação da camada aquosa (Figura 7b). Além disso, os tensoativos presentes na formulação, conforme mencionado anteriormente, podem facilitar a permeação do fármaco encapsulado (Figura 7c) (GAN et al., 2013).

Os sistemas lipídicos também são bem tolerados pelo sistema fisiológico, o que reduz o risco de efeitos tóxicos e irritações no local de aplicação. Nos estudos realizados por Araújo e colaboradores (2010), a instilação de nanopartículas lipídicas negativas contendo triancinolona em olhos de coelhos mostrou inexistência de efeitos tóxicos ou irritação nos tecidos oculares. As nanopartículas lipídicas foram alvo específicas com aumento da penetração e da biodisponibilidade do fármaco na barreira ocular, acarretando em melhora da eficácia terapêutica e diminuição dos efeitos colaterais (ARAUJO et al., 2010). Em outro trabalho Gokce e colaboradores

(2009) trabalhando também com NLS carregadas negativamente observaram maior permeação corneana da ciclosporina quando encapsulada no nanossistema.



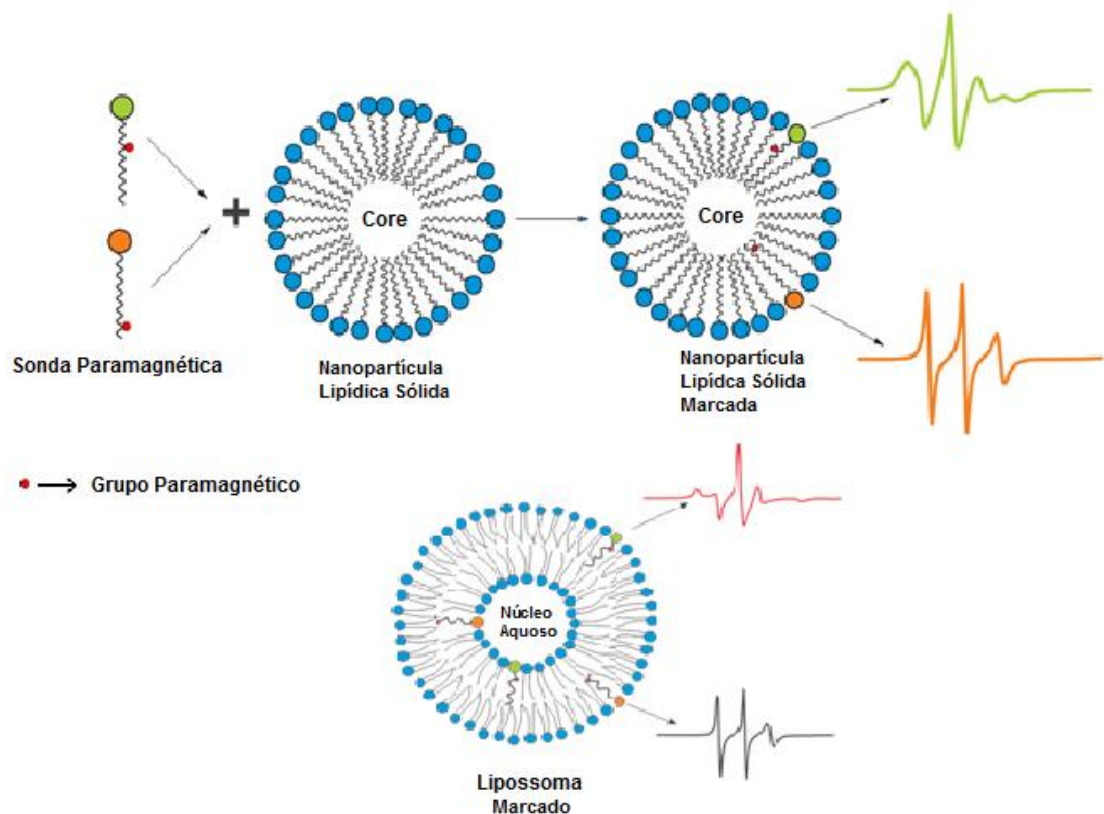
**Figura 7-** Interação entre nanocarreadores lipídicos e filme lacrimal. (a) Após a instilação a fase contínua (aquosa) do sistema se incorpora à camada aquosa do filme, aumentando a hidratação corneana. (b) O lipídeo, depois de liberar o fármaco encapsulado, pode-se unir à camada lipídica do filme lacrimal, diminuindo a perda por evaporação da camada aquosa. (c) Tensoativos podem aumentar a permeação do fármaco. Adaptado de Gan e colaboradores (2013)

### 2.2.1.3 Avaliação da dinâmica de sistemas lipídicos por espectroscopia de RPE

Avaliar a organização de sistemas lipídicos e prever a localização de fármacos nessas estruturas permite compreender melhor o comportamento e o impacto da incorporação de fármacos nesses sistemas. A espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) tem sido utilizada nesse intuito (AHLIN et al., 2000; HAAG et al., 2011).

Na espectroscopia de RPE são utilizados marcadores de spin lipídicos derivados do ácido esteárico, também conhecidos como sondas paramagnéticas. Essas sondas possuem um grupo paramagnético, grupo nitróxido contendo um elétron desemparelhado, ligado a um carbono da cauda hidrofóbica. Os grupos paramagnéticos podem estar ligados a um carbono mais próximo da cabeça polar

ou a um carbono mais distante, conforme ilustrado na Figura 8. Quando adicionadas a um carreador lipídico as sondas paramagnéticas se inserem na bicamada lipídica, no caso dos lipossomas, ou no core lipídico das nanopartículas, conforme ilustrado na Figura 8. Sendo assim, dependendo da posição do grupo paramagnético na sonda pode-se prever o comportamento da superfície do nanocarreador ou de uma região mais interna (GAETI et al., 2014).



**Figura 8** - Esquema representativo da inserção de sondas paramagnéticas em nanopartículas lipídicas sólidas e lipossomas. Dependendo da posição do grupo paramagnético na cauda hidrofóbica da sonda ele estará localizado mais próximo da superfície da partícula ou em uma região mais interna.

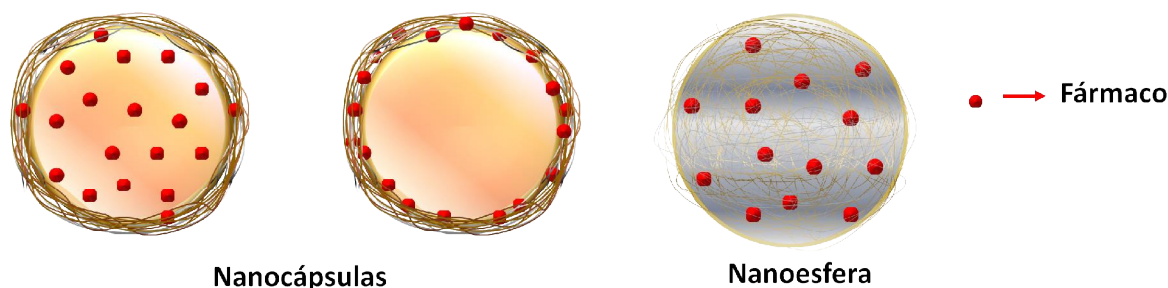
As sondas paramagnéticas quando submetidas a um campo magnético tendem a se reorientar, esse tempo é analisado pelo equipamento gerando um sinal gráfico (Figura 8). O tempo que a sonda gasta para se reorientar irá depender do meio em que ela está inserida. Esse tempo será menor em meios mais fluidos e maior em meios mais rígidos. (GAETI et al, 2014; DE QUEIROS; NETO; ALONSO, 2005).

Os trabalhos de Gaeti e colaboradores (2014) e Ahlin e colaboradores (2000) são exemplos da aplicação da espectroscopia de RPE para prever a fluidez e localização de fármacos em lipossomas e NLS. Ahlin e colaboradores (2000) demonstraram que quanto maior a lipofilicidade do fármaco mais inserido ele estará no core das NLS. Por outro lado, Gaeti e colaboradores (2014) demonstraram que o fármaco 4-Nerolidilcatecol quando encapsulado em lipossomas encontra-se localizado na interface água/bicamada lipídica.

### **2.2.3 Nanopartículas poliméricas**

As nanopartículas poliméricas (NP) foram desenvolvidas na década de 1970, sendo inicialmente utilizadas como carreadores de fármacos anti-neoplásicos e vacinas (KUMAR, 2000). O termo nanopartículas, neste caso, pode ser usado para designar nanocápsulas ou nanoesferas. As nanocápsulas são compostas por um núcleo oleoso circundado por uma membrana polimérica, o fármaco pode estar dissolvido no núcleo ou adsorvido ao invólucro polimérico. De outra forma, as nanoesferas não apresentam óleo em sua constituição, são formadas por uma densa rede polimérica na qual o fármaco pode estar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK et al., 2003; DU TOIT et al., 2011), conforme ilustrado na Figura 9.

Existem basicamente dois métodos de preparação de NP. O primeiro envolve a polimerização de monômeros (Polimerização *in situ*) e o segundo, amplamente empregado, baseia-se na precipitação de polímeros pré-formados, como o poli (ácido lático) (PLA), poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli( -caprolactona) (PCL) e os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico. As técnicas de emulsificação/difusão de solvente, emulsificação/evaporação de solvente e nanoprecipitação são exemplos do método de precipitação de polímero pré-formado (SCHAFFAZICK et al., 2003; GALINDO-RODRIGUEZ et al., 2004).



**Figura 9** - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas. Nanocápsulas: formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso. O fármaco pode estar dissolvido no núcleo ou adsorvido à parede polimérica. Nanoesferas: formadas por uma matriz polimérica onde o fármaco pode estar retido ou adsorvido. Fonte: adaptado de Oliveira e colaboradores (2012).

Nas técnicas de precipitação de polímero pré-formado geralmente o polímero é dissolvido em solvente orgânico e depois ocorre sua precipitação em meio aquoso, levando à formação das nanopartículas. Comumente adiciona-se também um ou mais tensoativos à formulação visando garantir sua estabilidade (GALINDO-RODRIGUEZ et al., 2004; NAGARWAL et al., 2009).

O primeiro estudo com NP para tratamento tópico ocular foi realizado por Ticho e colaboradores (1979). Esses autores desenvolveram um sistema chamado Pilopex constituído de nanoesferas de poli (ácido metilmetacrilato-acrílico) contendo pilocarpina para tratamento do glaucoma. Estudos clínicos demonstraram redução significativa da pressão intra-ocular após aplicação do Pilopex, no entanto o produto não foi lançado no mercado devido à problemas de toxicidade local, não biodegradabilidade e dificuldade de produção em larga escala (TICHO et al., 1979, *apud* ARAUJO et al., 2009).

As nanopartículas poliméricas como sistema de liberação tópico ocular de fármacos podem aumentar a biodisponibilidade (especialmente para fármacos insolúveis ou com baixa permeação) e prolongar a manutenção da atividade farmacológica no sítio de ação. Esses sistemas podem reduzir a eliminação do fármaco, sustentar a liberação, aumentar o tempo de residência pré-corneana e a captação pelo epitélio ocular, acarretando em melhor efeito terapêutico (NAGARWAL et al., 2009; DU TOIT et al., 2011). Após a instilação as partículas permanecem no local e o fármaco é liberado da matriz polimérica através de mecanismos como difusão, degradação do polímero e trocas iônicas (ARAUJO et al., 2009).

Calvo e colaboradores (1996) demonstraram que nanocápsulas de PCL contendo ciclosporina aumentaram a concentração corneana do fármaco em olhos de coelhos dez vezes mais que a solução oleosa. Em outro trabalho, Bucolo e colaboradores (2004) trabalhando com nanoesferas de Eudragit RL100 contendo uma cumarina sintética (cloricromeno), observaram aumento na concentração máxima do fármaco no humor aquoso de coelhos 1,7 vezes maior que a solução aquosa de cumarina após administração tópica.

Musumeci e colaboradores (2013) desenvolveram nanoesferas de PLGA contendo melatonina para tratamento do glaucoma. Os autores notaram redução significativa na pressão intra-ocular de coelhos após instilação da formulação de nanopartículas, sendo que essa redução foi maior que a observada para a solução aquosa do fármaco.

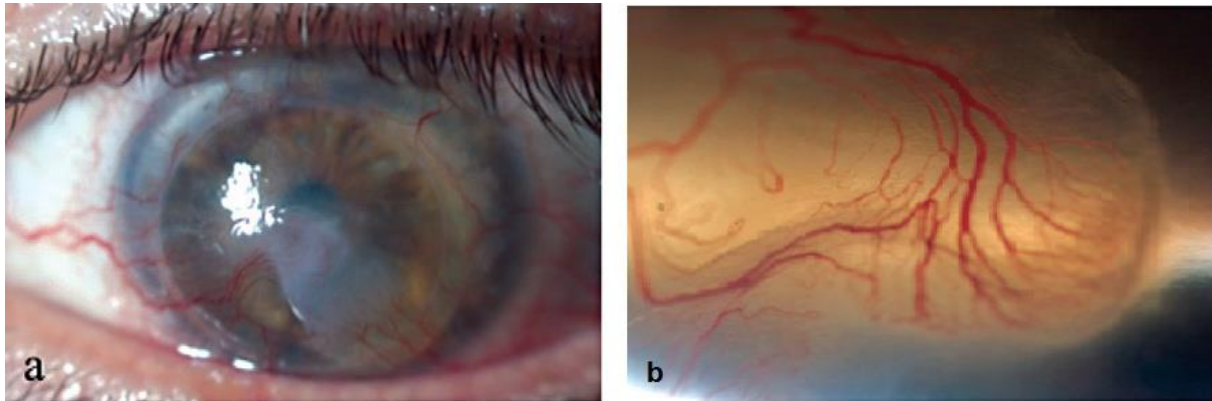
As nanopartículas têm demonstrado resultados promissores nas últimas duas décadas, sendo capazes de aumentar a captação e meia-vida corneana de fármacos. Comparadas aos colírios, as dispersões de nanossistemas possuem as vantagens de aumentar a adesão do paciente ao tratamento, devido à redução na frequência de aplicações, e estender o tempo de permanência da formulação na região ocular (DU TOIT et al., 2011).

### 2.3 APLICAÇÃO DA NANOTECNOLOGIA NO TRATAMENTO DA VASCULARIZAÇÃO CORNEANA

As propriedades de transparência e refração de uma córnea saudável são mediadas por sua avascularidade (KEATING; JACOBS, 2011). Entretanto, muitos processos patológicos que afetam a córnea podem levar à vascularização corneana (Figura 10) e conseqüentemente à deficiência visual (PAPATHANASSIOU et al., 2013). A VC pode ocorrer após queimaduras químicas, processos isquêmicos, infecções, trauma e inflamações, sendo a maior causa de cegueira, afetando cerca de 1,4 milhões de pessoas por ano nos EUA. O uso de lentes de contato e transplantes corneanos são os principais fatores que levam ao desenvolvimento de VC (LEE; WANG; ADAMIS, 1998).

A angiogênese é o processo de crescimento de novos vasos a partir de estruturas vasculares pré-existentes. Esse processo ocorre pela degradação da membrana basal, remodelamento da matriz extracelular, aumento da permeabilidade

vascular e proliferação de células endoteliais (REGENFUSS; BOCK; CURSIEFEN, 2012). Na vascularização corneana esses novos vasos, que emergem dos capilares e vênulas do plexo pericorneal, podem desencadear a diminuição da acuidade visual e conseqüente perda da visão (CHANG et al., 2012).



**Figura 10** - Vasculização corneana. a: fotografia de lâmpada de fenda de paciente com vascularização corneana. b: visão ampliada da vascularização corneana. Fonte: (KEATING;JACOBS, 2011).

Como citado anteriormente, o processo de vascularização ocorre devido ao desequilíbrio entre fatores anti-angiogênicos e pró-angiogênicos. Os principais fatores pró-angiogênicos envolvidos na VC são: fator de crescimento de fibroblastos (FGF), angiogenina, interferon, fator de necrose tumoral, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF) (DORRELL et al., 2007). Sendo que o VEGF é o principal mediador no desenvolvimento da VC (MENZEL-SEVERING, 2012).

O VEGF liga-se a receptores tirosina quinase, que são os responsáveis por desencadear os efeitos proliferativos do VEGF nas células endoteliais vasculares. O VEGF induz a dimerização e subsequente autofosforilação desses receptores, que leva a ativação de sinais proliferativos e mitogênicos, ocorrendo a vascularização (REGENFUSS; BOCK; CURSIEFEN, 2012).

Em virtude disso, o principal foco da terapia medicamentosa para tratamento da VC envolve a inibição do VEGF ou de seus receptores. São utilizados também corticosteróides e antiinflamatórios não-esteroidais. Assim como a terapia fotodinâmica e fotocoagulação a laser. Porém, esses tratamentos apresentam eficácia clínica limitada e podem levar a efeitos colaterais, como aumento da

pressão intra-ocular e catarata (DORRELL et al., 2007; KEATING; JACOBS, 2011; CHANG et al., 2012).

Os agentes anti-VEGF têm sido eficazes na redução da VC em modelos animais e em estudos clínicos em humanos. Os principais representantes dessa classe de medicamentos são o bevacizumab, ranibizumab e o pegaptanib, que são anticorpos monoclonais ou aptâmeros direcionados para o VEGF (DORRELL et al., 2007). Recentemente também foi aprovado o aflibercept, uma proteína de fusão recombinante que bloqueia a ação do VEGF e do fator de crescimento placentário (P1GF) (CHANG et al., 2014; YANG; MCKEAGE, 2014)

Atualmente, as pesquisas têm sido direcionadas também para o bloqueio da cascata de ativação do VEGF, através da inibição dos receptores tirosina quinase. Nesse caso, são utilizados inibidores desses receptores, como o pazopanibe e o sunitinibe (CHANG et al., 2012).

Apesar dos fármacos disponíveis para tratamento da VC serem eficientes, sabe-se que as barreiras oculares podem dificultar tanto a terapia tópica como a sistêmica. A utilização de nanocarreadores, conforme motivos supracitados, pode aumentar o grau de sucesso do tratamento da VC (GONZALEZ et al., 2013).

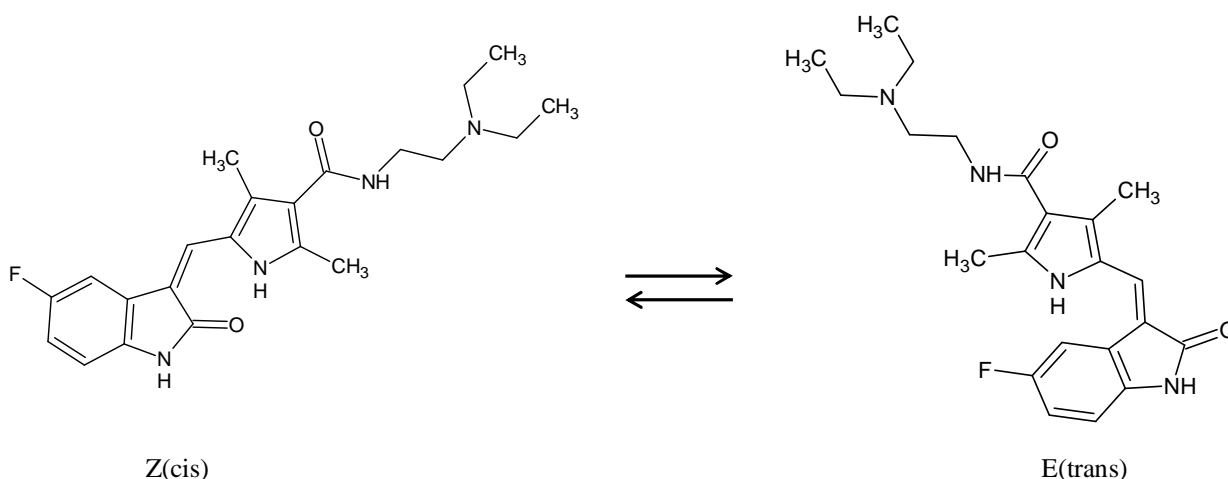
Yuan e colaboradores (2008) desenvolveram nanopartículas de PLA recobertas com quitosana contendo o fármaco imunossupressor rapamicina. Os autores testaram a formulação em coelhos com córneas transplantadas. Geralmente após transplantes de córnea podem ocorrer neovascularizações que em alguns casos podem levar à rejeição do enxerto. A aplicação tópica das nanopartículas contendo rapamicina conseguiu inibir a VC mais que a suspensão do fármaco. Os animais tratados com os nanossistemas apresentaram córneas claras e transparentes. Em outro trabalho semelhante, Vanderveen e colaboradores (1994) demonstraram que injeções subconjuntivais de lipossomas contendo difosfonato de diclorometileno conseguiram reduzir significativamente a VC e o número de rejeições em ratos com córneas transplantadas.

Micelas compostas por hialuronato conjugado ao peptídeo Flt1 (anti-VEGFR) contendo genisteína, fármaco antiangiogênico, foram testadas através de injeções subconjuntivais em ratos com VC induzida por cauterização com nitrato de prata. As nanopartículas foram mais eficientes em reduzir a VC quando comparadas ao fármaco livre e ao hialuronato conjugado ao peptídeo Flt1 (KIM et al., 2012). Trabalhando também com micelas, compostas por PCL-PEG, contendo celastrol, Li

e colaboradores (2012) observaram redução significativa da VC e dos níveis de VEGF após injeção subconjuntival dos nanosistemas em ratos com VC induzida por sutura com nylon.

## 2.4 SUNITINIBE

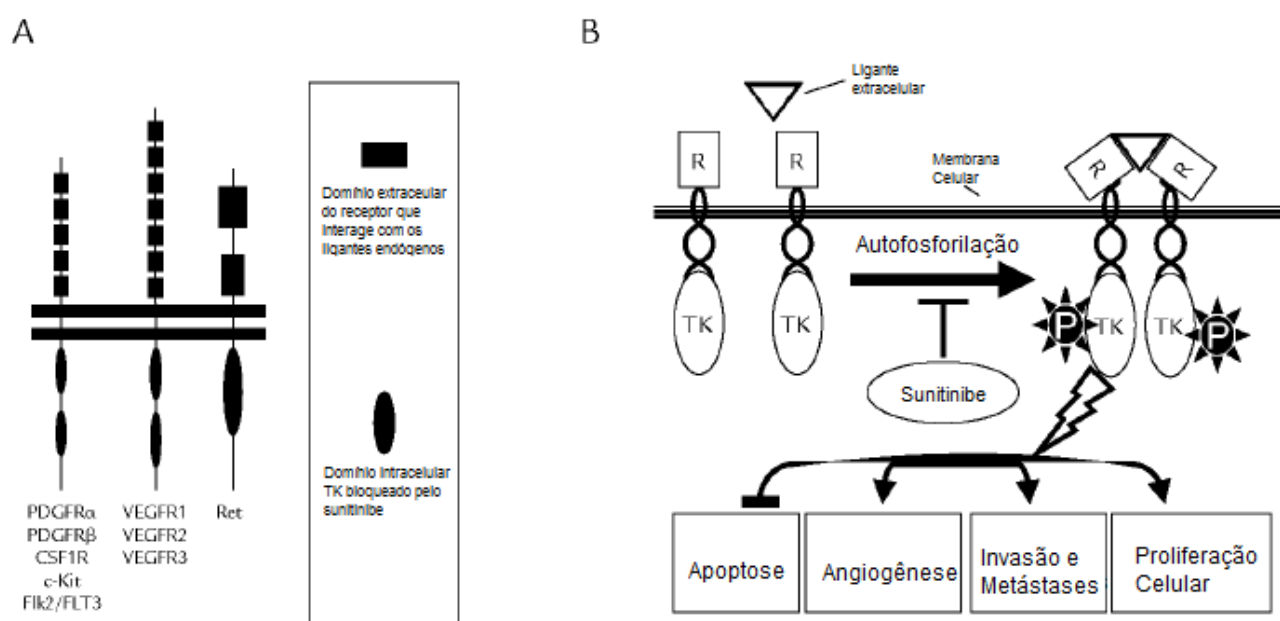
O sunitinibe (SUB) (Figura 11) é um fármaco antitumoral e antiangiogênico aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 26 de janeiro de 2006 para o tratamento de carcinoma renal metastático e tumor gastrointestinal estromal em pacientes que não responderam ao tratamento com imatinibe (ADAMS; LEGGAS, 2007). O SUB é comercializado pela Pfizer (EUA) com o nome comercial Sutent<sup>®</sup>. Esse medicamento está disponível na forma farmacêutica de cápsulas contendo 12,5; 25 e 50 mg do sal solúvel malato de sunitinibe (IZZEDINE et al., 2007).



**Figura 11-** Estrutura química do sunitinibe. Estereoisômeros Z(cis) e E(trans). Massa molar: 398,47 g/mol; LogP: 2,5; pKa: 9,3.(REMKO; BOHAC; KOVACIKOVA, 2011)

O SUB inibe múltiplas tirosina-quinases ligadas ao receptor (TKRs) que implicam no crescimento tumoral, na angiogênese patológica e na progressão metastática do câncer. Esse fármaco inibe principalmente os receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR e PDGFR), dos receptores do fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3), do receptor do fator de células tronco (KIT), da tirosina quinase-3 (FLT3), do receptor do fator de estimulação de colônias Tipo 1 (CSF-1R) e do receptor do fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial (RET) (BELLO et al., 2010).

A ativação desses receptores estimula uma cascata de sinalização mediante inúmeros mecanismos, incluindo a autofosforilação do TKR, que leva a ativação de sinais proliferativos e mitogênicos, desencadeando a angiogênese, proliferação celular e inibição da apoptose. Conforme ilustrado na Figura 12, o SUB atua como inibidor da autofosforilação do TKR. Esses receptores estão ancorados no membrana celular e possuem um domínio extracelular e um domínio intracelular catalítico. O SUB inibe a autofosforilação ao competir com a adenosina trifosfato (ATP) na ligação ao domínio de ativação intracelular do receptor, inibindo sua atividade catalítica (ADAMS; LEGGAS, 2007; FUNAKOSHI; LATIF; GALSKY, 2013).



**Figura 12-** Mecanismo de ação do sunitinibe. A: O sunitinibe é um inibidor de múltiplas tirosina quinases ligadas ao receptor (TKR) que interage com os domínios TK intracelulares dos receptores do fator de crescimento endotelial e vascular (VEGFR), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial (RET). B: Os domínios TK intracelulares autofosforilam quando um ligante liga-se ao domínio extracelular. O sunitinibe compete com a adenosina trifosfato pelo sítio de ativação do domínio TK e impede sua autofosforilação, impedindo consequentemente a cascata de ativação que leva a estimulação dos sinais angiogênicos, proliferação celular e outros. CSF1 r: receptor do fator 1 de estimulação de colônias; P: fosforilação. Fonte: adaptado de (ADAMS;LEGGAS, 2007).

O sunitinibe apresenta fotoinstabilidade em solução. Quando exposto à luz o estereoisômero farmacologicamente ativo Z(cis) se converte espontaneamente no E(trans) isômero (Figura 11) (ZHAO; SUKBUNTHERNG; ANTONIAN, 2004). A mudança conformacional ocorre na dupla ligação entre os anéis pirrol e oxindólico. O E(trans) isômero é instável em solução e sob condições precisas de pH e

proteção da luz pode-se reverter para o isômero Z (cis) (ETIENNE-GRIMALDI et al., 2009; DE BRUIJN et al., 2010). Esse fármaco também sofre resistência mediada pela P-gp (THANKI et al., 2013).

Assim como outros fármacos utilizados na quimioterapia do câncer, o SUB apresenta efeitos adversos quando administrado pela via oral, como: hipertensão, reações cutâneas em mãos e pés, hemorragias e tromboembolismo (FUNAKOSHI; LATIF; GALSKY, 2013).

Os fármacos inibidores de tirosina quinase têm sido testados para tratamento da vascularização ocular. Ko e colaboradores (2013) aplicaram o SUB e o bevacizumab pela via tópica e subconjuntival em olhos de coelhos com VC induzida por sutura. O SUB mostrou maior redução da VC quando comparado ao bevacizumab, tanto quando aplicado pela via tópica como pela subconjuntival. A redução da VC pelo SUB foi maior quando aplicado topicamente, Perez-Santoja e colaboradores (2010) obtiveram resultado similar em trabalho análogo ao citado (exposto no item 1). Detry e colaboradores (2013) também demonstraram redução da VC em ratos tratados com SUB pela via oral.

Existem trabalhos na literatura relatando a incorporação do SUB em nanosistemas. Maitani e colaboradores (2012) investigaram a inibição do crescimento tumoral em camundongos *nude* com tumor (PC12). Os lipossomas contendo SUB inibiram o crescimento tumoral em maior grau que o fármaco livre. No mesmo trabalho também foram testados lipossomas contendo SUB e irinotecano, fármaco anticancerígeno. O SUB também foi encapsulado em nanogel composto por fosfatidilcolina e albumina, indicado para tratamento do câncer. Neste caso, trata-se de nanopartículas de albumina recobertas por bicamada lipídica contendo PEG e um ligante direcionado para a célula tumoral (MURPHY et al., 2011).

O SUB apresenta potencial para aplicação ocular no tratamento da vascularização corneana. Contudo, os efeitos adversos relatados da administração oral desse fármaco podem restringir sua utilização por essa via no tratamento da VC, sendo a via tópica ocular a melhor alternativa.

O desenvolvimento de um nanosistema que aumente o tempo de residência do SUB no espaço pré-corneano, proteja-o da fotodegradação e eleve sua captação pelas células corneanas, pode aumentar o grau de sucesso clínico no tratamento da VC com este fármaco.

### 3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas e nanoesferas poliméricas contendo sunitinibe e avaliar *ex-vivo* a permeação corneana do fármaco a partir das formulações nanoestruturadas e seu potencial em causar irritação ocular.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação do sunitinibe;
- Realizar estudo de fotoestabilidade de bancada do sunitinibe;
- Produzir lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e nanoesferas poliméricas contendo sunitinibe;
- Caracterizar os nanosistemas obtidos quanto ao diâmetro médio, polidispersão, eficiência de encapsulação, potencial zeta, carga de fármaco e rendimento de processo.
- Estudar a fluidez e possível localização do fármaco, por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica, nas nanopartículas lipídicas sólidas e lipossomas.
- Selecionar três formulações promissoras e avaliar seu perfil de liberação *in-vitro*, permeação corneana *ex-vivo* e potencial em causar irritação ocular.

## 6 CONCLUSÕES

- A metodologia analítica para quantificação do sunitinibe nas nanopartículas foi desenvolvida e validada;
- O sunitinibe apresentou fotoinstabilidade em solução, ocorrendo conversão do isômero Z(cis) para o isômero E(trans). Frascos envolvidos com papel alumínio foram a forma mais eficiente de se prevenir a fotodegradação;
- Foram produzidos lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e nanoesferas poliméricas contendo sunitinibe. Os sistemas apresentaram tamanho de partícula e Pdl satisfatórios, assim como elevada eficiência de encapsulação;
- A incorporação do SUB em lipossomas alterou o tamanho de partícula e o potencial zeta desses sistemas.
- As nanoesferas poliméricas apresentaram maior capacidade de incorporação do sunitinibe quando comparadas aos lipossomas e às nanopartículas lipídicas sólidas;
- Os lipossomas se apresentaram como sistema mais rígido que as nanopartículas lipídicas sólidas. A incorporação do SUB em lipossomas levou a um aumento de rigidez da bicamada lipídica, enquanto o oposto foi observado nas nanopartículas lipídicas sólidas.
- Em lipossomas o SUB provavelmente localiza-se na bicamada lipídica próximo à interface polar. Nas NLS o fármaco também, provavelmente, está localizado na região próxima à interface.
- O perfil de liberação do sunitinibe foi diferente nos três sistemas desenvolvidos. Nas vinte e quatro horas de estudo os lipossomas apresentaram liberação mais lenta do fármaco quando comparados às nanoesferas e nanopartículas lipídicas sólidas.

- As nanopartículas lipídicas sólidas proporcionaram maior retenção corneana do sunitinibe quando comparadas aos lipossomas e às nanoesferas poliméricas.
- Os três sistemas desenvolvidos não apresentaram potencial para irritação ocular nos testes de permeabilidade e opacidade em córneas de olhos bovinos (BCOP), potencial hemolítico e teste com ovo de galinha em membrana corioalantóide (HET-CAM).
- Dentre os sistemas desenvolvidos neste estudo comparativo, as nanopartículas lipídicas sólidas contendo SUB podem apresentar maior potencial para aplicação clínica no tratamento da vascularização corneana. Esses carreadores demonstraram características de tamanho, fluidez e liberação de fármaco adequadas para aplicação tópica ocular do SUB, ocasionando maior retenção corneana do fármaco. Esses nanossistemas também não apresentaram sinais de irritação ocular nos estudos de avaliação pré-clínica da segurança.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUL KALAM, M.; SULTANA, Y.; ALI, A.; AQIL, M.; MISHRA, A. K.; CHUTTANI, K.; ALJUFFALI, I. A.; ALSHAMSAN, A. Part II: Enhancement of transcorneal delivery of gatifloxacin by solid lipid nanoparticles in comparison to commercial aqueous eye drops. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101A, n. 6, p. 1828-1836, 2013.

ADAMS, V. R.; LEGGAS, M. Sunitinib malate for the treatment of metastatic renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumors. **Clinical Therapeutics**, v. 29, n. 7, p. 1338-1353, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. Brasília, 2010.

AHLIN, P.; KRISTL, J.; SENTJURC, M.; STRANCAR, J.; PECAR, S. Influence of spin probe structure on its distribution in SLN dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 241-244, 2000.

AKSUNGUR, P.; DEMIRBILEK, M.; DENKBA, E. B.; VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A.; ÜNLÜ, N. Development and characterization of Cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular drug delivery: Cellular toxicity, uptake, and kinetic studies. **Journal of Controlled Release**, v. 151, n. 3, p. 286-294, 2011.

ANDRADE, L. M.; DE FATIMA REIS, C.; MAIONE-SILVA, L.; ANJOS, J. L.; ALONSO, A.; SERPA, R. C.; MARRETO, R. N.; LIMA, E. M.; TAVEIRA, S. F. Impact of lipid dynamic behavior on physical stability, in vitro release and skin permeation of genistein-loaded lipid nanoparticles. **Eur J Pharm Biopharm**, 2014.

ARAUJO, J.; GONZALEZ-MIRA, E.; EGEA, M. A.; GARCIA, M. L.; SOUTO, E. B. Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetonide-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 393, n. 1-2, p. 167-175, 2010.

ARAUJO, J.; GONZALEZ, E.; EGEA, M. A.; GARCIA, M. L.; SOUTO, E. B. Nanomedicines for ocular NSAIDs: safety on drug delivery. **Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine**, v. 5, n. 4, p. 394-401, 2009.

ATTAMA, A. A.; REICHL, S.; MULLER-GOYMANN, C. C. Sustained Release and Permeation of Timolol from Surface-Modified Solid Lipid Nanoparticles through Bioengineered Human Cornea. **Current Eye Research**, v. 34, n. 8, p. 698-705, 2009.

BELLETTI, D.; RIVA, G.; TOSI, G.; FORNI, F.; BAROZZI, P.; LUPPI, M.; VANDELLI, M. A.; RUOZI, B. Novel polymeric/lipidic hybrid systems (PLHs) for effective Cidofovir delivery: Preparation, characterization and comparative in vitro study with polymeric particles and liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 413, n. 1-2, p. 220-228, 2011.

BELLO, C. L.; GARRETT, M.; SHERMAN, L.; SMERAGLIA, J.; RYAN, B.; TOH, M. Pharmacokinetics of sunitinib malate in subjects with hepatic impairment. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 66, n. 4, p. 699-707, 2010.

BLANCHET, B.; SABOUREAU, C.; BENICHO, A. S.; BILLEMONT, B.; TAIEB, F.; ROPERT, S.; DAUPHIN, A.; GOLDWASSER, F.; TOD, M. Development and validation of an HPLC-UV-visible method for sunitinib quantification in human plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 404, n. 2, p. 134-139, 2009.

BUCOLO, C.; MALTESE, A.; MAUGERI, F.; BUSA, B.; PUGLISI, G.; PIGNATELLO, R. Eudragit RL100 nanoparticle system for the ophthalmic delivery of cloricromene. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 7, p. 841-846, 2004.

BUDIL, D. E.; LEE, S.; SAXENA, S.; FREED, J. H. Nonlinear-least-squares analysis of slow-motion EPR spectra in one and two dimensions using a modified Levenberg-Marquardt algorithm. **Journal of Magnetic Resonance Series A**, v. 120, n. 2, p. 155-189, 1996.

BYUN, Y.; HWANG, J. B.; BANG, S. H.; DARBY, D.; COOKSEY, K.; DAWSON, P. L.; PARK, H. J.; WHITESIDE, S. Formulation and characterization of  $\alpha$ -tocopherol loaded poly  $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanoparticles. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 24-28, 2011.

CALVO, P.; SANCHEZ, A.; MARTINEZ, J.; LOPEZ, M. I.; CALONGE, M.; PASTOR, J. C.; ALONSO, M. J. Polyester nanocapsules as new topical ocular delivery systems for cyclosporin A. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 2, p. 311-315, 1996.

CAVALLI, R.; MOREL, S.; GASCO, M. R.; CHETONI, P.; SAETTONE, M. F. PREPARATION AND EVALUATION IN-VITRO OF COLLOIDAL LIPOSPHERES CONTAINING PILOCARPINE AS ION-PAIR. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 117, n. 2, p. 243-246, 1995.

CHANG, A. A.; LI, H.; BROADHEAD, G. K.; HONG, T.; SCHLUB, T. E.; WIJEYAKUMAR, W.; ZHU, M. Intravitreal Aflibercept for Treatment-Resistant

Neovascular Age-related Macular Degeneration. **Ophthalmology**, v. 121, n. 1, p. 188-192, 2014.

CHANG, J. H.; GARG, N. K.; LUNDE, E.; HAN, K. Y.; JAIN, S.; AZAR, D. T. Corneal Neovascularization: An Anti-VEGF Therapy Review. **Survey of Ophthalmology**, v. 57, n. 5, p. 415-429, 2012.

CHOLKAR, K.; PATEL, S. P.; VADLAPUDI, A. D.; MITRA, A. K. Novel Strategies for Anterior Segment Ocular Drug Delivery. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 2, p. 106-123, 2013.

DA NOBREGA, A. M.; ALVES, E. N.; PRESGRAVE, R. D.; COSTA, R. N.; DELGADO, I. F. Determination of eye Irritation Potential of Low-irritant Products: Comparison of in vitro Results with the in vivo Draize Rabbit Test. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 3, p. 381-388, 2012.

DAI, Y. K.; ZHOU, R.; LIU, L.; LU, Y.; QI, J. P.; WU, W. Liposomes containing bile salts as novel ocular delivery systems for tacrolimus (FK506): in vitro characterization and improved corneal permeation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 1921-1933, 2013.

DAMGE, C.; MAINCENT, P.; UBRICH, N. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. **Journal of Controlled Release**, v. 117, n. 2, p. 163-170, 2007.

DE BRUIJN, P.; SLEIJFER, S.; LAM, M.-H.; MATHIJSSSEN, R. H. J.; WIEMER, E. A. C.; LOOS, W. J. Bioanalytical method for the quantification of sunitinib and its n-desethyl metabolite SU12662 in human plasma by ultra performance liquid chromatography/tandem triple-quadrupole mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 4, p. 934-941, 2010.

DE CAMPOS, A. M.; DIEBOLD, Y.; CARVALHO, E. L. S.; SÁNCHEZ, A.; ALONSO, M. J. Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems: In vitro stability, in vivo fate, and cellular toxicity. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 5, p. 803-810, 2004.

DE QUEIROS, W. P.; NETO, D. D.; ALONSO, A. Dynamics and partitioning of spin-labeled stearates into the lipid domain of stratum corneum. **Journal of Controlled Release**, v. 106, n. 3, p. 374-385, 2005.

DETRY, B.; BLACHER, S.; ERPICUM, C.; PAUPERT, J.; MAERTENS, L.; MAILLARD, C.; MUNAUT, C.; SOUNNI, N. E.; LAMBERT, V.; FOIDART, J. M.; RAKIC, J. M.; CATALDO, D.; NOEL, A. Sunitinib Inhibits Inflammatory Corneal Lymphangiogenesis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 54, n. 5, p. 3082-3093, 2013.

DI TOMMASO, C.; TORRIGLIA, A.; FURRER, P.; BEHAR-COHEN, F.; GURNY, R.; MOLLER, M. Ocular biocompatibility of novel Cyclosporin A formulations based on methoxy poly(ethylene glycol)-hexylsubstituted poly(lactide) micelle carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 2, p. 515-524, 2011.

DIEBOLD, Y.; CALONGE, M. Applications of nanoparticles in ophthalmology. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 29, n. 6, p. 596-609, 2010.

DORRELL, M.; UUSITALO-JARVINEN, H.; AGUILAR, E.; FRIEDLANDER, M. Ocular neovascularization: Basic mechanisms and therapeutic advances. **Survey of Ophthalmology**, v. 52, p. S3-S19, 2007.

DOS SANTOS, H. M.; OLIVEIRA, D. F.; DE CARVALHO, D. A.; PINTO, J. M. A.; CAMPOS, V. A. C.; MOURAO, A. R. B.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 2, p. 231-238, 2010.

DRAGICEVIC-CURIC, N.; SCHEGLMANN, D.; ALBRECHT, V.; FAHR, A. Temoporfin-loaded invasomes: Development, characterization and in vitro skin penetration studies. **Journal of Controlled Release**, v. 127, n. 1, p. 59-69, 2008.

DU TOIT, L. C.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E.; GOVENDER, T.; CARMICHAEL, T. Ocular drug delivery - a look towards nanobioadhesives. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 8, n. 1, p. 71-94, 2011.

EBRAHIM, S.; PEYMAN, G. A.; LEE, P. J. Applications of liposomes in ophthalmology. **Survey of Ophthalmology**, v. 50, n. 2, p. 167-182, 2005.

ESPUELAS, M. S.; LEGRAND, P.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BARRATT, G.; IRACHE, J. M. In vitro antileishmanial activity of amphotericin B loaded in poly(epsilon-caprolactone) nanospheres. **Journal of Drug Targeting**, v. 10, n. 8, p. 593-599, 2002.

ETIENNE-GRIMALDI, M.-C.; RENÉE, N.; IZZEDINE, H.; MILANO, G. A routine feasible HPLC analysis for the anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitor, sunitinib, and

its main metabolite, SU12662, in plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 29, p. 3757-3761, 2009.

FREZARD, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 2, p. 181-189, 1999.

FUNAKOSHI, T.; LATIF, A.; GALSKEY, M. D. Risk of hematologic toxicities in cancer patients treated with sunitinib: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 7, p. 818-830, 2013.

FURRER, P.; MAYER, J. M.; GURNY, R. Ocular tolerance of preservatives and alternatives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, n. 3, p. 263-280, 2002.

GAETI, M.P.N. **Efeito da encapsulação em lipossomas sobre a estabilidade físico-química e citotoxicidade *in vitro* do 4-nerolidilcatecol**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

GAETI, M.P.N.; BENFICA, P.L.; MENDES, L.P.; VIEIRA, M.S.; ANJOS, J.L.V.; ALONSO, A.; REZENDE, K.R.; VALADARES, M.C.; LIMA, E.M. Liposomal Entrapment of 4-Nerolidylcatechol: Impact on Phospholipid Dynamics, Drug Stability and Bioactivity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 1-10, 2014. *In press*.

GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 8, p. 1428-1439, 2004.

GAN, L.; WANG, J.; JIANG, M.; BARTLETT, H.; OUYANG, D. F.; EPERJESI, F.; LIU, J. P.; GAN, Y. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5-6, p. 290-297, 2013.

GASCO, M.R. Method of producing solid lipid microspheres having narrow size distribution. **US Patent No. 5250236**, 1993.

GAUDANA, R.; JWALA, J.; BODDU, S. H. S.; MITRA, A. K. Recent Perspectives in Ocular Drug Delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1197-1216, 2009.

GOKCE, E. H.; SANDRI, G.; EGRILMEZ, S.; BONFERONI, M. C.; GUNERI, T.; CARAMELLA, C. Cyclosporine A-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Ocular Tolerance and In Vivo Drug Release in Rabbit Eyes. **Current Eye Research**, v. 34, n. 11, p. 996-1003, 2009.

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

GONZALEZ, L.; LOZA, R. J.; HAN, K. Y.; SUNOQROT, S.; CUNNINGHAM, C.; PURTA, P.; DRAKE, J.; JAIN, S.; HONG, S.; CHANG, J. H. Nanotechnology in Corneal Neovascularization Therapy-A Review. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 2, p. 124-134, 2013.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; THOMAZINI, J. A.; LOPEZ, R. F. V. Excised Porcine Cornea Integrity Evaluation in an in vitro Model of Iontophoretic Ocular Research. **Ophthalmic Research**, v. 43, n. 4, p. 208-216, 2010.

GREGORIADIS, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. **Trends in Biotechnology**, v. 13, n. 12, p. 527-537, 1995.

GULATI, M.; GROVER, M.; SINGH, S.; SINGH, M. Lipophilic drug derivatives in liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 165, n. 2, p. 129-168, 1998.

HAAG, S. F.; CHEN, M.; PETERS, D.; KECK, C. M.; TASKOPARAN, B.; FAHR, A.; TEUTLOFF, C.; BITTL, R.; LADEMANN, J.; SCHÄFER-KORTING, M.; MEINKE, M. C. Nanostructured lipid carriers as nitroxide depot system measured by electron paramagnetic resonance spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 421, n. 2, p. 364-369, 2011.

HAMALAINEN, K. M.; KANANEN, K.; AURIOLA, S.; KONTTURI, K.; URTTI, A. Characterization of paracellular and aqueous penetration routes in cornea, conjunctiva, and sclera. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, n. 3, p. 627-634, 1997.

HAYASHI, K.; MORI, T.; ABO, T.; OOSHIMA, K.; HAYASHI, T.; KOMANO, T.; TAKAHASHI, Y.; SAKAGUCHI, H.; TAKATSU, A.; NISHIYAMA, N. Two-stage bottom-up tiered approach combining several alternatives for identification of eye irritation potential of chemicals including insoluble or volatile substances. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 7, p. 1199-1208, 2012.

HIPPALGAONKAR, K.; ADELLI, G. R.; REPKA, M. A.; MAJUMDAR, S. Indomethacin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Ocular Delivery: Development, Characterization, and In Vitro Evaluation. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 2, p. 216-228, 2013.

HIRNLE, E.; HIRNLE, P.; WRIGHT, J. K. DISTRIBUTION OF LIPOSOME-INCORPORATED CARBOXYFLUORESCHEIN IN RABBIT EYES. **Journal of Microencapsulation**, v. 8, n. 3, p. 391-399, 1991.

HIRONAKA, K.; INOKUCHI, Y.; TOZUKA, Y.; SHIMAZAWA, M.; HARA, H.; TAKEUCHI, H. Design and evaluation of a liposomal delivery system targeting the posterior segment of the eye. **Journal of Controlled Release**, v. 136, n. 3, p. 247-253, 2009.

HONDA, M.; ASAI, T.; OKU, N.; ARAKI, Y.; TANAKA, M.; EBIHARA, N. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on ocular targets. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 495-504, 2013.

HOSNY, K. M. Preparation and Evaluation of Thermosensitive Liposomal Hydrogel for Enhanced Transcorneal Permeation of Ofloxacin. **Aaps Pharmscitech**, v. 10, n. 4, p. 1336-1342, 2009.

ICH. **International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use**, 2005.

ICCVAM. **ICCVAM-Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test  $\bar{\chi}$  Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method**: NIH Publication 2010.

IZZEDINE, H.; BUHAESCU, I.; RIXE, O.; DERAY, G. Sunitinib malate. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 357-364, 2007.

JARVINEN, K.; JARVINEN, T.; URTTI, A. OCULAR ABSORPTION FOLLOWING TOPICAL DELIVERY. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 1, p. 3-19, 1995.

JIAO, J. Polyoxyethylated nonionic surfactants and their applications in topical ocular drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1663-1673, 2008.

JONES, M. N. THE SURFACE-PROPERTIES OF PHOSPHOLIPID LIPOSOME SYSTEMS AND THEIR CHARACTERIZATION. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 54, p. 93-128, 1995.

KALAM, M. A.; SULTANA, Y.; ALI, A.; AQIL, M.; MISHRA, A. K.; CHUTTANI, K. Preparation, characterization, and evaluation of gatifloxacin loaded solid lipid nanoparticles as colloidal ocular drug delivery system. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, n. 3, p. 191-204, 2010.

KATRAGADDA, S.; TALLURI, R. S.; MITRA, A. K. Modulation of P-glycoprotein-mediated efflux by prodrug derivatization: An approach involving peptide transporter-mediated influx across rabbit cornea. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 22, n. 2, p. 110-120, 2006.

KAUR, I. P.; GARG, A.; SINGLA, A. K.; AGGARWAL, D. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 1, p. 1-14, 2004.

KAUR, J.; TIKOO, K. p300/CBP dependent hyperacetylation of histone potentiates anticancer activity of gefitinib nanoparticles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 5, p. 1028-1040, 2013.

KEATING, A. M.; JACOBS, D. S. Anti-VEGF Treatment of Corneal Neovascularization. **Ocular Surface**, v. 9, n. 4, p. 227-238, 2011.

KIM, H.; CHOI, J.-S.; KIM, K. S.; YANG, J.-A.; JOO, C.-K.; HAHN, S. K. Flt1 peptide-hyaluronate conjugate micelle-like nanoparticles encapsulating genistein for the treatment of ocular neovascularization. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 11, p. 3932-3940, 2012.

KIM, S. Y.; LEE, Y. M. Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly(epsilon-caprolactone) as novel anticancer drug carriers. **Biomaterials**, v. 22, n. 13, p. 1697-1704, 2001.

KO, B. Y.; KIM, Y. S.; BAEK, S. G.; LEE, G. W.; KIM, J. M.; JEAN, W. S.; LEE, N. S.; KANG, J. Inhibition of Corneal Neovascularization by Subconjunctival and Topical Bevacizumab and Sunitinib in a Rabbit Model. **Cornea**, v. 32, n. 5, p. 689-695, 2013.

KOMATSU, H.; SAITO, H.; OKADA, S.; TANAKA, M.; EGASHIRA, M.; HANDA, T. Effects of the acyl chain composition of phosphatidylcholines on the stability of freeze-dried small liposomes in the presence of maltose. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 113, n. 1. 2, p. 29-39, 2001.

KUMAR, M. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 234-258, 2000.

KUMAR, V. V.; CHANDRASEKAR, D.; RAMAKRISHNA, S.; KISHAN, V.; RAO, Y. M.; DIWAN, P. V. Development and evaluation of nitrendipine loaded solid lipid nanoparticles: Influence of wax and glyceride lipids on plasma pharmacokinetics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 335, n. 1-2, p. 167-175, 2007.

LANG, J. C. OCULAR DRUG-DELIVERY CONVENTIONAL OCULAR FORMULATIONS. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 1, p. 39-43, 1995.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 307-321, 1998.

LEE, P.; WANG, C. C.; ADAMIS, A. P. Ocular neovascularization: An epidemiologic review. **Survey of Ophthalmology**, v. 43, n. 3, p. 245-269, 1998.

LI, X.; LI, R.; QIAN, X.; DING, Y.; TU, Y.; GUO, R.; HU, Y.; JIANG, X.; GUO, W.; LIU, B. Superior antitumor efficiency of cisplatin-loaded nanoparticles by intratumoral delivery with decreased tumor metabolism rate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 3, p. 726-734, 2008.

LI, X.; NIE, S. F.; KONG, J.; LI, N.; JU, C. Y.; PAN, W. S. A controlled-release ocular delivery system for ibuprofen based on nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1-2, p. 177-182, 2008.

LI, Z.; YAO, L.; LI, J.; ZHANG, W.; WU, X.; LIU, Y.; LIN, M.; SU, W.; LI, Y.; LIANG, D. Celastrol nanoparticles inhibit corneal neovascularization induced by suturing in rats. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 1163-1173, 2012.

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R. H.; MÄDER, K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 214, n. 1-2, p. 9-12, 2001.

LIU, Q.; LI, R.; ZHU, Z.; QIAN, X.; GUAN, W.; YU, L.; YANG, M.; JIANG, X.; LIU, B. Enhanced antitumor efficacy, biodistribution and penetration of docetaxel-loaded biodegradable nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1. 2, p. 350-358, 2012.

LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1595-1639, 2005.

LUO, Y.; CHEN, D.; REN, L.; ZHAO, X.; QIN, J. Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 53-59, 2006.

MAHMOUD, S. S.; GEHMAN, J. D.; AZZOPARDI, K.; ROBINS-BROWNE, R. M.; SEPAROVIC, F. Liposomal phospholipid preparations of chloramphenicol for ophthalmic applications. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 7, p. 2691-2701, 2008.

MAITANI, Y.; SAITO, H.; SEISHI, Y.; IWASE, Y.; YAMAUCHI, T.; HIGASHIYAMA, K.; SUGINO, T. A combination of liposomal sunitinib plus liposomal irinotecan and liposome co-loaded with two drugs enhanced antitumor activity in PC12-bearing mouse. **Journal of Drug Targeting**, v. 20, n. 10, p. 873-882, 2012.

MARQUES, M.R.C. Dissolução de medicamentos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2009. Cap. 7.

MASUDA, S.; NAKANO, K.; FUNAKOSHI, K.; ZHAO, G.; MENG, W.; KIMURA, S.; MATOBA, T.; MIYAGAWA, M.; IWATA, E.; SUNAGAWA, K.; EGASHIRA, K. Imatinib Mesylate-Incorporated Nanoparticle-Eluting Stent Attenuates In-Stent Neointimal Formation in Porcine Coronary Arteries. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 18, n. 12, p. 1043-1053, 2011.

MAZZARINO, L.; TRAVELET, C.; ORTEGA-MURILLO, S.; OTSUKA, I.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; LEMOS-SENNA, E.; BORSALI, R. Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 370, n. 1, p. 58-66, 2012.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2-3, p. 165-196, 2001.

\_\_\_\_\_. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 83-101, 2012.

MEISNER, D.; MEZEI, M. LIPOSOME OCULAR DELIVERY SYSTEMS. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 1, p. 75-93, 1995.

MENZEL-SEVERING, J. Emerging techniques to treat corneal neovascularisation. **Eye**, v. 26, n. 1, p. 2-12, 2012.

MOHAMMADI, G.; NOKHODCHI, A.; BARZEGAR-JALALI, M.; LOTFIPOUR, F.; ADIBKIA, K.; EHYAEI, N.; VALIZADEH, H. Physicochemical and anti-bacterial performance characterization of clarithromycin nanoparticles as colloidal drug delivery system. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 39-44, 2011.

MOYA-ORTEGA, M. D.; ALVES, T. F. G.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A.; STEFANSSON, E.; THORSTEINSDOTTIR, M.; LOFTSSON, T. Dexamethasone eye drops containing gamma-cyclodextrin-based nanogels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1-2, p. 507-515, 2013.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery . a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.

MURPHY, E. A.; MAJETI, B. K.; MUKTHAVARAM, R.; ACEVEDO, L. M.; BARNES, L. A.; CHERESH, D. A. Targeted Nanogels: A Versatile Platform for Drug Delivery to Tumors. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 6, p. 972-982, 2011.

MUSUMECI, T.; BUCOLO, C.; CARBONE, C.; PIGNATELLO, R.; DRAGO, F.; PUGLISI, G. Polymeric nanoparticles augment the ocular hypotensive effect of melatonin in rabbits. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, n. 2, p. 135-140, 2013.

NAGARWAL, R. C.; KANT, S.; SINGH, P. N.; MAITI, P.; PANDIT, J. K. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 136, n. 1, p. 2-13, 2009.

OLIVEIRA, R. R.; FERREIRA, F. S.; CINTRA, E. R.; BRANQUINHO, L. C.; BAKUZIS, A. F.; LIMA, E. M. Magnetic Nanoparticles and Rapamycin Encapsulated into Polymeric Nanocarriers. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 193-201, 2012.

OLIVEIRA, R.R. **Desenvolvimento, caracterização e estudo de liberação *in vitro* por magnetohipertermia de paclitaxel em nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

PAPATHANASSIOU, M.; THEODOROPOULOU, S.; ANALITIS, A.; TZONOU, A.; THEODOSSIADIS, P. G. Vascular Endothelial Growth Factor Inhibitors for Treatment of Corneal Neovascularization: A Meta-Analysis. **Cornea**, v. 32, n. 4, p. 435-444, 2013.

PEREZ-SANTONJA, J. J.; CAMPOS-MOLLO, E.; LLEDO-RIQUELME, M.; JAVALOY, J.; ALIO, J. L. Inhibition of Corneal Neovascularization by Topical Bevacizumab (Anti-VEGF) and Sunitinib (Anti-VEGF and Anti-PDGF) in an Animal Model. **American Journal of Ophthalmology**, v. 150, n. 4, p. 519-528, 2010.

PIGNATELLO, R.; BUCOLO, C.; FERRARA, P.; MALTESE, A.; PULEO, A.; PUGLISI, G. Eudragit RS100 (R) nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 1-2, p. 53-61, 2002.

PROW, T. W. Toxicity of nanomaterials to the eye. **Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 4, p. 317-333, 2010.

REGENFUSS, B.; BOCK, F.; CURSIEFEN, C. Corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 12, n. 5, p. 548-554, 2012.

REMKO, M.; BOHAC, A.; KOVACIKOVA, L. Molecular structure, pKa, lipophilicity, solubility, absorption, polar surface area, and blood brain barrier penetration of some antiangiogenic agents. **Structural Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 635-648, 2011.

RODAMER, M.; ELSINGHORST, P. W.; KINZIG, M.; GÜTSCHOW, M.; SÖRGEL, F. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry procedure for the quantification of sunitinib (SU11248) and its active metabolite, N-desethyl sunitinib (SU12662), in human plasma: Application to an explorative study. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 11. 12, p. 695-706, 2011.

SABZEVARI, A.; ADIBKIA, K.; HASHEMI, H.; HEDAYATFAR, A.; MOHSENZADEH, N.; ATYABI, F.; GHAHREMANI, M. H.; DINARVAND, R. Polymeric triamcinolone acetonide nanoparticles as a new alternative in the treatment of uveitis: In vitro and in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 1, p. 63-71, 2013.

SAHOO, S. K.; DIINAWAZ, F.; KRISHNAKUMAR, S. Nanotechnology in ocular drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3-4, p. 144-151, 2008.

SASAKI, H.; YAMAMURA, K.; NISHIDA, K.; NAKAMURA, J.; ICHIKAWA, M. Delivery of drugs to the eye by topical application. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 15, n. 2, p. 583-620, 1996.

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

SCHELLENS, J. H. M.; MALINGRE, M. M.; KRUIJTZER, C. M. F.; BARDELMEIJER, H. A.; VAN TELLINGEN, O.; SCHINKEL, A. H.; BEIJNEN, J. H. Modulation of oral bioavailability of anticancer drugs: from mouse to man. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 2, p. 103-110, 2000.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W.; LUCKS, J. S.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. **Journal of Controlled Release**, v. 30, n. 1, p. 83-96, 1994.

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

SHAFAA, M. W.; EL SHAZLY, L. H.; EL SHAZLY, A. H.; EL GOHARY, A. A.; EL HOSSARY, G. G. Efficacy of topically applied liposome-bound tetracycline in the treatment of dry eye model. **Veterinary Ophthalmology**, v. 14, n. 1, p. 18-25, 2011.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, n. 2, p. 123-140, 1997.

SHEN, Y.; TU, J. Preparation and ocular pharmacokinetics of ganciclovir liposomes. **Aaps Journal**, v. 9, n. 3, 2007.

SCHNEIDER, D.J., FREED, J.H., 1989. **Spin labeling. Theory and applications**. L.J. Berliner, J. Reuben (Eds.), Biological Magnetic Resonance, Plenum Press, New York (1989).

SHENOY, V. S.; RAJYAGURU, T. H.; GUDE, R. P.; MURTHY, R. S. R. Studies on paclitaxel-loaded glyceryl monostearate nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 6, p. 471-478, 2009.

SINGLETON, B. K.; LIBRETTO, S. E.; SIBLEY, P. R.; MIFSUD, C. V. J.; ANDREWS, C. M. AN IN-VITRO HEMOLYSIS TEST AS AN ALTERNATIVE TO THE DRAIZE TEST FOR OCULAR IRRITATION. **Comparative Haematology International**, v. 4, n. 1, p. 49-54, 1994.

SJOSTROM, B.; BERGENSTAHL, B. Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions. I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 88, n. 1-3, p. 53-62, 1992.

SOOD, S.; JAWAHAR, N.; JAIN, K.; GOWTHAMARAJAN, K.; MEYYANATHAN, S. N. Olanzapine Loaded Cationic Solid Lipid Nanoparticles for Improved Oral Bioavailability. **Current Nanoscience**, v. 9, n. 1, p. 26-34, 2013.

SOUZA, L. G.; SILVA, E. J.; MARTINS, A. L. L.; MOTA, M. F.; BRAGA, R. C.; LIMA, E. M.; VALADARES, M. C.; TAVEIRA, S. F.; MARRETO, R. N. Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 189-196, 2011.

TAYEL, S. A.; EL-NABARAWI, M. A.; TADROS, M. I.; ABD-ELSALAM, W. H. Positively Charged Polymeric Nanoparticle Reservoirs of Terbinafine Hydrochloride: Preclinical Implications for Controlled Drug Delivery in the Aqueous Humor of Rabbits. **Aaps Pharmscitech**, v. 14, n. 2, p. 782-793, 2013.

**Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage.** OECD Publishing, 2013.

THANKI, K.; GANGWAL, R. P.; SANGAMWAR, A. T.; JAIN, S. Oral delivery of anticancer drugs: Challenges and opportunities. **Journal of Controlled Release**, v. 170, n. 1, p. 15-40, 2013.

TRUMMER, B. J.; IYER, V.; BALU-IYER, S. V.; O'CONNOR, R.; STRAUBINGER, R. M. Physicochemical properties of epidermal growth factor receptor inhibitors and development of a nanoliposomal formulation of gefitinib. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 8, p. 2763-2776, 2012.

VAN SWAAY, D.; DEMELLO, A. Microfluidic methods for forming liposomes. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 5, p. 752-767, 2013.

VANDERVEEN, G.; BROERSMA, L.; DIJKSTRA, C. D.; VANROOIJEN, N.; VANRIJ, G.; VANDERGAAG, R. PREVENTION OF CORNEAL ALLOGRAFT-REJECTION IN RATS TREATED WITH SUBCONJUNCTIVAL INJECTIONS OF LIPOSOMES CONTAINING DICHLOROMETHYLENE DIPHOSPHONATE. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 35, n. 9, p. 3505-3515, 1994.

VERSTRAELEN, S.; JACOBS, A.; DE WEVER, B.; VANPARYS, P. Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as an in vitro alternative to the Draize rabbit eye irritation test. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 4, p. 1298-1311, 2013.

VIEIRA, M.S. **Implementação de métodos alternativos ao uso de animais aplicados para investigação de alguns parâmetros de toxicidade e eficácia da molécula fotoprotetora LQFM 048**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

VIVEK, K.; REDDY, H.; MURTHY, R. S. R. Investigations of the effect of the lipid matrix on drug entrapment, in vitro release, and physical stability of olanzapine-loaded solid lipid nanoparticles. **Aaps Pharmscitech**, v. 8, n. 4, 2007.

WEINER, A. L.; GILGER, B. C. Advancements in ocular drug delivery. **Veterinary Ophthalmology**, v. 13, n. 6, p. 395-406, 2010.

WESTESEN, K.; BUNJES, H.; KOCH, M. H. J. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. **Journal of Controlled Release**, v. 48, n. 2. 3, p. 223-236, 1997.

WIEBER, A.; SELZER, T.; KREUTER, J. Characterisation and stability studies of a hydrophilic decapeptide in different adjuvant drug delivery systems: A comparative study of PLGA nanoparticles versus chitosan-dextran sulphate microparticles versus DOTAP-liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 421, n. 1, p. 151-159, 2011.

WOODLE, M. C. Sterically stabilized liposome therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 2. 3, p. 249-265, 1995.

XU, Q.; KAMBHAMPATI, S. P.; KANNAN, R. M. Nanotechnology approaches for ocular drug delivery. **Middle East African journal of ophthalmology**, v. 20, n. 1, p. 26-37, 2013.

YANG, L. P. H.; MCKEAGE, K. Intravitreal Aflibercept (Eylea (R)): A Review of Its Use in Patients with Macular Oedema Secondary to Central Retinal Vein Occlusion. **Drugs & Aging**, v. 31, n. 5, p. 395-404, 2014.

YOUSHA, J.; KAMEL, A. O.; EL SHAMY, A.; MANSOUR, S. Design of cationic nanostructured heterolipid matrices for ocular delivery of methazolamide. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 2483-2496, 2012.

YUAN, X. B.; YUAN, Y. B.; JIANG, W.; LIU, J.; TIAN, E. J.; SHUN, H. M.; HUANG, D. H.; YUAN, X. Y.; LI, H.; SHENG, J. Preparation of rapamycin-loaded chitosan/PLA nanoparticles for immunosuppression in corneal transplantation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, n. 1-2, p. 241-248, 2008.

ZHANG, H.; LI, X. L.; DING, J.; XU, H.; DAI, X. Z.; HOU, Z. B.; ZHANG, K.; SUN, K.; SUN, W. H. Delivery of ursolic acid (UA) in polymeric nanoparticles effectively promotes the apoptosis of gastric cancer cells through enhanced inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1-2, p. 261-268, 2013.

ZHAO, Y. P.; SUKBUNTHONG, J.; ANTONIAN, L. Simultaneous determination of Z-SU5416 and its interconvertible geometric E-isomer in rat plasma by LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 3, p. 513-522, 2004.

ZHOU, N.; ZAN, X.; WANG, Z.; WU, H.; YIN, D.; LIAO, C.; WAN, Y. Galactosylated chitosan. polycaprolactone nanoparticles for hepatocyte-targeted delivery of curcumin. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 420-429, 2013.