

**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



**Nanopartículas como Sistemas de Veiculação de  
Fármacos para a Via Ocular**

**Jennifer Antunes Lima**

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2020**

# Universidade de Lisboa Faculdade de Farmácia



## Nanopartículas como Sistemas de Veiculação de Fármacos para a Via Ocular

**Jennifer Antunes Lima**

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentada à  
Universidade Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientador: Investigadora Principal, Doutora Lídia Maria Diogo Gonçalves**

**2020**

## Resumo

A administração ocular de fármacos constitui, ainda nos dias de hoje, um desafio devido à complexa arquitetura do olho. Atualmente, grande parte das formulações comercializadas apresentam-se sob a forma de colírio, não só devido à sua simplicidade de utilização e pela elevada adesão por parte do doente, mas também pelo facto de se tratar de uma solução terapêutica não invasiva. No entanto, a biodisponibilidade ocular dos fármacos administrados topicamente é limitada, tanto pelas propriedades físico-químicas pouco favoráveis das substâncias ativas, como pelos diversos mecanismos de proteção do olho, que são responsáveis por impedir a entrada de xenobióticos. Se por um lado, os tratamentos tópicos convencionais não conseguem entregar o fármaco no local de ação pretendido, por outro, as injeções intravítreas entregam o fármaco diretamente na cavidade vítrea. Contudo, injeções frequentes podem provocar efeitos adversos como por exemplo, descolamento da retina, endoftalmite e hemorragia na retina. Deste modo, torna-se urgente continuar a investigar formas para melhorar a penetração na estrutura ocular, aumentar a biodisponibilidade do fármaco e prolongar o tempo de retenção na superfície ocular. Nos últimos anos, novos sistemas de veiculação de fármacos foram propostos para contornar os principais problemas das formulações oftálmicas convencionais. As nanopartículas surgiram como transportadores promissores, dando origem a colírios e soluções injetáveis “modificados” com o objetivo de melhorar a eficácia do medicamento, sem comprometer a sua segurança e a adesão do doente. Esta revisão aborda não só os diferentes fatores envolvidos no desenvolvimento de nanopartículas como sistemas veiculadores de fármacos, com especial ênfase nas nanopartículas poliméricas, lipídicas e nas de ouro, como também os desafios regulamentares implicados no desenvolvimento das nanopartículas. Por fim, são apresentadas algumas orientações adicionais publicadas pela Agência Europeia do Medicamento, de forma a ultrapassar determinadas questões regulamentares devido à natureza multidisciplinar dos sistemas nanoparticulados com aplicações no campo terapêutico de determinadas patologias oculares.

Palavras-chave: sistemas de veiculação de fármacos; nanopartículas; via oftálmica; segmento anterior; segmento posterior

## **Abstract**

Ocular drug administration still remains a challenge nowadays due to the complex architecture of the eye. Currently, most of the commercialized formulations are presented in the form of eye drops, not only due to their simplicity of use and the high compliance by the patient, but also because it is a non-invasive therapeutic solution. However, the ocular bioavailability of topically administered drugs is limited, both by the unfavorable physicochemical properties of the active substances, and by the various protective mechanisms of the eye, which are responsible for preventing the entry of xenobiotics. If, on the one hand, conventional topical treatments fail to deliver the drug to the intended site of action, on the other, intravitreal injections deliver the drug directly to the vitreous cavity. However, frequent injections can cause adverse effects such as retinal detachment, endophthalmitis and retinal hemorrhage. Thus, there is an urgent need to continue investigating ways to improve penetration into the ocular structure, increase bioavailability and prolong the retention time on the ocular surface. In recent years, new drug delivery systems have been proposed to overcome the main problems of conventional ophthalmic formulations. Nanoparticles have emerged as promising carriers, giving rise to “modified” eye drops and injectable solutions with the aim of improving the effectiveness of the drug, without compromising its safety and patient compliance. This review addresses not only the different factors involved in the development of nanoparticles as drug delivery systems, with a special emphasis on polymeric, lipidic and gold nanoparticles, but also the regulatory challenges involved in the development of nanoparticles. Finally, some additional guidelines published by the European Medicines Agency are presented in order to overcome certain regulatory issues due to the multidisciplinary nature of nanoparticulate systems with applications in the therapeutic field of certain ocular pathologies.

Keywords: drug delivery systems; nanoparticles; ophthalmic route; anterior segment; posterior segment

## Listagem de abreviaturas

<b>AH</b>	Ácido hialurónico
<b>AH-SH</b>	Complexo de ácido hialurónico e grupos tiol
<b>AuNP</b>	Gold nanoparticles
<b>BHR</b>	Barreira hemato-retiniana
<b>CAM</b>	Ensaio da membrana corioalantóide
<b>CFL</b>	Conjugados fármaco-lípido
<b>DMRI</b>	Degenerescência macular relacionada com a idade
<b>EHL</b>	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
<b>EMA</b>	European Medicines Agency
<b>EMD</b>	Edema macular diabético
<b>EPR</b>	Epitélio pigmentar da retina
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>HPMC</b>	Hidroxipropilmetilcelulose
<b>NL</b>	Nanopartículas lipídicas
<b>NLS</b>	Nanopartículas lipídicas solidas
<b>NP</b>	Nanopartículas
<b>NP-QS</b>	Nanopartículas à base de quitosano
<b>NP QS-AH</b>	Nanopartículas compostas por quitosano e ácido hialurónico
<b>NVR</b>	Neovascularização da retina
<b>OVR</b>	Oclusão venosa retiniana
<b>PACA</b>	Poli(alquil-cianoacrilato)
<b>PCL</b>	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>PLGA</b>	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
<b>RD</b>	Retinopatia diabética
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigénio
<b>TPP</b>	Tripolifosfato de sódio
<b>UE</b>	União europeia
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b>VLN</b>	Veículos lipídicos nanoestruturados

## Índice

1. Objetivos do trabalho .....	8
2. Materiais e Métodos .....	9
3. Introdução .....	10
4. Anatomia e Fisiologia Ocular .....	11
5. Farmacocinética ocular.....	14
5.1. Barreiras do segmento anterior com influência na biodisponibilidade ocular .....	15
5.2. Barreiras do segmento posterior com influência na biodisponibilidade ocular .....	17
6. Nanopartículas como sistemas de transporte de fármacos para o segmento anterior ...	18
6.1. Nanopartículas poliméricas .....	20
6.1.1. Nanopartículas de poli(alquil-cianoacrilato).....	21
6.1.2. Nanopartículas híbridas de quitosano-ácido hialurónico.....	21
6.2. Nanopartículas lipídicas.....	24
6.2.1. Otimização das nanopartículas lipídicas para a administração tópica ocular... 27	
6.2.2. Case Study: nanopartículas lipídicas como sistemas de veiculação de ciclosporina para a via tópica ocular.....	29
7. Nanopartículas como sistemas de transporte de fármacos para o segmento posterior .	30
7.1. Nanopartículas de ouro .....	31
7.2. Case study: gold nanoparticles revestidas com ácido hialurónico como estratégia terapêutica para o processo de neovascularização no olho.....	32
8. Considerações Regulamentares.....	33
9. Desafios e Perspetivas Futuras .....	35

## **Índice de Figuras**

Figura 1. Principais estruturas anatómicas do olho. Adaptado de Agrahari et al. (2016).....	12
Figura 2. Representação esquemática da estrutura da córnea do olho humano. Adaptado de Pontillo et al. (2019). .....	12
Figura 3. Organização estrutural da retina do olho humano. Adaptado de Cloutier et al. (2017). .....	13
Figura 4. Representação esquemática de entrega de fármacos para a via ocular de uma perspectiva farmacocinética. Adaptado de Whitcup et al. (2017).....	14
Figura 5. Diferentes tipos de Nanopartículas Lipídicas. Adaptado de Battaglia et al. (2016).	27

## **1. Objetivos do trabalho**

O objetivo deste trabalho é a realização de uma pesquisa bibliográfica sobre nanopartículas como sistemas de veiculação de fármacos para a via ocular como alternativas eficazes para as formulações oftálmicas convencionais. Assim, esta revisão pretende discutir os principais obstáculos inerentes à administração ocular de fármacos e descrever de que forma é que as nanopartículas podem constituir uma ferramenta de elevado valor para enfrentar as dificuldades encontradas na entrega de fármacos para a via ocular. Neste trabalho, as diferentes estratégias de formulação de nanopartículas para a entrega de fármacos são abordadas consoante o segmento ocular em que exercem o seu efeito, isto é, se têm como objetivo o tratamento de patologias do segmento anterior do olho ou o tratamento dos distúrbios oculares do segmento posterior.



## 2. Materiais e Métodos

Os materiais e métodos envolvidos na redação desta monografia consistiram numa vasta pesquisa bibliográfica de artigos, capítulos de livros e outros tipos de fontes de informação nas principais plataformas de pesquisa, como a PubMed, Elsevier e Science Direct. Para além disso, foram consultados os *sites* de algumas entidades reguladoras, como a *European Medicines Agency* (EMA) e o INFARMED, sendo que as referências presentes neste trabalho foram recolhidas até outubro de 2020.

O processo de recolha de informação para a elaboração desta monografia partiu de um estudo geral acerca de conceitos elementares na área da nanomedicina, para uma visão mais pormenorizada sobre os diferentes tipos de nanopartículas. Numa primeira fase, foi realizada uma pesquisa sobre as questões anatómicas, fisiológicas e farmacocinéticas do olho para compreender de que forma é que estes domínios influenciam a administração ocular de fármacos. As palavras-chave para a pesquisa nesta fase foram principalmente “nanomedicine”, “eye anatomy”, “ophthalmic diseases”, “ocular pharmacokinetics” e “ocular drug delivery systems”. Após este estudo inicial, seguiu-se uma pesquisa detalhada sobre as formulações inovadoras para a entrega de fármacos para a via ocular, mais concretamente acerca dos diferentes tipos de nanopartículas utilizadas nesta área e considerações regulamentares a ter em conta no desenvolvimento destes sistemas, pesquisando por “nanoparticles”, “polymeric nanoparticles”, “lipid nanoparticles”, “gold nanoparticles” e “regulatory considerations”.

### 3. Introdução

A administração ocular de fármacos acarreta, ainda nos dias de hoje, diversos desafios que se encontram por ultrapassar devido à complexa anatomia do próprio olho (1). A entrada de xenobióticos no globo ocular, através das diferentes vias, é condicionada pelas barreiras estáticas, como as diferentes camadas da córnea, da conjuntiva e pelo epitélio pigmentar da retina (EPR) mas também, pelas barreiras dinâmicas, nomeadamente a taxa de renovação do filme lacrimal e mecanismos de depuração sanguínea e linfática (2).

A anatomia do olho pode ser dividida, de uma forma geral e no que diz respeito à entrega de agentes terapêuticos, em dois segmentos principais: anterior e posterior, sendo as patologias oculares usualmente descritas consoante o segmento afetado (3). Estas duas regiões do globo ocular apresentam dissimilaridades entre si e enfrentam diferentes desafios na administração de fármacos, pelo que devem ser tratadas de forma independente (2). As condições patológicas oculares que envolvem o segmento anterior, como a conjuntivite alérgica, cataratas e secura ocular são tratadas através da administração de colírios tópicos, devido à sua facilidade de aplicação, adequada eficácia e boa relação custo-efetividade (1,2). A baixa biodisponibilidade ocular é a principal desvantagem das formulações oftálmicas aplicadas topicamente. Os mecanismos de defesa ocular, como a rápida drenagem nasolacrimal ou o arrastamento de uma fração do fármaco através das lágrimas, limitam o tempo de residência da molécula na córnea, reduzindo conseqüentemente a sua absorção. Deste modo, é necessária uma elevada frequência de administração deste tipo de formulações para obter o efeito terapêutico desejado (4).

Os distúrbios do segmento posterior, como a retinopatia diabética (RD), o edema macular diabético (EMD), a oclusão venosa retiniana (OVR) e a degenerescência macular relacionada com a idade (DMRI) levam normalmente a uma diminuição da capacidade visual, podendo mesmo levar à perda completa de visão devido a danos provocados na retina. A sobre-expressão do recetor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um dos principais aspetos responsável pela neovascularização da retina e da coroide evidente neste tipo de distúrbios. Atualmente, para tratamento de neovascularização no segmento posterior do olho existe uma infinidade de agentes anti-VEGF no mercado europeu, nomeadamente o ranibizumab (Lucentis®), o bevacizumab (*off-label*) e o aflibercept. Estes fármacos são administrados por injeções na cavidade vítrea, pelo que apresentam algumas desvantagens, nomeadamente hemorragia retiniana, descolamento da retina e fraca adesão à terapêutica por parte do doente (1).

Os principais obstáculos que surgem no transporte dos fármacos aos seus respetivos alvos terapêuticos prendem-se por um lado com as diferentes vias de administração e por outro,

pela natureza da estrutura ocular, já anteriormente mencionado. Desta forma, torna-se evidente a necessidade de desenvolver sistemas de veiculação de fármacos inovadores para a administração oftálmica que superem as limitações atuais. Alguns dos aspetos que têm de ser considerados ao desenhar estes sistemas de veiculação de fármacos incluem uma melhoria na precisão da dose, o aumento da biodisponibilidade ocular, a superação das barreiras estáticas e dinâmicas e uma entrega direcionada ao respetivo local de ação do fármaco (2).

O desenvolvimento de novos sistemas de entrega de fármacos para a via ocular, que englobam as nanopartículas, nanomicelas, lentes de contacto com eluição de fármacos, inserções oculares e dispositivos oculares tendo como objetivo aumentar o tempo de residência do fármaco no tecido-alvo e conseqüentemente, desencadear uma melhor resposta farmacológica (1).

Das estratégias anteriormente apresentadas, as nanopartículas serão o foco deste trabalho.

#### **4. Anatomia e Fisiologia Ocular**

O olho pertence ao sistema visual e é o elemento do organismo humano responsável por processar e converter a luz, enquanto estímulo exterior, em impulsos nervosos para que esta informação possa posteriormente ser interpretada pelo cérebro (5).

O globo ocular humano apresenta um diâmetro de cerca de 24 mm e um peso de aproximadamente 7,5 g (6). A sua anatomia pode ser dividida em dois segmentos principais: o segmento anterior e o segmento posterior. De uma perspetiva lateral (Figura 1), do lado externo do segmento anterior está localizada a córnea, seguindo-se a conjuntiva, a íris, o corpo ciliar, a pupila e a lente. O segmento anterior engloba ainda a barreira hemato-aquosa e o humor aquoso. Por sua vez, o compartimento posterior inclui a esclera, a coróide, a mácula, o nervo ótico, a barreira retiniana e a retina em torno da cavidade vítrea, a qual se encontra preenchida pelo humor vítreo (5–7). Ainda na Figura 1, encontra-se também representada a câmara anterior (I); o epitélio pigmentar da retina e o endotélio capilar da retina (II) e a cavidade vítrea (III). Os fármacos administrados podem sair da câmara anterior por difusão através da 1- superfície da íris ou pelo 2- fluxo de humor aquoso. Por outro lado, os fármacos podem ser removidos da cavidade vítrea por difusão para a 3- câmara anterior ou pela 4- barreira hemato-retiniana (Figura 1).

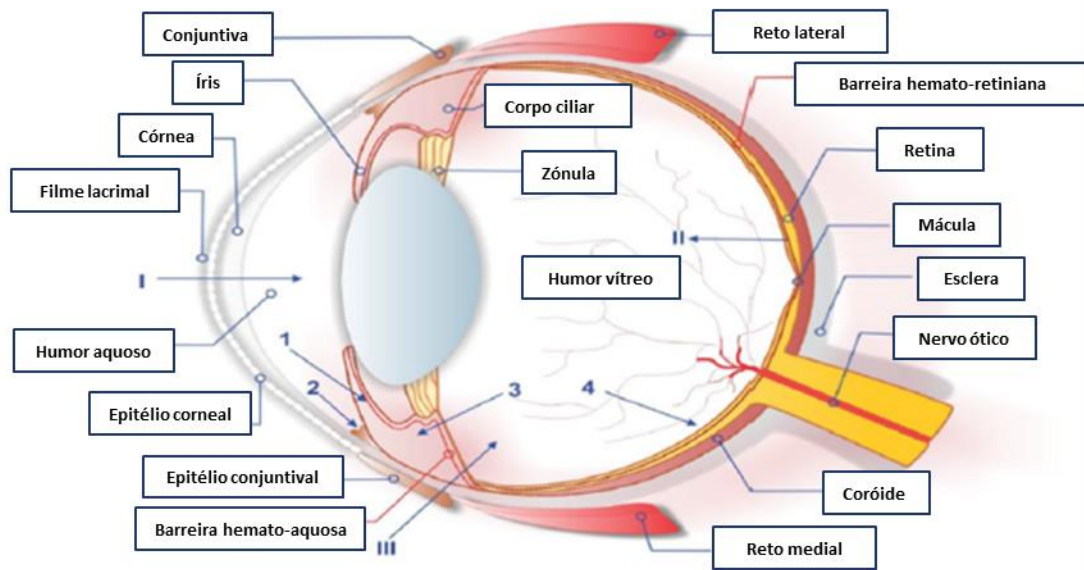


Figura 1. Principais estruturas anatómicas do olho. Adaptado de Agrahari et al. (2016).

A córnea é um tecido avascular que atua como barreira estrutural e que protege o olho contra infecções (8). Em conjunto com o filme lacrimal, a córnea providencia uma superfície refrativa adequada para o olho. Este tecido subdivide-se em três camadas de células, o epitélio, o estroma e o endotélio. A membrana de Bowman encontra-se entre a camada epitelial e o estroma, enquanto que a membrana de Descemet separa o estroma do endotélio (9).

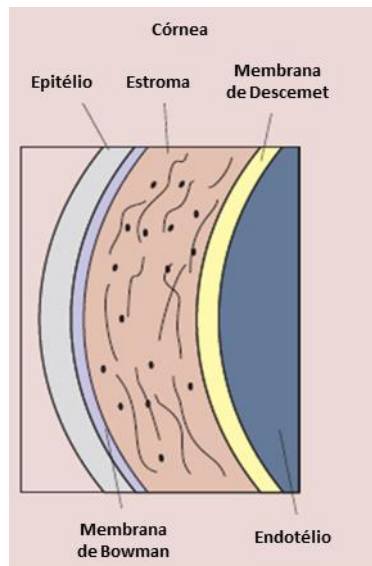


Figura 2. Representação esquemática da estrutura da córnea do olho humano. Adaptado de Pontillo et al. (2019).



A arquitetura globular do olho, a organização da sua estrutura em diferentes compartimentos, a impermeabilidade do epitélio corneal, a secreção lacrimal e as vias de drenagem ocular dificultam a entrada de xenobióticos, contribuindo desta forma para a proteção deste órgão. Deste modo, o conhecimento da anatomia e fisiologia ocular é crucial para o desenvolvimento de sistemas de veiculação de fármacos adequados para a via oftálmica (7).

## 5. Farmacocinética ocular

Os processos farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolização e eliminação determinam o percurso de um medicamento no organismo e a quantidade de fármaco entregue no local de ação. Desta forma, a compreensão destes processos relacionados entre si é fundamental para decidir a dose e a frequência de administração de um medicamento, determinando a sua eficácia e segurança. A entrega de fármacos no segmento anterior do olho compreende aspetos únicos e completamente diferentes da administração de medicamentos no segmento posterior (Figura 4) (2).

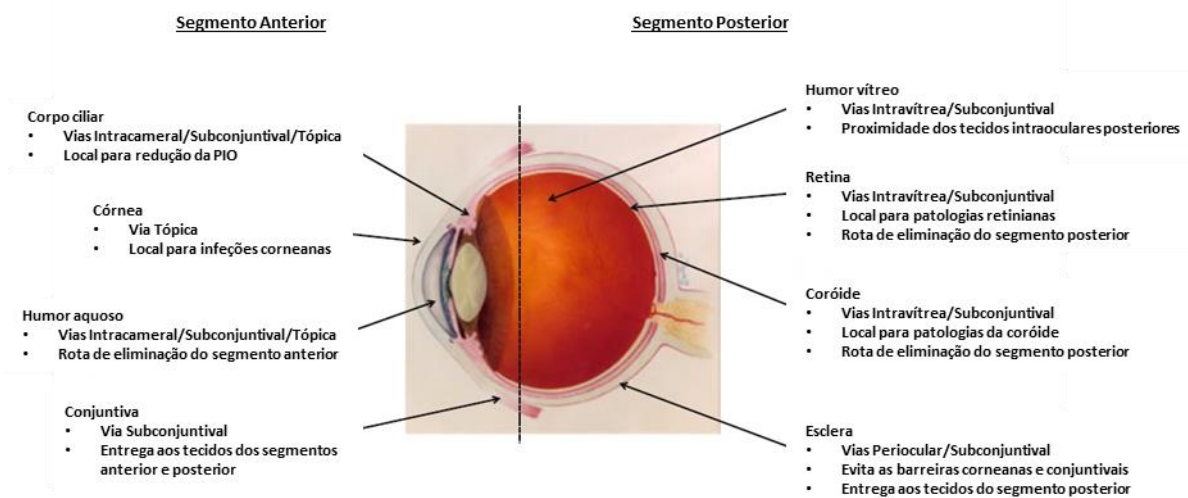


Figura 4. Representação esquemática de entrega de fármacos para a via ocular de uma perspetiva farmacocinética. Adaptado de Whitcup et al. (2017).

Para alcançar o segmento anterior do olho podem ser utilizadas quatro vias de administração diferentes, nomeadamente a via tópica, a via intracamerar, a via subconjuntival e a via sistémica. As principais vias de administração para entrega de fármacos no segmento posterior do olho são as vias tópica, subconjuntival, subretiniana, intravítrea e a via sistémica (2,17).

Devido às características anatómicas e fisiológicas únicas do olho, o processo farmacocinético de um fármaco é afetado não só pelos tecidos oculares, como também por outras barreiras encontradas na via de administração, que serão exploradas ao longo deste capítulo (2).

### **5.1. Barreiras do segmento anterior com influência na biodisponibilidade ocular**

A concentração da molécula terapêutica nos diferentes tecidos oculares varia consoante a forma farmacêutica e a via pela qual esta é administrada (2,7). De forma a seguir um desenvolvimento racional de novas formulações para administrar na via oftálmica, é necessário compreender a natureza das barreiras oculares que limitam a biodisponibilidade do medicamento, assim que este entra em contacto com a superfície ocular (18).

#### *Fatores precorneais*

Após a instilação tópica de um colírio, a primeira barreira do olho é o filme lacrimal. O filme lacrimal consiste em três camadas: uma camada lipídica externa, seguida de uma camada aquosa e uma camada mais interna composta por mucinas. As lágrimas que constituem o filme lacrimal são compostas por água, eletrólitos e diversas proteínas, desempenhando um papel protetor no olho. A presença de substâncias irritantes em algumas formulações pode contribuir para o aumento da produção lacrimal. O volume do filme lacrimal do olho humano em condições normais é de 7-9  $\mu\text{L}$  com uma taxa de renovação de 0,22-0,5  $\mu\text{L} / \text{min}$ , pelo que são necessários apenas alguns minutos para uma remoção completa do medicamento da superfície ocular. Em condições normais, quando o olho não está a pestanejar, a pálpebra consegue conter um máximo 30  $\mu\text{L}$ , valor que é reduzido para 10  $\mu\text{L}$  durante o ato de pestanejar. Isto resulta numa capacidade de retenção limitada do volume instilado, que na maioria dos colírios convencionais no mercado varia entre 25-56  $\mu\text{L}$ . O aumento abrupto de volume provocado pela instilação tópica leva ao pestanejo reflexo provocando uma rápida drenagem nasolacrimal do excesso de formulação. Para além disso, a rápida taxa de renovação do volume lacrimal também contribui para a drenagem do fármaco para o ducto nasolacrimal após a sua instilação. Este mecanismo de drenagem nasolacrimal resulta numa reduzida biodisponibilidade dos colírios formulados de forma convencional e pode levar a efeitos sistémicos indesejáveis. Assim, os fatores que influenciam a taxa de drenagem são os seguintes: o volume instilado, quanto maior o volume instilado, maior será a taxa de drenagem da solução do saco conjuntival; a viscosidade: o aumento da viscosidade da formulação pode

prolongar o tempo de residência da mesma; o pH: a administração de uma formulação com caráter ácido ou alcalino resulta na secreção aumentada de lágrimas, pelo que as preparações oftálmicas devem apresentar um valor de pH compreendido entre 7,0 e 7,7; e a tonicidade: a formulação deve ser isotônica em relação à lágrima, visto que uma formulação hipertônica pode ser imediatamente diluída pelo filme lacrimal. A tonicidade da formulação pode ser ajustada através do uso de cloreto de sódio ou de manitol (2,6,7,17,18).

Manter o olho fechado após a instilação do fármaco e pressionar o saco conjuntival com o dedo constituem ferramentas eficazes para reduzir a absorção sistêmica pela via nasolacrimal, minimizando desta forma a ocorrência de efeitos secundários sistêmicos (2).

#### *Ligação do fármaco às proteínas do filme lacrimal*

O filme lacrimal contém cerca de 0,7% do total de proteínas presentes no nosso organismo, no entanto este valor pode aumentar durante um processo fisiopatológico. Inúmeros fármacos são metabolizados pela ação de certas enzimas, como o citocromo P-450, esterases e peptidases. Para além disso, a ligação da molécula de interesse a estas proteínas lacrimais pode resultar numa redução da concentração do fármaco livre disponível para exercer a sua atividade farmacológica no local alvo (7,18).

#### *Fatores corneais*

Outra barreira é a córnea, que é a principal via de penetração do fármaco no segmento anterior do olho após administração tópica (2). A córnea é composta por três camadas principais – o epitélio, o estroma e o endotélio – como já foi referido no capítulo anterior. As moléculas podem permear através do epitélio da córnea utilizando duas vias, a via transcelular para fármacos de natureza lipofílica ou a via paracelular que favorece a permeação de moléculas pequenas e hidrofílicas (2,7). O epitélio corneal apresenta uma natureza lipofílica, limitando a penetração de moléculas hidrófilas. O estroma possui caráter hidrofílico e compreende 90% da espessura da córnea, restringindo a passagem de moléculas lipofílicas através da córnea. A camada mais interna da córnea é o endotélio e permite a passagem de macromoléculas para o humor aquoso (6,7,17).

#### *Fatores não corneais*

Para além da absorção pela córnea, os fármacos administrados topicamente podem ser absorvidos através de uma via não-corneal – a via da conjuntiva – visto que esta apresenta uma maior área de superfície do que a córnea. A conjuntiva é uma barreira que limita a taxa



de permeação de fármacos solúveis em água, devido à rápida eliminação destes pela circulação sanguínea e linfática. Depois de escapar da eliminação conjuntival, os fármacos penetram na esclera com o objetivo de atingir o segmento anterior (via transescleral) (17).

#### *Barreira hemato-aquosa*

Outro obstáculo à administração de fármacos no segmento anterior do olho é a barreira hemato-aquosa que é constituída por junções estreitas do epitélio não pigmentado do corpo ciliar, junções dos tecidos iridiais e vasos sanguíneos da íris. A sua estrutura também contribui para a restrição da entrada de fármacos na parte anterior do olho (6,7).

#### *Ligação do fármaco à melanina*

Assim que o fármaco atinge o humor aquoso, este pode ser facilmente distribuído para a íris e para o corpo ciliar. A melanina, um pigmento presente na íris e no corpo ciliar, pode influenciar a biodisponibilidade ocular de um fármaco administrado por via tópica. As moléculas do fármaco podem ligar-se a este pigmento, que funciona como um reservatório, a partir do qual o fármaco é lentamente libertado para as células vizinhas, prolongando o efeito terapêutico. Por exemplo, substâncias ativas como a efedrina e o timolol têm uma elevada afinidade para estabelecerem uma ligação com a melanina, sendo que apenas uma pequena fração do fármaco ligado consegue ser libertado a uma taxa muito lenta (7).

## **5.2. Barreiras do segmento posterior com influência na biodisponibilidade ocular**

A esclera, que envolve a camada mais externa do globo ocular, conecta os segmentos anterior e posterior do olho. As suas propriedades únicas, nomeadamente a sua elevada área de superfície em comparação com a córnea e o facto de ser facilmente permeável às moléculas hidrofílicas tornam-na um tecido interessante para entrega de fármacos no segmento posterior (2,6).

O corpo vítreo apresenta uma estrutura de gel composto por 99% de água, proteínas (principalmente colagénio), ácido hialurónico e proteoglicanos de sulfato de condroitina. Uma vez que o humor vítreo consiste num gel viscoso, a difusão das moléculas deste para a retina é muito limitada. As moléculas de grandes dimensões e com carga iónica são difíceis de

transportar para a retina, devido à sua tendência de agregação e pelo facto de poderem interagir com o ácido hialurónico e com o colagénio, ambos carregados negativamente, levando à precipitação dos fármacos no humor vítreo (6).

A penetração da molécula da cavidade vítrea para a coroide é lenta devido ao epitélio pigmentar da retina, enquanto que a difusão do fármaco da cavidade vítrea para a retina é limitada pela membrana limitante interna (7).

A barreira hemato-retiniana (BHR), é uma barreira de transporte especializada entre a circulação sanguínea e a retina. Devido à localização anatómica, a BHR limita o transporte de moléculas da circulação sanguínea da coroide para o segmento posterior do olho (6).

#### *Metabolismo enzimático dos fármacos*

Algumas enzimas, como o citocromo P450, a ciclooxigenase, a monoamina oxidase, a hidrolase e a transferase são expressas em tecidos oculares como a córnea, o cristalino, a íris, o corpo ciliar e a retina e intervêm na metabolização dos fármacos, limitando a sua biodisponibilidade ocular (7).

## **6. Nanopartículas como sistemas de transporte de fármacos para o segmento anterior**

Atualmente, grande parte das formulações para administração oftálmica apresentam-se sob a forma de colírio, não só devido à sua simplicidade de utilização e pela elevada adesão por parte do doente, mas também pelo facto de se tratar de uma solução terapêutica não invasiva. Anti-inflamatórios, corticosteroides, antifúngicos (imidazóis e polienos) e antibióticos são alguns dos fármacos que são utilizados em formulações líquidas para administração tópica ocular. No entanto, a biodisponibilidade ocular dos fármacos administrados topicamente é limitada, tanto pelas propriedades físico-químicas pouco favoráveis das substâncias ativas, como pelos diversos mecanismos do olho que são responsáveis por impedir a entrada de xenobióticos, designadamente a drenagem nasolacrimal, a reduzida área anatómica, o ato de pestanejar de forma reflexa e a degradação metabólica da molécula terapêutica. Além disso, as formulações oftálmicas convencionais, na maioria das situações, não são capazes de ultrapassar as barreiras anatómicas e fisiológicas entre a superfície ocular e as estruturas mais internas do olho. Como resultado, menos de 5% da dose do fármaco administrado consegue penetrar a córnea para alcançar os tecidos intraoculares (1,17–21). O conjunto de

todas estas variáveis, posicionam as estratégias convencionais de entrega de fármacos para a via ocular dentro de uma categoria de terapêuticas com uma eficácia modesta e, conseqüentemente com uma taxa de sucesso limitada. Para que sejam atingidas as concentrações apropriadas de fármaco nos respectivos locais de ação no olho, de forma a que se verifique o efeito terapêutico desejado, são necessárias formulações altamente concentradas e administrações frequentes ao longo do dia. Um padrão de administração repetido e contínuo no tempo pode provocar danos nos tecidos oculares e induzir efeitos adversos a nível sistêmico. Por outro lado, a necessidade de repetidas administrações do medicamento traduz-se numa baixa adesão à terapêutica por parte do doente. Assim sendo, torna-se urgente e necessário aplicar o conhecimento científico no desenvolvimento e na melhoria da penetração na estrutura ocular, da biodisponibilidade e no aumento do tempo de retenção na superfície ocular, de forma a desenvolver sistemas tecnológicos capazes de entregar o fármaco no local de ação específico do olho e com um efeito terapêutico prolongado no tempo (17,18,20).

Os objetivos da entrega de fármacos no segmento anterior do olho envolvem, por um lado o aumento da biodisponibilidade do fármaco nos tecidos extraoculares para aliviar os sinais e sintomas provocados por patologias da superfície ocular do foro inflamatório, como a secura ocular, a conjuntivite, a blefarite e alergias, e por outro lado, a melhoria da biodisponibilidade da molécula terapêutica nos tecidos intraoculares para tratamento de doenças como o glaucoma ou a uveíte. A criação de sistemas de veiculação de fármacos formulados com as características adequadas, que permitem alcançar os tecidos alvo de forma específica, é um dos principais desafios da nanotecnologia. Nos últimos anos verificou-se uma evolução enorme nos diferentes tipos de nanopartículas utilizadas para a entrega de fármacos, oferecendo, deste modo, uma grande versatilidade às formulações oftálmicas. As nanopartículas apresentam mais valias significativas, nomeadamente uma maior eficácia em concentrações mais baixas da substância ativa por um período de tempo mais prolongado e um menor número de efeitos secundários (17,18,21).

As nanopartículas têm sido usadas num vasto número de aplicações oftalmológicas e podem ser preparadas recorrendo a várias técnicas simples, que requerem um reduzido número de processos de purificação, o que se traduz numa elevada eficácia de encapsulação. São exemplos dessas técnicas, a preparação por evaporação do solvente, emulsificação, encapsulação e a gelificação iónica. Para que as nanopartículas consigam passar pelas barreiras oculares e entregar de forma eficaz o fármaco no sítio-alvo, seja por transporte ativo ou passivo, o tamanho destes sistemas carregados com a substância ativa deve estar compreendido entre 50-500nm. Estas podem ser formuladas a partir de diferentes tipos de materiais e para além disso, é possível adicionar grupos funcionais específicos à sua

superfície de modo a que obtenham as características físico-químicas mais favoráveis para alcançar os objetivos supramencionados. A utilização de polímeros bioadesivos na preparação das nanopartículas permite que estes interajam intimamente com os tecidos extraoculares, diminuindo o efeito de remoção pelas lágrimas e conseqüentemente, leva ao aumento da biodisponibilidade do fármaco. Por outro lado, as nanopartículas podem penetrar através dos tecidos que compõem a superfície ocular com a finalidade de veicular a substância ativa até aos tecidos intraoculares. A capacidade de penetração depende das dimensões, da carga superficial e da hidrofiliidade/hidrofobicidade das nanopartículas. Adicionalmente, estes nanosistemas protegem a molécula terapêutica de possíveis degradações enzimáticas e podem fornecer uma libertação controlada da mesma, contribuindo para uma melhoria da biodisponibilidade tanto nos tecidos intra como extraoculares (1,17,21).

### **6.1. Nanopartículas poliméricas**

Os polímeros, tanto sintéticos como naturais, têm sido utilizados para a entrega de fármacos devido à sua natureza biocompatível (22). Os polímeros mais utilizados para aplicações oculares são o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), o polietilenoglicol (PEG), a poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), o quitosano, a albumina e a gelatina. Encontrar o polímero mais adequado ao objetivo terapêutico definido é de grande importância, visto que cada veículo e cada formulação levam a propriedades distintas. A seleção do polímero para a entrega do fármaco na via ocular é definida pela necessidade de um polímero mucoadesivo que possa interagir com a córnea. Os fatores relacionados com o polímero que influenciam a capacidade de interação com a superfície ocular englobam o grau de hidratação do polímero, o peso molecular, a presença de grupos funcionais, a flexibilidade da cadeia e a conformação molecular. A mucoadesividade é responsável por prolongar o tempo de residência na superfície ocular, evitando a rápida eliminação dos fármacos, que é um dos desafios enfrentados pelas formulações tópicas convencionais. Nos últimos anos, diferentes tipos de nanopartículas poliméricas têm sido desenvolvidos para o tratamento de patologias oculares do segmento anterior e posterior (1,22–24).

### **6.1.1. Nanopartículas de poli(alquil-cianoacrilato)**

Foi o trabalho de Patrick Couvrer, no início dos anos 1980, que deu origem às nanopartículas biodegradáveis compostas pelo polímero sintético de poli(alquil-cianoacrilato) (PACA). Recuando 40 anos na história da ciência, o termo “nanomedicina” ainda não existia, contudo, a ideia geral de que a atividade de um medicamento poderia ser otimizada se o fármaco conseguisse alcançar e interagir com o seu alvo terapêutico já se encontrava estabelecida. Devido às excelentes propriedades adesivas do monômero correspondente, o alquil-cianoacrilato, as nanopartículas PACA foram as primeiras nanopartículas a serem investigadas para a entrega de fármacos para a via tópica ocular, tendo sido responsáveis por impulsionar o desenvolvimento dos nanosistemas nesta área terapêutica.

As nanopartículas PACA são produzidas através de polimerizações em emulsão e de polimerizações interfaciais de monômeros, ou através de nanoprecipitação e emulsificação-*evaporação* do solvente a partir de polímeros PACA pré-sintetizados. Verificou-se que era possível associar a este tipo de nanopartículas tanto a substâncias hidrófobas, como a pilocarpina e o aciclovir, como a substâncias hidrófilas, como por exemplo, o cloridrato de betaxolol que está indicado no tratamento de doentes com glaucoma crônico de ângulo aberto ou hipertensão ocular.

No entanto, na década de 90, as nanopartículas PACA foram excluídas da investigação para a administração ocular, dado que se descobriu que este tipo de veículo de fármacos é degradado por esterases presentes no segmento anterior do olho, que levam à produção de metabolitos tóxicos responsáveis por danos na córnea e lise celular (7,17,25–27).

### **6.1.2. Nanopartículas híbridas de quitosano-ácido hialurônico**

Abordagens terapêuticas baseadas no uso de polímeros com propriedades mucoadesivas, como o quitosano e o ácido hialurônico, sob a forma de nanopartículas são estratégias emergentes para prolongar o tempo de residência do fármaco na superfície ocular e aumentar a biodisponibilidade deste, traduzindo-se numa hipótese eficaz para o tratamento das patologias oculares. O quitosano, um copolímero polissacárido linear catiónico constituído por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glucopirranose e de 2-acetamido-2-deoxi-D-glucopirranose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$ , surgiu como um material promissor para o aperfeiçoamento dos sistemas transportadores de fármacos para a via ocular e é atualmente, um dos polímeros mais estudados. Este polímero é facilmente obtido na indústria farmacêutica pelo processo de hidrólise dos grupos acetamido da quitina de caranguejos ou camarões em soluções aquosas alcalinas. Sendo um polímero mucoadesivo de natureza

hidrofílica, biocompatível, biodegradável e que apresenta uma boa tolerabilidade ocular, o quitosano reúne vários atributos que o tornam apropriado para a libertação controlada de fármacos no olho. A natureza mucoadesiva do quitosano está relacionada com a interação entre os grupos amino presentes na sua estrutura, carregados positivamente, com os resíduos de ácido siálico que apresentam carga negativa no muco da córnea e da conjuntiva, juntamente com outras interações, principalmente as ligações de hidrogénio. Desta forma, consegue-se reduzir a drenagem nasolacrimal e prolongar o tempo de residência na superfície ocular das nanopartículas, enquanto as moléculas de fármaco se difundem de forma controlada no filme lacrimal. Para além disso, o quitosano apresenta atividade antimicrobiana de amplo espectro contra bactérias gram positivas e gram negativas bem como, atividade contra fungos (17,20,28).

Devido às propriedades hidrofílicas do quitosano, as nanopartículas constituídas apenas por este polímero apresentam uma capacidade de encapsulação limitada para fármacos hidrófobos. De modo a melhorar a incorporação de substâncias ativas por parte das nanopartículas, bem como a capacidade de conseguir alcançar o sítio-alvo e a libertação controlada do fármaco e ainda reduzir a toxicidade das nanopartículas preparadas a apenas a partir de quitosano, é-lhes adicionado um segundo polímero, neste caso, o ácido hialurónico (AH). O ácido hialurónico é um polissacarídeo linear aniónico pertencente à família dos glicosaminoglicanos presente na matriz extracelular dos tecidos conjuntivos nos vertebrados, como o humor vítreo e aquoso no olho. O AH provou ser biodegradável, biocompatível, não tóxico, não imunogénico e não inflamatório. Este polímero é amplamente utilizado em sistemas de veiculação de fármacos para a via oftálmica pelas suas propriedades mucoadesivas e pela interação seletiva com os recetores de AH dispostos nas superfícies celulares, nomeadamente os CD44, que se encontram presentes no epitélio ocular, melhorando assim a entrega direcionada aos locais específicos de ação (20,29).

Publicações anteriores sugerem a formulação de nanopartículas poliméricas contendo ambos os polímeros mucoadesivos, o quitosano e o AH, com o tripolifosfato de sódio (TPP) como agente de reticulação (17,20,23). A natureza aniónica do ácido hialurónico também permite que este forme ligações iónicas com a estrutura catiónica do quitosano, comportando-se igualmente como um agente reticulante. Este efeito de *crosslinking* provocado pela utilização de dois polímeros com cargas opostas, pode levar a um aumento da rigidez das nanopartículas e, conseqüentemente, provocar um aumento no tempo de retenção do fármaco na superfície ocular e/ ou a penetração ocular das nanopartículas bem como uma diminuição no efeito de *burst* (libertação não controlada do fármaco) (17,23).

O trabalho de Silva *et al.* (2017) teve como propósito o desenvolvimento e a avaliação de uma formulação para uso oftálmico de nanopartículas compostas por quitosano, AH e TPP como sistema de veiculação da ceftazidima para a via ocular. Ambos os polímeros foram dissolvidos em soluções aquosas e as nanopartículas foram preparadas pelo método de gelificação iônica com TPP. Este método dá origem a nanopartículas com forma esférica e de reduzidas dimensões (200-500nm), resultando num transporte do fármaco pelas barreiras anatómicas e fisiológicas mais eficiente. Neste estudo concreto, obtiveram-se NP com um tamanho de 350nm e com valores positivos e elevados de potencial zeta, que se traduz numa elevada estabilidade das mesmas, devido a uma maior repulsão entre as partículas. Valores de potencial zeta positivos, revelam ainda que a superfície das NP é composta maioritariamente pelo quitosano, que tem carga positiva. Para além disso, a carga positiva é favorável para prevenir a agregação de partículas e promover uma interação eletrostática mais forte com os resíduos aniônicos de ácido siálico na mucina. O antibiótico foi diluído numa solução ligeiramente alcalina para ficar com carga negativa de forma a haver uma interação mais forte com o quitosano, com o objetivo de obter uma encapsulação mais eficiente. Posteriormente as nanopartículas preparadas foram incorporadas no hidrogel com 0,75% (m/v) de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). O gel de HPMC aprisiona as moléculas de ceftazidima resultando num perfil de libertação controlado sem um efeito de *burst release* significativo. As nanopartículas QS/AH/TPP preservaram a atividade antimicrobiana da ceftazidima e demonstraram uma viabilidade celular de 100%, podendo ser utilizadas como uma potencial abordagem terapêutica nas patologias oculares (20,23).

Por outro lado, Kalam *et al.* (2016) combinaram os dois polímeros recorrendo a uma técnica diferente. No seu trabalho, as nanopartículas foram revestidas com ácido hialurónico. O objetivo do estudo consistiu em avaliar os efeitos resultantes da utilização deste tipo de revestimento.

As nanopartículas de quitosano foram preparadas através de gelificação iônica do polímero, utilizando o TPP como agente reticulante. A reticulação iônica ocorre através de um processo de agregação espontânea entre as partículas de quitosano e as macromoléculas de carga oposta, como o TPP. O fosfato sódico de dexametasona com indicação para tratamento da inflamação ocular, foi posteriormente incorporado nas nanopartículas de quitosano. De seguida, as nanopartículas de quitosano liofilizadas foram revestidas com ácido hialurónico. O revestimento com o polímero mencionado provocou um aumento no tamanho das nanopartículas, originando nanopartículas com aproximadamente 380 nm. Para além disso, o revestimento foi responsável por inverter o potencial zeta, passando de valores altamente positivos para valores altamente negativos. A inversão dos valores do potencial zeta era esperada devido à eficaz adsorção do AH negativamente carregado à superfície das

nanopartículas de quitosano com carga positiva, e, portanto, resultou numa densidade de carga superficial negativa significativamente maior em nanopartículas revestidas com AH, sendo também esta a razão para o aumento dos diâmetros hidrodinâmicos das NP-QS revestidas com AH. Estudos de estabilidade demonstraram que o revestimento de AH proporcionou uma maior estabilidade e taxas mais baixas de agregação e de intumescimento. Os resultados do ensaio de libertação *in vitro* sugeriram um perfil de libertação prolongado no tempo, seguindo o mecanismo de difusão de Fickian. Ensaio adicionais deste nanotransportador revelaram que o fosfato sódico de dexametasona se acumula no filme lacrimal e que houve uma melhoria na absorção do mesmo. Estes resultados foram atribuídos ao ácido hialurónico. A presença de AH na composição das nanopartículas acelera a absorção celular através de um processo de endocitose mediada pela interação do AH com os recetores CD44. Além disto, o AH promove a cicatrização de feridas na córnea durante situações inflamatórias, através da regulação da regeneração de células epiteliais por meio da ligação do AH com os recetores CD44 e recetores de mobilidade para o AH, que se encontram na conjuntiva e na córnea, melhorando assim a biodisponibilidade do fármaco, como já anteriormente referido. O fármaco foi detetado no humor aquoso dos olhos de coelho em concentrações suficientemente altas, até 24h após a administração tópica das nanopartículas (23,28,30).

As nanopartículas híbridas à base de quitosano possuem uma grande capacidade de interação com o muco da córnea e da conjuntiva, isto é, verifica-se um aumento na especificidade da entrega do fármaco aos tecidos oculares externos, o que leva a uma minimização dos efeitos tóxicos que estes podem provocar nos tecidos oculares internos e nas restantes partes do organismo (por meio da absorção sistémica). Vários autores, apontam este tipo de nanopartículas como estratégias promissoras para o tratamento de doenças oculares externas (17,20,23,24,28,29).

## **6.2. Nanopartículas lipídicas**

O nanotransportadores à base de lípidos constituem uma ampla categoria composta por lipossomas, niossomas, cubossomas, nanoemulsões e nanopartículas lipídicas. Estes tipos de sistemas coloidais oferecem diversas vantagens no sentido de melhorar a biodisponibilidade da substância ativa que transportam, incluindo o aumento da solubilidade de fármacos hidrófobos, um ajuste mais preciso de parâmetros farmacocinéticos e a proteção das moléculas com ação farmacológica da degradação enzimática (18).



As nanopartículas lipídicas (NL) apresentam dimensões compreendidas entre os 50-1000nm, no entanto, e de forma a passarem pelas barreiras fisiológicas de forma mais eficiente, o tamanho ideal situa-se entre os 50-500nm. As NL são sistemas coloidais compostos por lípidos sólidos biocompatíveis ou por misturas de lípidos sólidos com lípidos líquidos que são estabilizados por tensioativos e co-tensioativos, se necessário. Acilgliceróis, ácidos gordos, esteróides, ceras e os seus derivados são alguns exemplos dos lípidos que podem compor estes veiculadores de fármacos (18,19). As técnicas utilizadas na produção das NL englobam a homogeneização a alta pressão, microemulsificação, emulsificação-evaporação do solvente, dupla emulsão e técnicas de ultrassom. Diferentes hipóteses de formulação têm sido testadas para utilizar as NL como alternativa aos transportadores mais convencionais, como por exemplo os lipossomas. Assim, nos últimos anos, as NL foram sofrendo modificações de forma a aperfeiçoar a capacidade de incorporar tanto fármacos lipofílicos como fármacos hidrófilos dentro da sua matriz lipídica (17,18,31). Outro aspeto a considerar é que as NL são formuladas com substâncias que são aprovadas por ambas as entidades reguladoras do medicamento, a *Food and Drug Administration* (FDA) e a EMA. A sua composição lipídica tenta ser o mais semelhante possível às moléculas lipídicas endógenas, embora necessite de algumas adaptações de forma a que se ajuste às propriedades do fármaco que vai encapsular (32).

As NL apresentam um núcleo lipofílico que é estabilizado pelo efeito de uma camada de tensioativo, não devendo ser confundidas com lipossomas, os quais exibem um núcleo aquoso estabilizados por uma camada dupla de tensioativo. Enquanto que o núcleo das nanopartículas lipídicas é responsável por aprisionar as substâncias ativas, a camada de tensioativo assegura a estabilidade destes sistemas no ambiente hidrófilo. Estes sistemas contornam alguns problemas encontrados noutro tipo de nanosistemas, como o vazamento do fármaco encapsulado no que diz respeito aos lipossomas e a instabilidade que se verifica durante o armazenamento típica de emulsões, de nanopartículas poliméricas e de lipossomas (32,33). Outra vantagem das NL em relação aos lipossomas é o seu baixo custo para produções de grande escala, tornando-as favoráveis para a produção industrial (17).

As NL são classificadas em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e em veículos lipídicos nanoestruturados (VLN) consoante a composição dos seus excipientes. Os componentes das NLS são maioritariamente lípidos sólidos à temperatura ambiente, já nos VLN verifica-se uma mistura de lípidos sólidos e líquidos. Esta variação na composição lipídica das nanopartículas tem uma forte influência na capacidade de encapsulação do fármaco e no perfil de libertação deste (34).

A primeira geração de NL foram as NLS resultando da evolução das nanoemulsões de óleo em água. As NLS são constituídas por uma matriz lipídica sólida circundada por uma camada de tensioativos numa dispersão aquosa. A estrutura rígida do núcleo e a presença de tensioativos na formulação conferem-lhes uma maior estabilidade física quando comparadas com as nanoemulsões. Além disso, os tensioativos foram utilizados em concentrações menores do que as utilizadas na preparação das nanoemulsões, resultando numa menor toxicidade e num perfil de biocompatibilidade melhor. Constituem exemplos dos tensioativos mais utilizados nas formulações destas partículas os fosfolípidos e tensioativos à base de PEG. As NLS podem ser produzidas por técnicas de homogeneização tanto a quente como a frio, sendo este último o método preferencial quando a molécula a ser encapsulada é termolábil (32).

Contudo, as NLS apresentaram algumas desvantagens em consequência da matriz cristalina rígida, sendo que as principais foram o vazamento do fármaco durante o armazenamento e a baixa capacidade de incorporação das substâncias ativas (18,19,32). De forma a contornar as limitações apresentadas, foi desenvolvida uma segunda geração de NL, resultante da incorporação de lípidos líquidos espacialmente incompatíveis na estrutura das NLS, dando origem aos VLN. Esta modificação teve como objetivo aumentar a desorganização molecular da estrutura lipídica, resultando por um lado, numa encapsulação mais eficiente da substância ativa e por outro, numa redução do vazamento do fármaco (18,35).

Os VLN são constituídos por um núcleo sólido de natureza lipídica, composto por uma mistura de lípidos sólidos e líquidos. A matriz que resulta desta mistura mantém-se no estado sólido à temperatura corporal, apesar de apresentar um ponto de fusão mais baixo do que a matriz das NLS. Dependendo do método de produção e da composição da mistura de lípidos, podem ser obtidos três tipos de VLN: o tipo imperfeito, amorfo e múltiplo (19). O tipo imperfeito de VLN consiste na mistura de lípidos sólidos com pequenas quantidades de lípidos líquidos (óleos), levando a um maior número de imperfeições no cristal. Deste modo, o processo de cristalização é evitado e a capacidade de incorporação do fármaco é melhorada (18,36). No tipo amorfo, a matriz lipídica é sólida, mas encontra-se no estado amorfo, ao contrário do tipo imperfeito, em que esta se encontra na forma cristalina. Isto pode ser conseguido misturando lípidos com propriedades especiais, os quais após a solidificação apresentam uma estrutura amorfa. No tipo múltiplo, a matriz lipídica sólida contém pequenos nanovacúolos de óleo, que resultam da combinação de grandes quantidades de lípidos líquidos com lípidos sólidos (18,19). A investigação de Almeida *et al.* (1997) demonstrou que ao alterar a nanoestrutura da matriz lipídica, a eficiência de aprisionamento das substâncias ativas e a qualidade do produto final é otimizada (19,35,37). Contudo, a segunda geração de NL, os VLN, apresentou limitações na encapsulação de fármacos hidrofílicos, com valores abaixo dos 0,5% (18).

Pelo motivo anteriormente apresentado, foi desenvolvida uma terceira abordagem para a formulação de nanopartículas lipídicas, os conjugados fármaco-lípido (CFL). Este tipo de sistemas permite a incorporação de fármacos hidrofílicos através da formação de um sal com um ácido gordo, como o ácido oleico ou através da formação de ligações covalentes com ésteres, tornando o fármaco lipossolúvel (18).

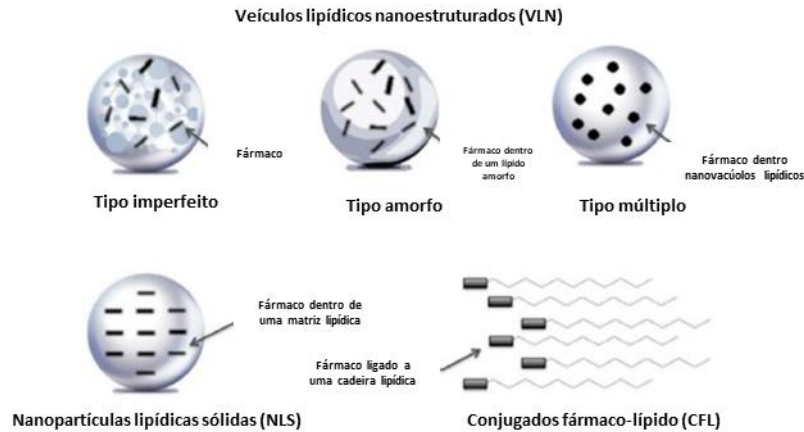


Figura 5. Diferentes tipos de Nanopartículas Lipídicas. Adaptado de Battaglia et al. (2016).

### 6.2.1. Otimização das nanopartículas lipídicas para a administração tópica ocular

A otimização das propriedades das NL para a entrega de fármacos para a via tópica ocular deve compreender alguns aspectos tecnológicos, nomeadamente o tamanho de partícula, a carga superficial, a eficiência de aprovisionamento do fármaco, a capacidade de incorporação da substância ativa, o perfil de libertação do fármaco e a sua biocompatibilidade, que são influenciados pelos lípidos e pelos tensoativos que compõem as NL. Além disso as formulações para uso oftálmico devem atender aos requisitos de esterilidade (18,19,31).

#### *Componentes lipídicos*

As propriedades dos lípidos, como a hidrofobicidade, o comportamento de cristalização e a forma dos cristais lipídicos constituem elementos importantes na produção de NL (4,18,31). Normalmente as cadeias de hidrocarbonetos mais longas estão associadas a pontos de fusão mais elevados e a uma maior estabilidade das nanopartículas. Considerando que os lípidos que formam uma rede cristalina altamente organizada são responsáveis por um maior vazamento do fármaco, a escolha de uma combinação de lípidos com diferentes

comprimentos de cadeias de ácidos gordos é utilizada prevenir uma cristalização anormal dos lípidos, melhorando assim a eficiência de encapsulamento e a estabilidade a longo prazo. Esta situação demonstra que o comportamento do sistema coloidal pode ser bastante diferente quando comparado com o comportamento do material lipídico enquanto matéria-prima, pelo que o lípido deve ser selecionado com base nas características desejadas para o produto final (18,31).

Para reduzir o tamanho médio das partículas, a proporção de lípidos líquidos na mistura de lípidos sólidos e líquidos deve ser aumentada, visto que a incorporação dos lípidos líquidos na formulação resulta na inibição dos fenómenos de cristalização dos lípidos sólidos após solidificação, como já foi anteriormente referido (18).

Os materiais lipídicos sugeridos para a produção de NL para a administração ocular incluem triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, álcoois alifáticos, ácidos gordos com cadeias de 10 a 12 átomos de carbono, entre outros (31). Os lípidos catiónicos são frequentemente utilizados nas formulações de nanopartículas para administração oftálmica. A sua estrutura consiste numa parte com carga positiva e uma ou duas regiões hidrófobas compostas por hidrocarbonetos ou estruturas esteroides (38). Este tipo de lípidos pode ser usado para aumentar a permeação do fármaco através da córnea, uma vez que ao conferirem carga positiva às nanopartículas permitem que estas estabeleçam interações iónicas com as células epiteliais da córnea, carregadas negativamente. As interações estabelecidas traduzem-se num prolongamento do tempo de residência ocular e em alterações morfológicas da córnea, levando a um aumento da absorção do fármaco (18,31).

### *Tensioativos*

Para garantir a estabilidade imediata e a longo prazo das NL, tanto das NLS como dos VLN, em dispersão aquosa, é necessário adicionar um tensioativo à formulação, que fica localizado entre as fases lipídica e aquosa. Estes podem também conferir propriedades de superfície específicas às nanopartículas. A escolha de tensioativos adequados (e co-tensioativos, se necessário) é uma etapa crucial no desenvolvimento de NL para administração ocular e deve ter em conta algumas características destes componentes, como os valores do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL), a citotoxicidade e o seu efeito no polimorfismo lipídico e no tamanho da partícula resultante. Tensioativos com valores de EHL entre 8 e 18 são considerados adequados para a estabilização das emulsões óleo em água. A seleção dos tensioativos para integrarem este tipo de formulações é limitada a compostos que causam a mínima ou mesmo nenhuma irritação ocular. Leonardi *et al.* (2014) demonstraram que as NLS produzidas na presença de tensioativos não-iónicos foram aquelas que causaram menor irritação ocular

quando comparadas com tensioativos iônicos. Para além disso, tensioativos não-iônicos, como o Tween® 20,40, ou 80, inibem o efluxo do fármaco mediado pelas glicoproteínas P e aumentam a permeabilidade transcelular do epitélio, resultando numa melhoria da biodisponibilidade do fármaco (18,31,39).

Os tensioativos mais utilizados englobam os lípidos presentes nas membranas biológicas, sais biliares, moléculas não iónicas biocompatíveis (co-polímeros de óxido de etileno, por exemplo) e misturas (31).

### **6.2.2. Case Study: nanopartículas lipídicas como sistemas de veiculação de ciclosporina para a via tópica ocular**

A ciclosporina é um péptido cíclico que foi investigado na área da oftalmologia, pela primeira vez em 1981, inicialmente para administração após um transplante de um enxerto de córnea (40–42). A atividade imunossupressora da ciclosporina mostrou-se eficaz no tratamento de condições oculares inflamatórias como a síndrome de olho seco, uveíte, cicatrização da córnea e ceratoconjuntivite vernal. Inicialmente, a ciclosporina era administrada por via oral para o tratamento de patologias oftálmicas, no entanto, a absorção sistémica do fármaco levou à ocorrência de efeitos adversos sistémicos como nefrotoxicidade, hipertensão, anemia, parestesia e hiperestesia. Portanto, a administração ocular de ciclosporina através do uso de sistemas veiculadores tornou-se o método preferencial para o tratamento de patologias oftálmicas (40). Contudo, a administração ocular deste fármaco constitui um desafio farmacêutico devido às suas propriedades físico-químicas. A ciclosporina é um composto lipofílico praticamente insolúvel em meio aquoso, e por essa razão, não pode ser formulado como um colírio convencional (18). As NL demonstraram ser sistemas apropriados para veicular a ciclosporina, uma vez que contornam os principais problemas associados aos sistemas tradicionais (19).

O estudo de Shen *et al.* (2010) teve como objetivo avaliar os efeitos biofarmacêuticos resultantes da incorporação de um lípido líquido (Mygliol®) nas NL, durante o desenvolvimento de um VLN para administração tópica ocular da ciclosporina. A adição de Mygliol® não só aumentou a capacidade de encapsulação do fármaco, devido à inibição da recristalização da matriz lipídica, como também melhorou a absorção celular *in vitro*. Para além disto, a incorporação do Mygliol® conferiu uma maior flexibilidade ao sistema, facilitando a penetração dos VLN através da córnea. Os VLN apresentaram um prolongado tempo de residência na superfície ocular e demonstraram ter boa biocompatibilidade ocular confirmada *in vitro* por um teste de viabilidade celular e *in vivo* por um ensaio de tolerância ocular (18,43).

Outro parâmetro que influencia a interação das NL com as estruturas oculares é a carga superficial que estas apresentam. Battaglia *et al.* (2012) estudaram o efeito da carga superficial das NLS na veiculação da ciclosporina para os tecidos oculares. Foram preparados três tipos de NLS recorrendo ao uma técnica de coacervação, nomeadamente os tipos não-iônico, aniônico e catiónico. O ácido esteárico foi o lípido sólido utilizado para dar origem à matriz lipídica e os modificadores de superfície utilizados foram a goma arábica, para as NLS aniônicas, e o cloridrato de quitosano, para as NLS catiónicas. Os três tipos de NLS demonstraram uma permeação significativamente maior quando comparadas com os controlos (suspensão e emulsão). No entanto, apenas as NLS catiónicas proporcionaram valores mais elevados de acumulação de fármaco do que aqueles que foram obtidos com o fármaco em suspensão. Este resultado está possivelmente relacionado com o revestimento de quitosano, que favorece a absorção das nanopartículas pelas células epiteliais. Nenhuma das formulações desenvolvidas causou irritação ocular *in vivo*, tornando-as adequadas para a veiculação da ciclosporina para a via tópica ocular (18,44).

Considerando o amplo espectro terapêutico da ciclosporina para doenças oftálmicas e as limitações que ainda se verificam relativamente à sua veiculação para a via oftálmica, mantém-se a oportunidade e a necessidade de continuar a investigar e a aperfeiçoar os nanossistemas que veiculam este agente imunossupressor para a via tópica ocular (42).

## **7. Nanopartículas como sistemas de transporte de fármacos para o segmento posterior**

As principais causas de deficiência visual e cegueira em todo o mundo devem-se a patologias relacionadas com o segmento posterior do olho, englobando a DMRI, o EMD, a RD e a uveíte posterior. Com o envelhecimento da população mundial que se tem verificado nos últimos anos, estas doenças têm-se tornado cada vez mais comuns na sociedade. Desta forma, existe uma necessidade crescente de desenvolver novas estratégias terapêuticas para doenças do segmento posterior do olho. No entanto, a entrega de fármacos no segmento posterior mantém-se um desafio devido à estrutura altamente protegida da parte posterior do olho não só por barreiras estáticas, que incluem a esclera, o epitélio pigmentar da retina e as células endoteliais dos capilares sanguíneos como também por barreiras dinâmicas, com a circulação sanguínea e linfática (2,45). A entrega de fármacos nesta região do olho pode ser realizada por injeções em diferentes tecidos ou por tratamentos tópicos ou sistémicos não invasivos. Se

por um lado, os tratamentos tópicos convencionais não conseguem entregar o fármaco no local de ação pretendido, por outro, as injeções intravítreas entregam o fármaco diretamente na cavidade vítrea. No entanto, a elevada frequência de administração da molécula terapêutica por esta via invasiva, pode provocar descolamento da retina, hemorragia retiniana, endoftalmite e um aumento da pressão intraocular ou, pode mesmo levar à formação de cataratas. Nos últimos anos, os nanosistemas têm sido estudados e avaliados como novas abordagens terapêuticas para o transporte de fármacos para o segmento posterior (19,46).

### **7.1. Nanopartículas de ouro**

Nos últimos anos, as nanopartículas de ouro (AuNP) têm atraído um grande interesse para a veiculação de fármacos para a via ocular. O ouro apresenta mais valias únicas, dentro das quais se destacam as suas propriedades antioxidantes e antiangiogénicas (47,48). Estes nanosistemas são normalmente sintetizadas a partir da redução do ácido cloroáurico, um sal de ouro, através de diferentes métodos de redução, como o de Brust ou o de Turkevish, resultando em partículas cujas dimensões podem variar de 1 a 120nm de acordo com as condições utilizadas durante a sua síntese. As vantagens das AuNP são a ausência de toxicidade, a facilidade de síntese, controlo sobre a forma e o tamanho obtido e a possibilidade de conjugação com outras biomoléculas. Para além disso, as AuNP de dimensões reduzidas conseguem passar pela barreira hemato-retiniana após administração sistémica, pelo que estas se podem tornar interessantes sistemas de libertação de fármacos para serem administradas por múltiplas vias (47–49).

A neovascularização da retina (NVR) é um fenómeno patológico que está subjacente a algumas patologias oculares, nomeadamente a retinopatia diabética e a degenerescência macular relacionada com a idade. A NVR pode mesmo levar à perda de visão, pelo que é importante suprimir as vias pelas quais este fenómeno ocorre. Uma das vias metabólicas que induzem este processo fisiopatológico requer o VEGF para ativar o seu recetor. Desta forma, uma das estratégias para o tratamento da NVR foca-se na utilização de fármacos que atuem na via metabólica do VEGF, de forma a diminuir os seus níveis (49,50).

Mukherjee *et al.* (2005) demonstraram pela primeira vez as propriedades antiangiogénicas das AuNP em orelhas de ratinhos. As AuNP ligaram-se ao VEGF165, inibindo desta forma a sua atividade e os eventos de sinalização subsequentes. Verificou-se que esta inibição foi dependente do tamanho, da carga e da concentração das AuNP (49,51,52).

Embora as AuNP sejam uma ferramenta promissora para inibir o processo de neovascularização da retina, pode ser necessário adicionar modificadores de superfície de forma a melhorar a sua mobilidade através das barreiras fisiológicas e anatómicas. Segundo o estudo realizado por *Xu et al.* (2013), referente ao transporte de fármacos para o corpo vítreo, foi possível tirar conclusões que irão facilitar a criação de sistemas de transporte mais racionais. Consoante o tamanho e a carga superficial das nanopartículas, estas podem ficar retidas no humor vítreo, que é composto por água, colagénio e ácido hialurónico. Para além disso, o humor vítreo pode funcionar como um reservatório para a libertação controlada de fármacos, visto que as partículas de dimensões mais elevadas acabam por ficar retidas neste, prolongando assim o seu efeito e aumentando a sua biodisponibilidade quando administradas em solução (47,53). Uma vez que o ácido hialurónico é um dos principais componentes do humor vítreo, *Apaolaza et al.* (2020) puseram a hipótese de que uma vez ligado à superfície das AuNP, este concederia as suas propriedades ao *core* de ouro, aumentando assim a mobilidade da partícula, e direcionando os recetores CD44, expressos nas diferentes células do olho, para o ácido hialurónico (47).

## **7.2. Case study: gold nanoparticles revestidas com ácido hialurónico como estratégia terapêutica para o processo de neovascularização no olho**

*Apaolaza et al.* (2020) analisaram AuNP revestidas com ácido hialurónico enquanto sistema transportador aspirante para o tratamento da neovascularização no olho. As AuNP foram sintetizadas pelo método de Turkevich, que se baseia na redução do ácido cloroáurico, o sal do ouro, pelo sal desidratado do citrato trissódico. O ligante HA-SH foi covalentemente ligado à superfície das nanopartículas pela interação resultante entre o ouro e o grupo tiol. A adição deste modificador de superfície teve como intuito aumentar a estabilidade, a dispersibilidade e a biocompatibilidade das nanopartículas.

O revestimento de ácido hialurónico provocou um aumento significativo no tamanho e no potencial zeta das partículas. A estereoquímica dos dissacáridos na estrutura do AH e o seu elevado carácter aniónico tornam a molécula resistente à degradação.

As AH-AuNP formuladas neste estudo são estáveis a valores de pH fisiológico e protegem o fármaco da hidrólise lisossomal dependente do pH, conferindo-lhe uma boa biodisponibilidade celular (pH  $\approx$  5).

Relativamente à avaliação da interação celular com as AuNP e AH-AuNP, os estudos foram realizados *in vitro*. Foram detetadas diferenças estatisticamente significativas nos perfis de tempos de absorção das duas formulações. Enquanto que para as AuNP a absorção foi



continua ao longo do tempo, para as AH-AuNP a absorção foi mais rápida até 4 horas, onde atingiu um *plateau*. Estas diferenças podem estar relacionadas com a saturação dos recetores CD44 do ácido hialurónico, demonstrando que as AH-AuNP apresentam uma absorção dependente do recetor devido à sua interação com os recetores CD44.

Em relação aos estudos de difusão através do humor vítreo, verificou-se que as AH-AuNP formuladas neste ensaio foram encontradas nas camadas mais profundas da retina e até mesmo na camada fotorecetora, enquanto que as nanopartículas sem revestimento de ácido hialurónico ficaram retidas na membrana limitante interna da retina.

Por último, estudou-se o comportamento destas nanopartículas no processo da neovascularização. Realizou-se um ensaio CAM após a administração de AuNP e AH-AuNP com co-administração de VEGF. As AuNP por si só mostraram uma tendência para inibir a NVR induzida por VEGF, mantendo o número e a estrutura dos vasos sanguíneos, ou interrompendo-os. No entanto, os efeitos antiangiogénicos das AH-AuNP podem ser resultantes de diversos fatores, tendo originado um efeito mais diverso. Por um lado, a área de superfície das nanopartículas que não se encontra coberta por AH pode conseguir acoplar o domínio de ligação à heparina do VEGF e/ou suprimir a cascata de ativação de VEGFR-2, resultando numa capacidade antiangiogénica residual. Por outro lado, o revestimento de AH demonstrou ter capacidade de reduzir as ROS, que constituem mediadores bem conhecidos da angiogénese (47).

Embora pareça existir uma tendência, por parte do revestimento de ácido hialurónico, para inibir o efeito *in vitro* das AuNP contra os produtos finais da glicação avançada e ligeiramente o efeito antiangiogénico *in ovo* na avaliação num curto intervalo de tempo, os potenciais efeitos a longo prazo da formulação proposta por Apaolaza *et al.* (2020) permanecem desconhecidos.

Neste sentido, torna-se urgente estudar os possíveis efeitos do próprio nanotransportador após a entrega da molécula de interesse no sítio alvo (47).

## **8. Considerações Regulamentares**

Ao combinar um conjunto de propriedades mecânicas, químicas, metabólicas, farmacológicas e imunológicas, os nanomedicamentos podem constituir uma mais valia para os doentes através de estratégias ainda não exploradas por diferentes substâncias ativas clássicas ou por sistemas transportadores convencionais. Alguns medicamentos sob a forma de nanopartículas já foram autorizados na União Europeia (UE) e nos Estados Unidos da

América (EUA) ao abrigo dos quadros regulamentares existentes. Embora a produção de sistemas à escala nanométrica não implique necessariamente novidade, espera-se que a nanotecnologia dê origem a produtos inovadores. Assim, os nanosistemas enquanto veículos de fármacos enfrentam simultaneamente uma vasta gama de desafios tecnológicos e regulamentares, que requerem uma consciência precoce, conhecimentos científicos apropriados e consenso sobre os requisitos regulamentares mais adequados (54,55).

Estes produtos podem ultrapassar as fronteiras regulamentares entre aquilo que é um medicamento e o que é um dispositivo médico, desafiando os atuais critérios de classificação e avaliação. Para além disso, não existe uma definição de nanomaterial universalmente aceite pelas corporações regulamentares internacionais. Têm sido feitos esforços no sentido de encontrar uma definição consensual, uma vez que os nanomateriais, devido às suas reduzidas dimensões, podem apresentar propriedades físico-químicas alteradas quando comparados com os seus equivalentes químicos em grande escala. As propriedades das nanoformulações que podem levar à modificação do perfil farmacocinético, nomeadamente a capacidade para ultrapassar mais facilmente as barreiras fisiológicas, as propriedades toxicológicas e a sua persistência no ambiente e no corpo humano constituem alguns exemplos das preocupações dos nanomateriais. Deste modo, torna-se fundamental uma especialização apropriada para a avaliação da qualidade, da segurança, da eficácia e da gestão de risco de produtos nanomedicinais (17,54,56).

Com o objetivo de partilhar a experiência adquirida pela rede regulamentar da UE na avaliação dos aspetos científicos e regulamentares dos nanomedicamentos, a EMA publicou em 2006 o primeiro artigo de reflexão regulamentar sobre medicamentos baseados na nanotecnologia para uso humano (54,55). Tendo em vista a experiência acumulada na avaliação de nanomedicamentos e devido ao crescente interesse de patrocinadores por aconselhamento científico, a EMA criou, em 2009, o *European Nanomedicines Expert Group* composto por especialistas que interagem com outras organizações como a FDA dos EUA, com a *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency* do Japão e outras agências regulamentares. Este grupo foi reforçado em 2011 com mais especialistas para abordar questões urgentes na avaliação destes produtos, como limitações na caracterização dos nanosistemas, definição de parâmetros críticos relacionados com o aumento da escala de produção, questões específicas de estudos farmacocinéticos, preocupações com a biocompatibilidade e a nanotoxicidade a longo prazo e riscos ambientais (55,56).

Na UE, o sistema utilizado para a avaliação do risco-benefício de medicamentos à escala nanométrica encontra-se bastante desenvolvido, no entanto, pode verificar-se a necessidade

de orientações adicionais no que diz respeito à qualidade, toxicologia e ao desenvolvimento clínico, devido à natureza multidisciplinar dos sistemas nanoparticulados. Assim, as seguintes orientações específicas para a área da nanomedicina foram publicadas pela EMA: requisitos de dados para produtos nano-coloidais à base de ferro para administração intravenosa desenvolvido com referência a um medicamento inovador (57); revestimentos superficiais: questões gerais a serem consideradas em relação à administração parental de produtos nanomedicinais revestidos (58); requisitos de dados para produtos lipossomais intravenosos desenvolvidos com referência a um produto lipossomal inovador (59); desenvolvimento de medicamentos sob a forma de micelas de copolímero em bloco (60).

A administração de fármacos sob a forma de nanosistemas constitui uma perspectiva eficiente e inovadora para abordar as necessidades médicas ainda não atendidas. Assim, verifica-se um esforço significativo a nível europeu e internacional para que, a área regulamentar acompanhe em paralelo a evolução da nanotecnologia, de forma a garantir a preparação para os desafios futuros da nanomedicina de próxima geração (55).

## **9. Desafios e Perspetivas Futuras**

As lacunas presentes nos atuais sistemas de veiculação de fármacos para a via ocular, como a reduzida biodisponibilidade de fármacos administrados topicamente e a natureza invasiva das injeções no segmento posterior do olho, geram desafios que permitem o nascimento de novas tecnologias como terapêuticas mais eficazes para as patologias oculares. A nanotecnologia é uma área emergente na investigação científica com uma vasta aplicabilidade e, no contexto clínico, espera-se que contribua para o desenvolvimento de um paradigma mais proativo no que diz respeito ao tratamento de determinadas doenças. Os distúrbios oculares como cataratas, síndrome do olho seco, DMRI, glaucoma e RD apresentam uma tendência para aumentar nas próximas duas décadas (1,54).

Para a maioria das doenças do segmento anterior, a administração de colírios é considerada a abordagem mais segura e conveniente, apesar de este tipo de formulações apresentar uma baixa biodisponibilidade do fármaco no tecido alvo. Assim, a utilização de nanoformulações, de entre as quais se destacam as nanopartículas, permite uma libertação controlada do fármaco e uma maior biodisponibilidade na conjuntiva e na córnea. Além disso, a diversidade de polímeros biodegradáveis que surgiu nos últimos anos permite uma maior versatilidade na formulação das nanopartículas relativamente à sua categoria e função (1,17).

Em relação ao tratamento das patologias do segmento posterior do olho, as principais abordagens terapêuticas são de natureza invasiva. Como já referido anteriormente, uma elevada frequência de administrações intravítreas pode levar ao descolamento da retina, hemorragia e desconforto para os doentes, pelo que é necessário desenvolver estratégias não invasivas capazes de superar as barreiras oculares e de manter concentrações eficazes do fármaco na parte posterior do olho (1).

Uma vez que os novos sistemas de veiculação de fármacos para a via ocular, como as nanopartículas, apresentam um elevado potencial para o tratamento de várias patologias oculares, estes podem vir a substituir as formas farmacêuticas convencionais num futuro próximo. No entanto, a transferência do processo de produção à escala laboratorial para a produção em grande escala constitui ainda um obstáculo para a entrada das nanopartículas no mercado. Para além de ser necessário dedicar algum estudo ao desenvolvimento destes novos sistemas, é urgente compreender de que forma pode ser feita a produção das nanopartículas em grande escala (1).

## Referências bibliográficas

1. Gote V, Sikder S, Sicotte J, Pal D. Ocular drug delivery: Present innovations and future challenges. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019;370(3):602–24.
2. Whitcup SM, Editors DTA. *Pharmacologic Therapy of Ocular Disease*. Vol. 242. 2017. 57–58 p.
3. Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, Mitra AK. Ocular drug delivery. *AAPS J*. 2010;12(3):348–60.
4. Seyfoddin A, Shaw J, Al-Kassas R. Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery. *Drug Deliv*. 2010;17(7):467–89.
5. Awwad S, Mohamed Ahmed AHA, Sharma G, Heng JS, Khaw PT, Brocchini S, et al. Principles of pharmacology in the eye. *Br J Pharmacol*. 2017;174(23):4205–23.
6. Tsai CH, Wang PY, Lin IC, Huang H, Liu GS, Tseng CL. Ocular drug delivery: Role of degradable polymeric nanocarriers for ophthalmic application. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9).
7. Agrahari V, Mandal A, Agrahari V, Trinh HM, Joseph M, Ray A, et al. A comprehensive insight on ocular pharmacokinetics. *Drug Deliv Transl Res*. 2016;6(6):735–54.
8. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg*. 2011;37(3):588–98.
9. Sridhar M. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol*. 2018;66(2):190–4.
10. Ramsay E, del Amo EM, Toropainen E, Tengvall-Unadike U, Ranta VP, Urtti A, et al. Corneal and conjunctival drug permeability: Systematic comparison and pharmacokinetic impact in the eye. *Eur J Pharm Sci*. 2018;119(2017):83–9.
11. Shumway CL, Wade M. Anatomy, Head and Neck, Eye Conjunctiva. In: *StatPearls*. 2018.
12. Wolosin JM, Budak MT, Akinci MAM. Ocular surface epithelial and stem cell development. *Int J Dev Biol*. 2004;48(8–9):981–91.
13. Dartt DA. Regulation of mucin and fluid secretion by conjunctival epithelial cells. *Prog Retin Eye Res*. 2002;21(6):555–76.
14. Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong ROL. Functional architecture of the retina: Development and disease. *Prog Retin Eye Res*. 2014;42:44–84.
15. Cloutier MM, Thrall RS. *Berne & Levy Physiology*. Berne & Levy physiology. 2017. 449–463 p.
16. Hoshino A, Ratnapriya R, Brooks MJ, Chaitankar V, Wilken MS, Zhang C, et al. Molecular Anatomy of the Developing Human Retina. *Dev Cell*. 2017;43(6):763–79.
17. Janagam DR, Wu L, Lowe TL. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;122:31–64.
18. Alvarez-Trabado J, Diebold Y, Sanchez A. Designing lipid nanoparticles for topical ocular drug delivery. *Int J Pharm*. 2017;532(1):204–17.
19. Battaglia L, Serpe L, Foglietta F, Muntoni E, Gallarate M, Del Pozo Rodriguez A, et al. Application of lipid nanoparticles to ocular drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13(12):1743–57.
20. Silva MM, Calado R, Marto J, Bettencourt A, Almeida AJ, Gonçalves LMD. Chitosan nanoparticles as a mucoadhesive drug delivery system for ocular administration. *Mar Drugs*. 2017;15(12):1–16.

21. Kambhampati SP, Kannan RM. Dendrimer nanoparticles for ocular drug delivery. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2013;29(2):151–65.
22. Lynch C, Kondiah PPD, Choonara YE, du Toit LC, Ally N, Pillay V. Advances in biodegradable nano-sized polymer-based ocular drug delivery. *Polymers (Basel).* 2019;11(8).
23. Pontillo ARN, Detsi A. Nanoparticles for ocular drug delivery: Modified and non-modified chitosan as a promising biocompatible carrier. *Nanomedicine.* 2019;14(14):1889–909.
24. Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(11):1595–639.
25. Vauthier C, Dubernet C, Fattal E, Pinto-Alphandary H, Couvreur P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(4):519–48.
26. Vauthier C. A journey through the emergence of nanomedicines with poly(alkylcyanoacrylate) based nanoparticles. *J Drug Target.* 2019;27(5–6):502–24.
27. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2010;75(1):1–18.
28. Kalam MA. Development of chitosan nanoparticles coated with hyaluronic acid for topical ocular delivery of dexamethasone. *Int J Biol Macromol.* 2016;89:127–36.
29. Horvát G, Budai-Szucs M, Berkó S, Szabó-Révész P, Soós J, Facskó A, et al. Comparative study of nanosized cross-linked sodium-, linear sodium- and zinc-hyaluronate as potential ocular mucoadhesive drug delivery systems. *Int J Pharm.* 2015;494(1):321–8.
30. Kalam MA. The potential application of hyaluronic acid coated chitosan nanoparticles in ocular delivery of dexamethasone. *Int J Biol Macromol.* 2016;89:559–68.
31. Sánchez-López E, Espina M, Doktorovova S, Souto EB, García ML. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye – Part II - Ocular drug-loaded lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;110:58–69.
32. Desfrancois C, Auzély R, Texier I. Lipid nanoparticles and their hydrogel composites for drug delivery: A review. *Pharmaceuticals.* 2018;11(4):118.
33. Chetoni P, Burgalassi S, Monti D, Tampucci S, Tullio V, Cuffini AM, et al. Solid lipid nanoparticles as promising tool for intraocular tobramycin delivery: Pharmacokinetic studies on rabbits. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;109:214–23.
34. Mu H, Holm R. Solid lipid nanocarriers in drug delivery: characterization and design. *Expert Opin Drug Deliv.* 2018;15(8):771–85.
35. Seyfoddin A, Al-Kassas R. Development of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for improving ocular delivery of acyclovir. *Drug Dev Ind Pharm.* 2013;39(4):508–19.
36. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm.* 2002;242(1–2):121–8.
37. Almeida AJ, Runge S, Müller RH. Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of production parameters. *Int J Pharm.* 1997;149(2):255–65.
38. Pensado A, Seijo B, Sanchez A. Current strategies for DNA therapy based on lipid nanocarriers. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014;11(11):1721–31.
39. Leonardi A, Bucolo C, Romano GL, Platania CBM, Drago F, Puglisi G, et al. Influence of different surfactants on the technological properties and in vivo ocular tolerability of lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 2014;470(1–2):133–40.

40. Lallemand F, Schmitt M, Bourges JL, Gurny R, Benita S, Garrigue JS. Cyclosporine A delivery to the eye: A comprehensive review of academic and industrial efforts. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;117:14–28.
41. Hunter PA, Wilhelmus KR, Rice NS, Jones BR. Cyclosporin A applied topically to the recipient eye inhibits corneal graft rejection. *Clin Exp Immunol.* 1981;45(1):173–7.
42. Patel D, Wairkar S. Recent advances in cyclosporine drug delivery: challenges and opportunities. *Drug Deliv Transl Res.* 2019;9(6):1067–81.
43. Shen J, Sun M, Ping Q, Ying Z, Liu W. Incorporation of liquid lipid in lipid nanoparticles for ocular drug delivery enhancement. *Nanotechnology.* 2010;21(2).
44. Battaglia L, D’Addino I, Peira E, Trotta M, Gallarate M. Solid lipid nanoparticles prepared by coacervation method as vehicles for ocular cyclosporine. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2012;22(2):125–30.
45. Ahmad I, Pandit J, Sultana Y, Mishra AK, Hazari PP, Aqil M. Optimization by design of etoposide loaded solid lipid nanoparticles for ocular delivery: Characterization, pharmacokinetic and deposition study. *Mater Sci Eng C.* 2019;100(March 2018):959–70.
46. Jóhannesson G, Stefánsson E, Loftsson T. Microspheres and nanotechnology for drug delivery. *Dev Ophthalmol.* 2015;55(3):93–103.
47. Apaolaza PS, Busch M, Asin-Prieto E, Peynshaert K, Rathod R, Remaut K, et al. Hyaluronic acid coating of gold nanoparticles for intraocular drug delivery: Evaluation of the surface properties and effect on their distribution. *Exp Eye Res.* 2020;198.
48. Azharuddin M, Sahana S, Datta H, Dasgupta AK. Corneal penetration of gold nanoparticles - Therapeutic implications. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014;14(8):5669–75.
49. Masse F, Ouellette M, Lamoureux G, Boisselier E. Gold nanoparticles in ophthalmology. *Med Res Rev.* 2019;39(1):302–27.
50. Liu X, Wang S, Wang X, Liang J, Zhang Y. Recent drug therapies for corneal neovascularization. *Chem Biol Drug Des.* 2017;90(5):653–64.
51. Mukherjee P, Bhattacharya R, Wang P, Wang L, Basu S, Nagy JA, et al. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clin Cancer Res.* 2005;11(9):3530–4.
52. Arvizo RR, Rana S, Miranda OR, Bhattacharya R, Rotello VM, Mukherjee P. Mechanism of anti-angiogenic property of gold nanoparticles: Role of nanoparticle size and surface charge. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2011;7(5):580–7.
53. Xu Q, Boylan NJ, Suk JS, Wang YY, Nance EA, Yang JC, et al. Nanoparticle diffusion in, and microrheology of, the bovine vitreous ex vivo. *J Control Release.* 2013;167(1):76–84.
54. European Medicine Agency. Reflection Paper on Nanotechnology-Based Medicinal Products for Human Use. 2006.
55. Pita R, Ehmann F, Papaluca M. Nanomedicines in the EU—Regulatory Overview. *AAPS J.* 2016;18(6):1576–82.
56. Soares S, Sousa J, Pais A, Vitorino C. Nanomedicine: Principles, properties, and regulatory issues. *Front Chem.* 2018;6:1–15.
57. European Medicine Agency. Reflection paper on the data requirements for intravenous iron-based nano-colloidal products developed with reference to an innovator medicinal product. 2015.
58. European Medicine Agency. Reflection paper on surface coatings : general issues for consideration regarding parenteral administration of coated nanomedicine products.

2013.

59. European Medicine Agency. Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product. 2013.
60. Committee for Medicinal Products for Human Use, European Medicine Agency. Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of block copolymer micelle medicinal products. 2013.