

Marta Isabel Neves Alves

# Formulações Nanoestruturadas de Retinol



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Rua Carlos da Maia, 296/ 4200-150 Porto

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Ano Letivo 2011/2012



Marta Isabel Neves Alves

# Formulações Nanoestruturadas de Retinol



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Rua Carlos da Maia, 296/ 4200-150 Porto

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Ano Letivo 2011/2012

Autor: Marta Isabel Neves Alves

# Formulações Nanoestruturadas de Retinol

Assinatura: \_\_\_\_\_

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para  
obtenção do grau de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

## Sumário

O retinol, comumente designado por vitamina A, é um importante componente para o bom funcionamento do organismo, nomeadamente, ao nível do sistema ocular. Esta substância ativa (SA), apresenta características lipófilas, sendo a sua principal fonte através da alimentação.

Um défice de retinol a nível oftálmico conduz a uma alteração na visão no escuro, acarretando o fenómeno de cegueira noturna. Assim, o objetivo desta tese, consistiu no desenvolvimento de uma formulação contendo retinol para a aplicação tópica, capaz de entrar diretamente no ciclo do olho. Para tal, incluiu-se na formulação das nanopartículas um lípido catiónico para promover o aumento das propriedades mucoadesivas já características das nanopartículas de lípidos sólidos (do inglês, “*solid lipid nanoparticles*”, SLN) permitindo um aumento da biodisponibilidade da SA.

A formulação das SLN foi obtida com recurso ao método de homogeneização a alta velocidade. Neste método, a fase lipídica, constituída por Precirol® ATO 5 e pelo brometo de cetiltrimetilamónio (do inglês, “*cetyltrimethylammonium bromide*”, CTAB), é submetida a aquecimento a cerca de 5-10°C acima do ponto de fusão dos lípidos usados. A fase aquosa, contendo um agente tensioativo, foi também submetida a aquecimento à mesma temperatura que a fase lipídica, procedendo-se, posteriormente, à emulsificação de ambas as fases, a 6000 rpm, durante 20 min. Para as SLN contendo retinol, foi necessário efetuar uma dissolução prévia da SA em etanol sob homogeneização e posterior evaporação do solvente. As formulações obtidas foram acondicionadas em frascos de vidro, deixando-se arrefecer até atingirem a temperatura ambiente.

Para a avaliação das SLN produzidas, procedeu-se à determinação de alguns parâmetros físico-químicos, nomeadamente, o tamanho médio de partícula (TMP), o índice de polidispersão (IP) e o potencial zeta (PZ) com recurso à técnica de espectrofotometria de correlação fotónica, morfologia das partículas por microscopia de fluorescência, capacidade de carga (CC) e eficácia de encapsulação (EE) com recurso a técnicas espectrofotométricas.

## Agradecimentos

Reservo esta página da minha tese para agradecer a várias pessoas que me auxiliaram na elaboração deste trabalho e sem as quais não seria possível realizar as várias etapas ao longo do percurso para concluir o mestrado integrado.

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, a Prof. Dra. Eliana Souto por todo o tempo despendido para esclarecer todas as minhas dúvidas, dedicação, pelo apoio incondicional que me prestou desde que lhe relevei qual a minha abordagem relativamente ao tema proposto, carinho, empenho e prontidão demonstrada. Pelo conjunto de razões que acabei de citar, não me teria sido possível proceder à elaboração deste trabalho inovador sem a sua presença e colaboração.

À Dra. Joana Figueiro pela orientação dada a nível prático e pela disponibilidade em dissipar todas as minhas dúvidas, pela amizade e colaboração prestada com a boa disposição que a caracteriza e pela constante presença em todas as minhas deslocações.

À Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), um muito obrigada pela cedência de todo o material e equipamento necessário para a realização das análises físico-químicas.

Devo ainda um grande agradecimento a toda a minha família, em especial aos mais recentes elementos, que tanta energia me deram, pelo apoio e possibilidade de concluir o curso que sempre desejei. Obrigados pais, irmã, cunhado, tia, avó e sobrinhos.

Queria, ainda, destacar uma pessoa muito especial que, infelizmente, já não está entre nós, o meu amigo Prof. Zé Carlos, que me disse “Querer e Crer é o truque para ter”. Quis e acreditei e o objetivo foi atingido. Obrigado pelo seu ensinamento.

A todos os meus amigos (alguns deles colegas de curso) por todas as emoções que partilharam comigo ao longo deste Mestrado Integrado tornando-o inesquecível.

Obrigada a todos os que acreditaram em mim e juntamente comigo tornaram o meu sonho real.

## Índice

	Página
Sumário	5
Agradecimentos	6
Índice Geral	7
Índice de Abreviaturas	10
Índice de Figuras	11
Índice de Tabelas	13

## Índice Geral

	Página
Capítulo I – Introdução Geral	14
1. Nanopartículas de lípidos sólidos	14
2. Administração ocular de SLN	18
3. Aplicação do retinol na administração ocular	26
Capítulo II – Obtenção de SLN contendo retinol: métodos de preparação e análise da estabilidade físico-química	32
1. Preparação das SLN	32
1.1. Materiais	32
1.2. Obtenção das SLN	32
2. Análise físico-química das SLN produzidas	38
2.1. Tamanho médio de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão	38
2.2. Estudos morfológicos por microscopia de fluorescência	40

2.3. Avaliação da estabilidade das formulações a longo prazo	40
2.4. Determinação da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga	41
Capítulo III – Apresentação e discussão dos resultados	45
1. Preparação das SLN	45
2. Análise físico-química das SLN produzidas	45
2.1. Tamanho médio de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão	45
2.2. Estudos morfológicos por microscopia de fluorescência	47
2.3. Avaliação da estabilidade das formulações a longo prazo	48
2.4. Determinação da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga	50
Capítulo IV – Conclusão Geral	52
Capítulo V – Referências Bibliográficas	53

## Índice de Abreviaturas

BRB – “*Blood-Retinal Barrier*” (Barreira hemato-retiniana)

CC – Capacidade de Carga

CTAB – *Cetyltrimethylammonium bromide*” (brometo de cetiltrimetilamônio)

EE – Eficácia de Encapsulação

EHL – Equilíbrio hidro-lipídico

EPR – Epitélio Pigmentado da Retina

GRAS – “*Generally Recognized As Safe*” (Geralmente reconhecidos como seguros)

ILM – “*Internal Limiting Membrane*” (Membrana Limitante Interna)

IP – Índice de Polidispersão

NST – Novos Sistemas Terapêuticos

PCS – “*Photon Correlation Spectrophotometer*” (Espetofotômetro de correlação fotônica)

PZ – Potencial Zeta

SA – Substância Ativa

SLN – “*Solid Lipid Nanoparticles*” (Nanopartículas de Lípidos Sólidos)

TMP – Tamanho Médio de Partícula

## Índice de Figuras

**Figura 1:** Esquema ilustrativo da morfologia das SLN.

**Figura 2:** Componentes do sistema visual (adaptado de (Seeley *et al.*, 2005)).

**Figura 3:** Esquema ilustrativo da anatomia do olho (adaptado de (Seeley *et al.*, 2005)).

**Figura 4:** Esquema ilustrativo da anatomia do olho e das diferentes vias que a SA pode seguir ao atingir o olho: 1) permeação transcorneal a partir do fluido lacrimal, dentro da câmara anterior; 2) permeação não-corneal através da conjuntiva e esclerótica; 3) distribuição da SA através do fluxo sanguíneo via barreira hemato-aquosa para a câmara anterior; 4) eliminação da SA através da câmara anterior pelo humor aquoso; 5) eliminação da SA a partir do humor aquoso para a circulação sistêmica através da barreira hemato-aquosa; 6) distribuição da SA através do sangue para o olho posterior através da BRB; 7) administração intravítrea da SA; 8) eliminação da SA a partir do humor vítreo através da BRB; 9) eliminação da SA a partir do humor vítreo para a câmara posterior. (adaptado de (Urtti, 2006)).

**Figura 5:** Distribuição das SA a nível ocular após a sua aplicação tópica (adaptada de (Hughes *et al.*, 2005)).

**Figura 6:** Esquema ilustrativo da administração intravítrea de SA no segmento posterior do olho, no qual A representa a administração de micro ou nanopartículas injetados com recurso a uma agulha (adaptado de (Thrimawithana *et al.*, 2011)).

**Figura 7:** Estrutura química da vitamina A (retinol).

**Figura 8:** Estrutura molecular do *all-trans*-retinal (adaptado de (McBee *et al.*, 2001)).

**Figura 9:** Esquema ilustrativo da produção da SLN; 1) formulação placebo; 2) formulação contendo retinol.

**Figura 10:** Estrutura química do Lutrol® F68.

**Figura 11:** Estrutura química do Precirol® ATO 5.

**Figura 12:** Estrutura química do lípido catiónico (CTAB) (adaptado de (Manna e Chakravorti, 2012)).

**Figura 13:** PCS utilizado (Ata Scientific – Specialists in Analytical Instrumentation).

**Figura 14:** Microscópio de fluorescência usado (Micron Optics - Nikon Microscope Systems for New Jersey and Puerto Rico).

**Figura 15:** Espetroscópio utilizado (Department of Chromatographic Methods).

**Figura16:** Representação gráfica da determinação do comprimento de onda máximo.

**Figura 17:** Curva de calibração obtida para o retinol nas concentrações compreendidas entre 2-8 µg/ml.

**Figura 18:** (A) – Fotografia da observação microscópica da formulação placebo obtida; (B) – Fotografia da observação microscópica da formulação obtida contendo retinol.

**Figura 19:** Representação gráfica da estabilidade físico-química das SLN (placebo e com retinol) a longo prazo (7, 14, 30 e 60 dias após a produção).

**Figura 20:** Esquema ilustrativo do que acontece ao longo do tempo às SLN (adaptado de (Müller *et al.*, 2002)).

**Figura 21:** Representação gráfica dos resultados obtidos para a EE e CC.

## Índice de Tabelas

**Tabela 1:** Ingestão diária de referência de retinol consoante a idade e o sexo (adaptada de (Falé e Soares, 2002)).

**Tabela 2:** Sinais de carência de retinol vulgarmente descritos (adaptada de (Falé e Soares, 2002)).

**Tabela 3:** Posologia de retinol necessária consoante o tipo de patologia a tratar (adaptada de (Falé e Soares, 2002)).

**Tabela 4:** Agentes tensioativos utilizados em formulações de SLN destinadas à aplicação oftálmica (adaptado de (Souto *et al.*, 2010)).

**Tabela 5:** Características do agente tensioativo Lutrol® F68 (adaptado de (Jannin *et al.*, 2006)).

**Tabela 6:** Composição da Formulação.

**Tabela 7:** Absorvências obtidas com uma solução padrão de concentração de 1 ng/mL a diferentes comprimentos de onda.

**Tabela 8:** Apresentação das absorvências obtidas e respetivas médias para cada padrão.

**Tabela 9:** Absorvências obtidas para as três alíquotas medidas e respetiva média.

**Tabela 10:** Resultados da análise físico-química efetuada a ambas as dispersões coloidais.

**Tabela 11:** Resultados obtidos referentes à avaliação da estabilidade a longo prazo.

## Capítulo I – Introdução Geral

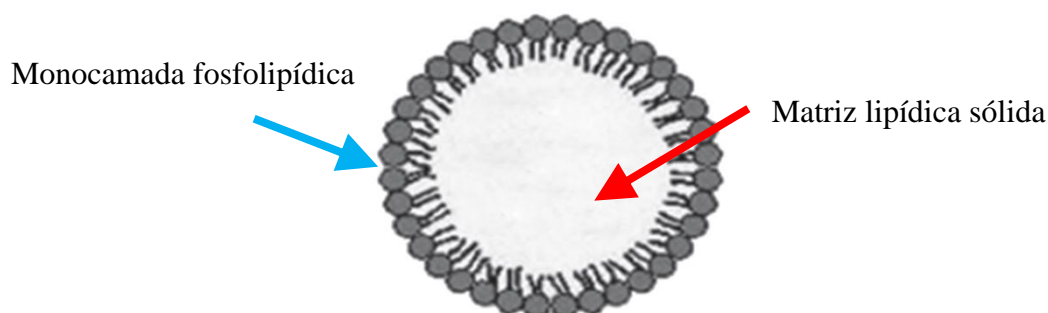
### 1. Nanopartículas de lípidos sólidos

Para que se possa entender o que são SLN, e qual o seu contributo nas áreas de Nanotecnologia e Nanomedicina, devem compreender-se alguns conceitos tais como nanopartículas e lípidos.

Definem-se como lípidos, as substâncias que apresentam um conjunto de características moleculares, nomeadamente, porções hidrófobas, que lhes conferem uma característica própria, de serem insolúveis em água, isto é, propriedades hidrófobas/lipófilas (Kaneko *et al.*, 1998).

As SLN caracterizam-se por apresentarem uma matriz constituída por lípidos sólidos (Figura 1) que podem ser componentes fisiológicos e/ou lípidos geralmente reconhecidos com seguros (do inglês, “*Generally Recognized As Safe*”, GRAS) para a administração oral e tópica, ou como tendo um estatuto jurídico aceite (Araújo *et al.*, 2009). Este facto demonstra a segurança com que se podem utilizar estes novos sistemas terapêuticos (NST), uma vez que o risco de toxicidade aguda e crónica é bastante reduzido (Souto e Müller, 2007).

As SLN foram desenvolvidas no início dos anos 90 como alternativa a outros NST, tais como as nanopartículas poliméricas, lipossomas e emulsões (Pardeike, Hommos e Müller, 2009).



**Figura 1:** Esquema ilustrativo da morfologia das SLN.

As SLN são vistas como novos transportadores coloidais para SA constituídos por lípidos sólidos (Müller, Mader e Gohla, 2000). O diâmetro destas partículas lipídicas varia entre 50 nm a 1 µm, apresentando um núcleo sólido (Sagalowicz e Leser, 2010) e uma elevada capacidade de carga aquando da incorporação de SA apolares (Souto *et al.*, 2011).

A Nanomedicina é definida como a ciência e a tecnologia de diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças e lesões traumáticas, de aliviar a dor, e de preservar e melhorar a saúde humana, usando ferramentas moleculares do corpo humano. Este conceito é baseado em escalas nanométricas com o objetivo de usá-las para conseguir benefícios médicos, visto que é nesta escala que se verifica uma ação a nível intracelular das moléculas e compostos (Diebold e Calonge, 2010).

A Nanotecnologia é um termo de origem grega “nano” cujo significado é anão (Araújo *et al.*, 2009), sendo a área da tecnologia que se dedica à utilização de estruturas de tamanho coloidal, ou seja, partículas de dimensões compreendidas entre 0,1 a 500 nm. Estas nanopartículas podem ser obtidas por vários processos, utilizando diversos materiais como os poliméricos, lipídicos e/ou por macromoléculas (Souto e Müller, 2007). Desta forma, à utilização, criação e manipulação de materiais, dispositivos ou sistemas em escala nanométrica é designada nanotecnologia (Fathi, Mozafari e Mohebbi, 2012).

As SLN podem ser vistas como transportadores de SA e, quando tal se verifica, podem ser classificadas como nanofarmacêuticos e/ou nanomedicinais. Assim, quando as SLN se encontram encapsuladas com SA, a sua finalidade é servir-lhe de veículo para que atinja de forma eficaz o local de ação ao qual se destina (Diebold e Calonge, 2010).

Aquando da encapsulação de SA em SLN, estas vão permitir um controlo da libertação da mesma, fazendo com que haja uma libertação da concentração adequada de SA no local-alvo (Souto e Müller, 2010) e que a concentração terapêutica seja mantida por um período de tempo maior, principalmente no caso de veicularem SA hidrófobas. Este aumento da biodisponibilidade após a administração da SA por via tópica, permitem uma redução da toxicidade e citotoxicidade (Diebold e Calonge, 2010). Estas nanopartículas têm a capacidade de proporcionarem um aumento da área de superfície e, conseqüentemente, melhorar a solubilidade da SA quando comparados com transportadores de escala micrométrica (Fathi, Mozafari e Mohebbi, 2012).

Pode verificar-se que as SLN tem surgido como sendo uma alternativa às formulações com lipossomas, visto que a utilização de SLN se revela mais vantajosa no que diz respeito à estabilidade física, custo de produção e possibilidade de produção em larga escala (Wissind e Müller, 2003) (Shah *et al.*, 2007).

Quando são comparadas nanoemulsões e lipossomas com SLN, estas exibem uma maior eficácia de encapsulação, permite um elevado controlo do perfil de libertação e uma taxa de degradação menor, permitindo uma libertação prolongada da SA. Apresentam ainda como vantagens a ausência de solventes orgânicos para a sua preparação, capacidade de produção em larga escala com esterilização e proteção da SA da degradação química (Fathi, Mozafari e Mohebbi, 2012).

As SLN são produzidas recorrendo a lípidos biocompatíveis e biodegradáveis, que apresentam com consistência sólida à temperatura ambiente e corporal. O facto destas nanopartículas apresentarem uma matriz sólida permitem uma libertação controlada da SA nelas incorporada, são facilmente produzidas em larga escala e, dependendo, da capacidade de carga da matriz para a SA é possível garantir uma estabilidade durante o tempo de armazenamento (Das *et al.*, 2011).

As nanopartículas lipídicas são obtidas tendo por base emulsões do tipo O/A em que a fase oleosa é substituída por um lípido sólido à temperatura ambiente e corporal, de elevado pureza ou por uma mistura de lípidos. A temperatura de fusão da matriz lipídica pode ser ajustada em função do local a que se destina, através da seleção de um lípido que cumpra os requisitos pretendidos (Müller, Mehnert e Souto, 2005).

As SLN são compostas, para além da matriz lipídica (0,1-30% lípidos dispersos em meio aquoso), por um agente tensioativo (0,5-5%) (Pardeike, Hommoss e Müller, 2009), podendo eventualmente, apresentar na sua constituição um agente tensioativo secundário. A composição da matriz e o método pelo qual as SLN são produzidas, irá influenciar as suas características físico-químicas, nomeadamente, a estabilidade, o tamanho das partículas, o índice de polidispersão, a eficácia de encapsulação, a capacidade de carga e o rendimento de todo o processo (Souto e Müller, 2010).

Em suma, a composição lipídica das nanopartículas tem revelado um papel crucial na velocidade com que as SLN são degradadas pelas enzimas lipolítica, como demonstram estudos elaborados *in vitro* (Mehnert e Mader, 2001).

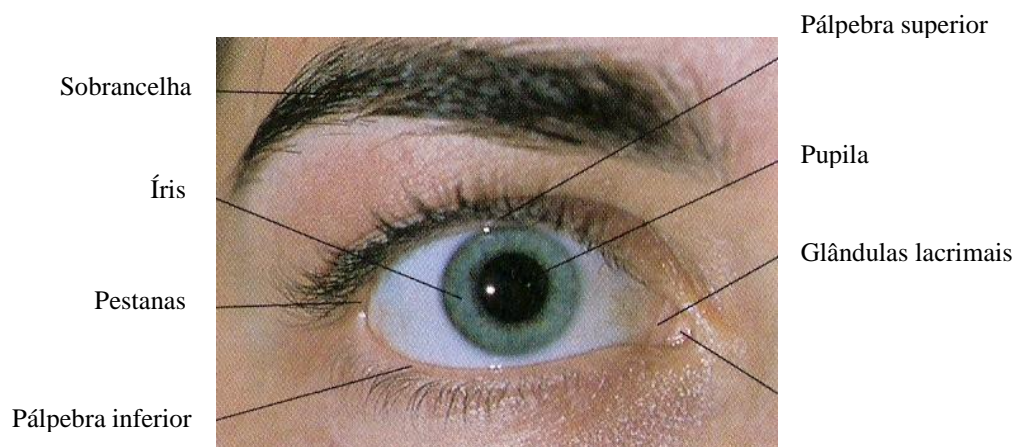
As formas farmacêuticas coloidais (lipossomas, nanopartículas, nanoemulsões, microemulsões, etc) aplicadas ao nível do olho, tendo sido alvo constante de diversos estudos (Gaudana *et al.*, 2009). A utilização destes NST permitem uma modificação na libertação da SA incorporada no local-alvo, diminuindo o número de aplicações, conferem maior estabilidade à SA e facilitam a sua passagem através das barreias anatómicas oculares e das bombas de efluxo (Gaudana *et al.*, 2010).

As SLN surgiram como um sistema de transporte para suprir problemas relacionados com a penetração de SA, podendo utilizar-se polímeros e/ou macromoléculas naturais de origem lipídica. Estes sistemas permitem, ainda, um aumento da oclusão, a proteção das SA que sejam facilmente sujeitas a degradações químicas e uma libertação controlada da SA (Müller, Mehnert e Souto, 2005).

Com base nas características físico-químicas (tamanho, forma e carga de superfície) exibidas pelas SLN, estas demonstram um elevado potencial para a aplicabilidade em tratamentos na área de oftalmologia, pela capacidade de aderirem à superfície ocular e interagirem com o epitélio ao nível do olho (Araújo *et al.*, 2011).

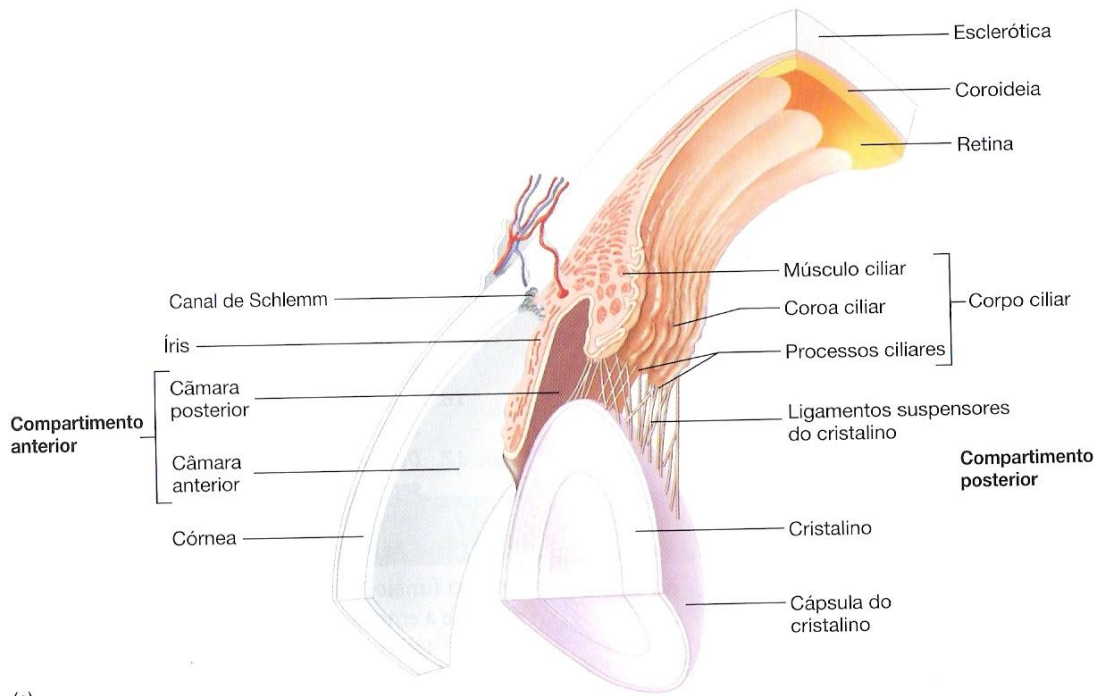
## 2. Administração ocular de SLN

O sistema visual é constituído pelos olhos, estruturas acessórias (sobrancelhas, pálpebras, glândulas lacrimais, pestanas, músculos extrínsecos do olho e conjuntiva) (Figura 2 e 3), nervos, feixes e vias óticas. Os olhos respondem à luz iniciando uma transmissão de sinais aferentes até ao encéfalo através das vias óticas e dos nervos. Ao passo que as estruturas acessórias pretendem assegurar a proteção dos olhos da luz direta do sol e das partículas agressivas, pois estas estruturas apresentam como função proteger, lubrificar, mover e auxiliar de diversas formas o funcionamento usual do olho (Seeley *et al.*, 2005).

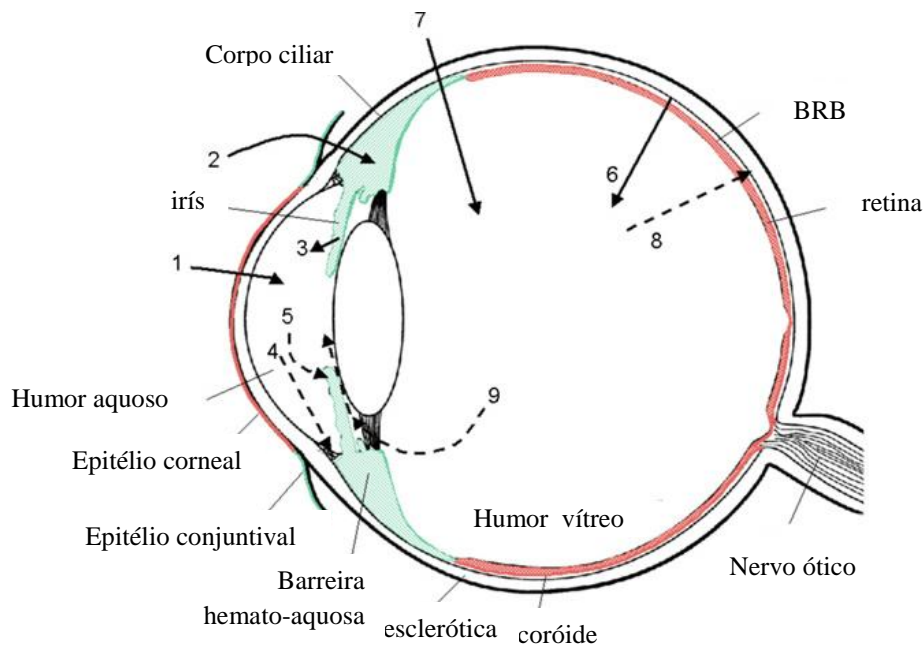


**Figura 2:** Componentes do sistema visual (adaptado de (Seeley *et al.*, 2005)).

Anatomicamente o olho é constituído por três camadas. A camada externa é constituída pela esclerótica (parte posterior) e pela córnea (parte anterior). A camada média é composta pelo corpo ciliar e pela íris. A camada interna é formada pela retina (Seeley *et al.*, 2005) (Figuras 3 e 4).



**Figura 3:** Esquema ilustrativo da anatomia do olho (adaptado de (Seeley *et al.*, 2005)).



**Figura 4:** Esquema ilustrativo da anatomia do olho e das diferentes vias que a SA pode seguir ao atingir o olho: 1) permeação transcorneal a partir do fluido lacrimal, dentro da

câmara anterior; 2) permeação não-corneal através da conjuntiva e esclerótica; 3) distribuição da SA através do fluxo sanguíneo via barreira hemato-aquosa para a câmara anterior; 4) eliminação da SA através da câmara anterior pelo humor aquoso; 5) eliminação da SA a partir do humor aquoso para a circulação sistêmica através da barreira hemato-aquosa; 6) distribuição da SA através do sangue para o olho posterior através da barreira hemato-retiniana (do inglês “*Blood Retinal Barrier*”, BRB); 7) administração intravítrea da SA; 8) eliminação da SA a partir do humor vítreo através da BRB; 9) eliminação da SA a partir do humor vítreo para a câmara posterior. (adaptado de (Urtti, 2006)).

A esclerótica (Figura 3 e 4) é a camada mais externa, apresentando uma estrutura firme, opaca e de cor branca. É constituída por tecido conjuntivo colagénico, rico em fibras elásticas, tendo como função a manutenção da forma do olho e a proteção das estruturas internas (Seeley *et al.*, 2005).

A córnea (Figura 3) é uma estrutura avascularizada, sem cor, que permite a entrada de luz no olho. Ela é constituída por tecido conjuntivo colagénico, fibras elásticas e proteoglicanos com uma camada de epitélio pavimentoso estratificado (superfície exterior) e uma camada de epitélio pavimentoso simples (superfície interior), apresentando um baixo conteúdo em água (Seeley *et al.*, 2005).

O olho pode ser dividido em dois compartimentos tendo em consideração a sua localização face ao cristalino. O compartimento anterior (Figura 3) é constituído pelas câmaras anterior (localizada entre a córnea e a íris) e posterior (localizada entre a íris e o cristalino) sendo ambas preenchidas pelo humor aquoso. O compartimento posterior (Figura 3) é rodeado quase na totalidade pela retina e pelo humor vítreo (Seeley *et al.*, 2005).

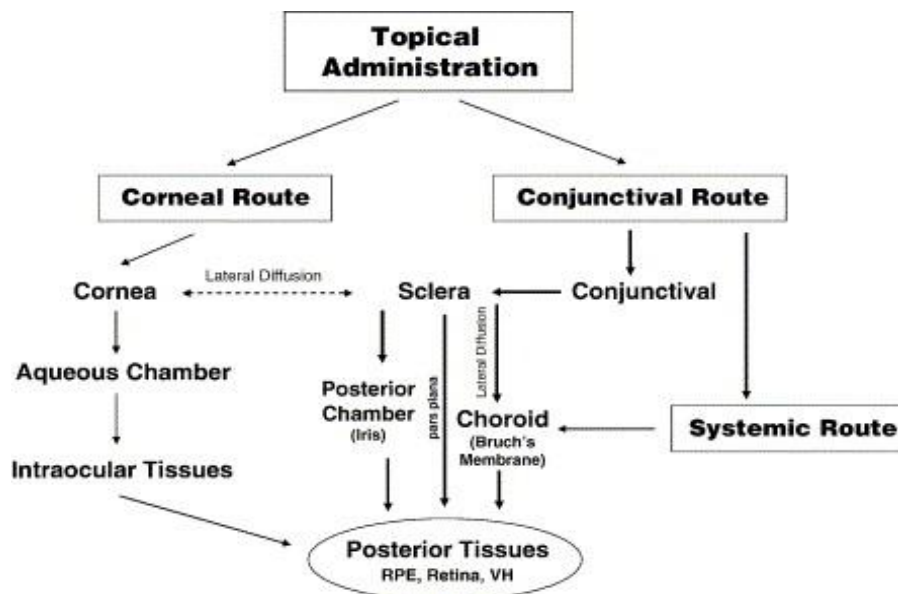
O desenvolvimento de um sistema de libertação de SA para um determinado tecido ocular consiste num grande desafio devido às características tão díspares apresentadas por cada componente do olho independentemente da via de administração. Para além das limitações anatómicas (diferentes camadas da córnea, esclerótica e retina) e fisiológicas (melanina, bombas de efluxo e influxo, fluxo sanguíneo, lacrimal e linfático) apresentadas pelo olho, as formulações oftálmicas também tem que ter em

linha de conta outros inúmeros fatores tais como a esterilidade, a isotonicidade, o pH, a viscosidade e a limpidez (Guadana *et al.*, 2010).

A administração de SA no segmento posterior do olho pode ser feita com recurso a diversas vias, nomeadamente, via tópica, via sistémica, via intravítrea e via periocular (Thrimawithana *et al.*, 2011).

A reduzida biodisponibilidade das SA administradas por via ocular, sob a forma convencional de colírios (soluções, suspensões e pomadas), deve-se, principalmente, a fatores pré-corneias (drenagem, pestanejar, lacrimejo, volume da lágrima e impermeabilidade relativa das SA para a membrana epitelial). Esta diminuição da biodisponibilidade das SA a nível ocular obriga a uma instilação frequente dos colírios para se atingir o efeito terapêutico. Em alguns casos, a instilação repetida pode levar a efeitos colaterais indesejáveis devido à absorção sistémica da SA (Gupta *et al.*, 2010).

Aquando da uma administração tópica (Figura 5) é necessário ter em consideração, para além das barreiras anatómicas e os fatores citados anteriormente, pois estes podem afetar negativamente a biodisponibilidade das SA, sendo a justificativa para apenas 5 % da dose aplicada atinja os tecidos intraoculares (Guadana *et al.*, 2010).



**Figura 5:** Distribuição das SA a nível ocular após a sua aplicação tópica (adaptada de (Hughes *et al.*, 2005)).

Cada camada da córnea oferece uma polaridade diferente e uma estrutura de taxa de limitação do potencial de permeação de SA. O epitélio corneano é lipófilo apresentando uma resistência significativa para a permeação de SA com características hidrófilas. O estroma da córnea é uma estrutura bastante hidratada, atuando como uma barreira à permeação de SA lipófilas. Desta forma, para a SA atravessar a córnea deve apresentar uma natureza anfipática. Relativamente à absorção de SA pela conjuntiva, esta é muito baixa devido à perda da SA para a circulação sistêmica pela presença de capilares sanguíneos e linfáticos. Um outro condicionamento é a presença de junções apertadas entre as células epiteliais, dificultando a penetração de SA com características lipófilas (Guadana *et al.*, 2010).

No que concerne à permeabilidade da esclerótica (Figura 3 e 4), esta é comparável à do estroma da córnea. Os estudos realizados por Geroski e Edelhauser demonstram que a permeabilidade das moléculas a este nível está dependente do seu raio (de forma inversamente proporcional) e da sua carga (moléculas carregadas positivamente apresentam menor permeabilidade) (Geroski e Edelhauser, 2001).

Assim, a via tópica não é eficaz para a administração de concentrações terapêuticas de SA para o segmento posterior, devido à drenagem rápida através do ducto nasolacrimal, baixa permeabilidade do epitélio corneano, absorção sistêmica que pode ocorrer e presença da barreira hemato-aquosa (Thrimawithana *et al.*, 2011).

Quando se procede à administração sistêmica, as principais barreiras com as quais nos confrontamos são a barreira hemato-aquosa e BRB (Guadana *et al.*, 2010).

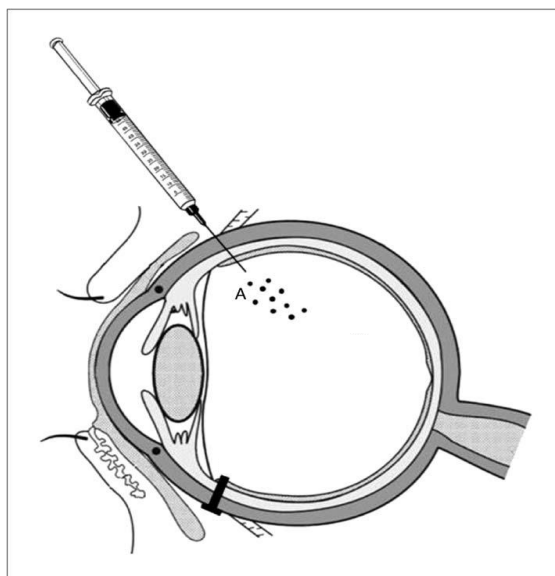
A BRB impede a difusão de SA administradas sistemicamente para o segmento posterior do olho, sendo que a administração de altas doses agrava a toxicidade intrínseca da SA, devido à absorção não específica. Consequentemente, as vias de administração ideais para a libertação de SA no segmento posterior são a via intravítrea (Figura 6) e a via periocular (Thrimawithana *et al.*, 2011). Os estudos têm demonstrado que compostos extremamente lipófilos tem a capacidade de penetrar a BRB, atingindo concentrações significativas ao nível do humor vítreo após a administração por via sistêmica (Hughes *et al.*, 2005).

A membrana limitante interna (do inglês, “*internal limiting membrane*”, ILM) e a BRB são as principais barreiras biológicas para o transporte de SA do humor vítreo para a

retina. A BRB é composta por células endoteliais dos vasos sanguíneos da retina e pelo epitélio pigmentado da retina (EPR), formando uma barreira secundária para o transporte de moléculas de SA lipófilas para as células internas da retina (Thrimawithana *et al.*, 2011).

Recentes avanços na área da nanotecnologia tem incentivado os pesquisadores a encontrarem formas de ultrapassar a BRB. Num dos estudos realizados, foi demonstrado que na administração de nanopartículas de ouro de 20 nm estas apresentavam capacidade para atravessar a BRB e para se distribuírem de forma uniforme por todas as camadas da retina, sem exibir citotoxicidade, e mantendo a viabilidade dos vários tipos de células. É ainda de referir que aquando da administração de nanopartículas de tamanhos superiores (100 nm) estas não foram encontradas ao nível da retina. No entanto, devido à toxicidade e as preocupações adjacentes à administração intravenosa de SA, não é muito comum a utilização desta via para o tratamento de doenças oculares (Guadana *et al.*, 2010).

A injeção intravítrea de SA envolve a injeção direta da formulação (Figura 6), na forma de solução, partículas, suspensão ou implantes, no segmento posterior do olho. Muitas SA destinadas a tratar doenças do segmento posterior do olho são administrados por esta via. Esta forma de administração permite obter maiores concentrações de SA ao nível da retina e minimiza os efeitos colaterais sistémicos. Porém, a administração frequente de SA por esta via pode levar ao descolamento de retina, hemorragia, endoftalmite e um aumento da pressão intraocular. Para minimizar algumas destas complicações, NST têm sido desenvolvidos na forma de SLN (Thrimawithana *et al.*, 2011).



**Figura 6:** Esquema ilustrativo da administração intravítrea de SA no segmento posterior do olho, no qual A representa a administração de micro ou nanopartículas injetados com recurso a uma agulha (adaptado de (Thrimawithana *et al.*, 2011)).

A via de administração periocular permite a deposição de moléculas contra a superfície externa da esclerótica, minimizando o risco de danos na retina e a endoftalmite associada à administração intravítrea. Esta via é considerada menos dolorosa e a mais eficiente na administração de SA para o segmento posterior do olho. Dentro desta via incluem-se as vias retrobulbar, peribulbar, subtenoniana e subconjuntival (Thrimawithana *et al.*, 2011).

As SA quando administradas pela via periocular podem atingir o segmento posterior por três vias: via transesclerótica, via circulação sistémica através da coróide e da via anterior através do filme lacrimal, córnea, humor aquoso e do humor vítreo (Guadana *et al.*, 2010).

A permeabilidade da esclerótica para as SA depende apenas do raio molecular que estas apresentam e não da sua lipofilia molecular, da hidratação esclerótica e da pressão intraocular (Thrimawithana *et al.*, 2011).

A eficácia terapêutica de qualquer SA, independentemente da via de administração selecionada, está intimamente relacionada com a sua biodisponibilidade. Para melhorar esta biodisponibilidade ao nível ocular as estratégias usadas tem como objetivo

umentar a penetração da SA na córnea e prolongar o tempo de permanência pré-corneal da SA (Gupta *et al.*, 2010).

Desta forma, o uso de sistemas baseados em nanotecnologia para a libertação de SA tais como microemulsões, nanosuspensões, nanopartículas, SLN, dendrímeros e lipossomas, tem sido usados com vista ao aumento da biodisponibilidade (Gupta *et al.*, 2010).

Para sistemas de libertação de SA de uso oftálmico é necessário ter presente que as partículas devem apresentar um tamanho apropriado e estável a longo prazo (elevado PZ), bem como uma pequena variação de tamanho (baixo IP) para que a irritação causada seja a menor possível. Cavalli *et al.* (2002) demonstrou que a aplicação de SLN que respeitem as características anteriormente descritas, não causam qualquer tipo de irritação a nível ocular (Gupta *et al.*, 2010).

As vantagens aquando da aplicação de SLN a nível ocular são diversas, sendo de referenciar a possibilidade de autoadministração por parte do paciente, não se verificarem alterações na visão, proteção contra enzimas metabólicas, capacidade de penetração sobre as células da córnea, libertação prolongada da SA e dirigidas para um determinado local de ação, reduzindo os efeitos secundários e a quantidade de SA a administrar (Araújo *et al.*, 2009).

A utilização de sistemas de libertação de SA nanotecnológicos, que respeitem os parâmetros acima descritos, pode revelar-se como sendo das melhores terapêuticas para enfermidades a nível ocular. Contudo, para cada SA devem ser estudadas quais as características ótimas (Araújo *et al.*, 2009).

Em suma, um sistema terapêutico adequado à cedência de SA a nível oftálmico deve obedecer aos seguintes parâmetros: instilação fácil e não irritante, apresentar uma boa penetração ao nível da córnea e conjuntiva, elevado tempo de residência na córnea, características reológicas apropriadas e um tamanho o mais pequeno possível (Souto *et al.*, 2010).

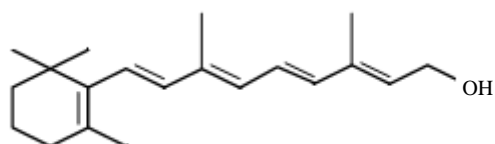
### 3. Aplicação do retinol na administração ocular

O retinol é comumente designado por vitamina A, visto que nos primórdios da descoberta das vitaminas estas eram designadas por letras de acordo com as suas características químicas, facto este, que caiu em desuso causado pelo aumento do número de conhecimento de vitaminas. Atualmente, são designadas pelo seu nome genérico, isto é, por uma designação própria (Falé e Soares, 2002).

As vitaminas encontram-se presentes em pequenas quantidades nos alimentos, sendo essenciais ao correto funcionamento metabólico do organismo. Elas podem ser classificadas em dois tipos consoante a sua solubilidade: hidrossolúveis e lipossolúveis, sendo que a vitamina A se inserem na classe das vitaminas lipossolúveis (Seeley *et al.*, 2005).

Devido a sensibilidade exibida pelas vitaminas, estas devem ser protegidas com substâncias antioxidantes para que a sua integridade não seja posta em causa e, conseqüentemente, a sua ação fisiológica (Gonnet, Lethuaut e Boury, 2010).

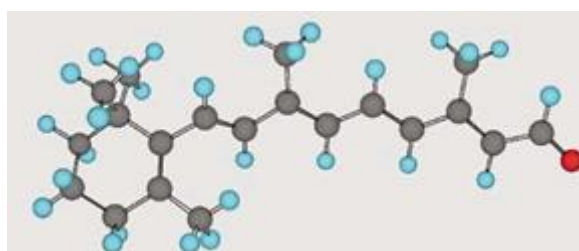
O retinol apresenta-se como sendo um álcool isoprenóide de cadeia pesada (Figura 7), sensível à degradação desencadeada por reações de oxidação e polimerização. Existem estudos que demonstram que quando o retinol é encapsulado em SLN, cerca de 50-70% da vitamina não se degrada (Sagalowicz e Leser, 2010).



**Figura 7:** Estrutura química da vitamina A (retinol).

A vitamina A apresenta-se, ao nível do organismo, sob diversas formas consoante a sua localização e atividade biológica (Gonnet, Lethuaut e Boury, 2010).

O retinol é obtido através da alimentação de forma direta ou sob a forma de ésteres e carotenóides, sendo uma das fontes mais ricas nesta substância é o fígado de animais (Jenning et al., 2000). *In vivo*, o retinol pode ser convertido em *all-trans*-retinal (Figura 8), através de um processo de oxidação, catalisado pela enzima redutase presente ao nível ocular, nomeadamente, na retina (Gonnet, Lethuaut e Boury, 2010).



**Figura 8:** Estrutura molecular do *all-trans*-retinal (adaptado de (McBee *et al.*, 2001)).

A presença da vitamina A no organismo em doses adequadas, é essencial para o processo de crescimento ósseo (Mason, 1994) e dos dentes, e desempenha um papel de extrema importância no processo da visão, sendo necessária à síntese de rodopsina (pigmento da retina) e à receção da luz de fraca intensidade (visão corpuscular) e ao funcionamento normal das células epiteliais (Falé e Soares, 2002). Assim, o retinol desempenha funções sobre a diferenciação celular, proliferação e hemóstase (Jenning, *et al.*, 2000). Desempenha também um papel fundamental sobre a manutenção da saúde da pele, nomeadamente no que diz respeito a desordens dermatológicas (como acne e dermatite), ao nível dos tecidos superficiais e mucosas, está envolvida no processo de propagação de colagénio e previne o seu envelhecimento (Jee *et al.*, 2006).

Uma deficiência vitamínica pode ser causada por diversos fatores, nomeadamente, por uma dieta inadequada, por necessidades aumentadas, gravidez, como consequência de certas patologias, bem como por ação de alguns medicamentos. Para contornar este

transtorno, as vitaminas, podem ser utilizadas clinicamente para a prevenção da sua falta e no tratamento de deficiências vitamínicas (Falé e Soares, 2002).

As necessidades de ingestão diária de retinol variam consoante a idade, o sexo e a atividade física (Tabela 1). Porém, a referência média de ingestão de retinol situa-se entre 20 a 30 UI de vitamina A/kg. No entanto, para assegurar o aporte das quantidades diárias necessárias, recomenda-se o consumo do dobro ou triplo das necessidades individuais (Falé e Soares, 2002).

**Tabela 1:** Ingestão diária de referência de retinol consoante a idade e o sexo (adaptada de (Falé e Soares, 2002)).

Idade	Retinol ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ )	
	Homem	Mulher
0 – 12 meses	350	
1 – 3 anos	400	
4 – 10 anos	500	
11 – 18 anos	600	
19 – $\geq$ 50 anos	700	600

Os sinais que surgem aquando de uma carência vitamínica, afetam diversos aparelhos constitutivos do nosso organismo, como se pode verificar na Tabela 2.

**Tabela 2:** Sinais de carência de retinol vulgarmente descritos (adaptada de (Falé e Soares, 2002)).

<b>Aparelho Ocular</b>	<b>Cegueira corpuscular</b> <b>Queratomalácia</b> <b>Lacrimejo</b> <b>Edema papilar</b>
------------------------	--

<b>Estado Geral</b>	<b>Anorexia</b> <b>Diminuição da taxa de crescimento</b> <b>Perda de peso</b> <b>Aumento da mortalidade</b> <b>Resistência ao stress</b>
<b>Aparelho Urinário</b>	Metaplasia do epitélio Aumento do risco da formação de cálculos
<b>Aparelho Genital</b>	Degenerência dos epitélios germinativos
<b>Aparelho Respiratório</b>	Metaplasias da mucosa Desaparecimento do epitélio ciliar Aumento da sensibilidade às infeções
<b>Aparelho Digestivo</b>	Queratinização das mucosas da boca e do esófago Aumento da sensibilidade às infeções bacterianas e parasitárias
<b>Pele</b>	Hiperqueratose Pelos secos e raros
<b>Sistema Ósseo</b>	Metaplasia Formação de tecido ósseo poroso

Quando ocorre um défice deste valor, como sintoma inicial, observa-se uma perturbação da púrpura retiniana, havendo o aparecimento de cegueira corpuscular, comumente designada de cegueira noturna. Pode surgir, também, um atraso no crescimento, o aparecimento de perturbações a nível da pele e um aumento da suscetibilidade a infeções (Seeley *et al.*, 2005).

A vitamina A atua sobre a visão, ativando o pigmento da retina, sensível à luz, que é indispensável para a visão sob escassa luminosidade (Cunha, 2005).

A cegueira noturna caracteriza-se pela má visibilidade aquando de um ambiente pouco iluminado. Quando esta perturbação ocorre de forma temporária a sua causa mais comum é um défice de vitamina A (Seeley *et al.*, 2005).

A xeroftalmia para além de ser uma patologia caracterizada por olhos secos, é também caracterizada por dificuldade de visão durante a noite. Esta enfermidade pode ser dividida em 4 etapas: xerose conjuntival, mancha de Bitot com xerose conjuntival, xerose corneal, ulcera corneal com xerose e queratomalácia (Organização Mundial de Saúde).

A posologia de retinol recomendada varia consoante a patologia a tratar. No caso de perturbações ao nível oftálmico, consoante a gravidade das mesmas, varia o tempo de tratamento bem como a dose a utilizar. Conforme demonstra a Tabela 3, para o tratamento da cegueira noturna, patologia alvo da formulação elaborada ao longo desta investigação, este deve ser realizado 2 a 3 vezes por semana, sendo a posologia de 50000 UI/dia de retinol (1 UI equivale a 0,344 µg de retinol) (Falé e Soares, 2002).

Através de estudos realizados em animais e humanos, alguns investigadores concluíram a eficácia da aplicação do retinol em estados de xeroftalmia leve a moderada (Deshpande *et al.*, 1997).

**Tabela 3:** Posologia de retinol necessária consoante o tipo de patologia a tratar (adaptada de (Falé e Soares, 2002)).

Patologia	Posologia (UI/dia)	
Oftálmica	Perturbações de visão noturna	50000 (2 a 3x semana)
	Xeroftalmia grave	200000 (vários meses)
	Queratomalácia grave	
Dermatologia	Disqueratoses	200000 (vários meses)
Afeções da mucosa	Rinite atrófica	200000 (vários meses)
	Cabelos e unhas quebradiças	100000
	Acne	100000 a 200000
Ginecologia	SPM	100000 a 150000 (10 dias)
Otorrinolaringologia	Surdez	150000 a 300000 (6 semanas)
	Zumbidos	

A administração de formulações de retinol está contraindicada na gravidez, lactação, hipervitaminose A, em casos de insuficiências hepática e renal, hiperlipidemia, hipersensibilidade e em situação de tratamento simultâneo com outros derivados de retinol (Falé e Soares, 2002).

Como se encontra anteriormente mencionado, a falta níveis adequados de retinol, pode causar cegueira pela interrupção do processo de fototransdução. Este é um processo que ocorre ao nível das células da retina aquando da captação de luz pelos pigmentos visuais, gerando um sinal neuronal (McBee *et al.*, 2001).

Para que a fototransdução se inicie, é necessário a isomeração do retinol a *all-trans*-retinal, induzida pela luz (Kuksa *et al.*, 2003), que vai ativar a rodopsina, por alteração conformacional desta proteína, tornando-a capaz de absorver a luz e gerar um sinal elétrico, levando à supressão da circulação de corrente elétrica escura (McBee *et al.*, 2001).

Sumariamente, devido às alterações oxidativas que podem ocorrer nas formulações de vitaminas, nomeadamente da vitamina A, existe uma necessidade crescente de criar novas alternativas para ultrapassar este problema. Assim, uma solução que tem vindo a ser adotada é a encapsulação de vitaminas de forma a impedir alterações que possam determinar a perda das suas propriedades fisiológicas. A encapsulação de vitaminas pode ser feita com recurso a micro e nanoencapsulações em que são criadas partículas que atuam como um reservatório para a incorporação de SA, ou partículas matriciais, partículas estas capazes de constituir uma barreira contra o processo de oxidação. A aplicação destas técnicas permite melhorar os efeitos biológicos, controlar o fornecimento das SA, aumentar o prazo de validade e a ocorrência de menos efeitos secundários (Zuccari *et al.*, 2005).

## Capítulo II – Obtenção de SLN contendo retinol: métodos de preparação e análise da estabilidade física.

Neste capítulo serão descritos todos os métodos e materiais necessários.

### 1. Preparação das SLN

#### 1.1. Materiais

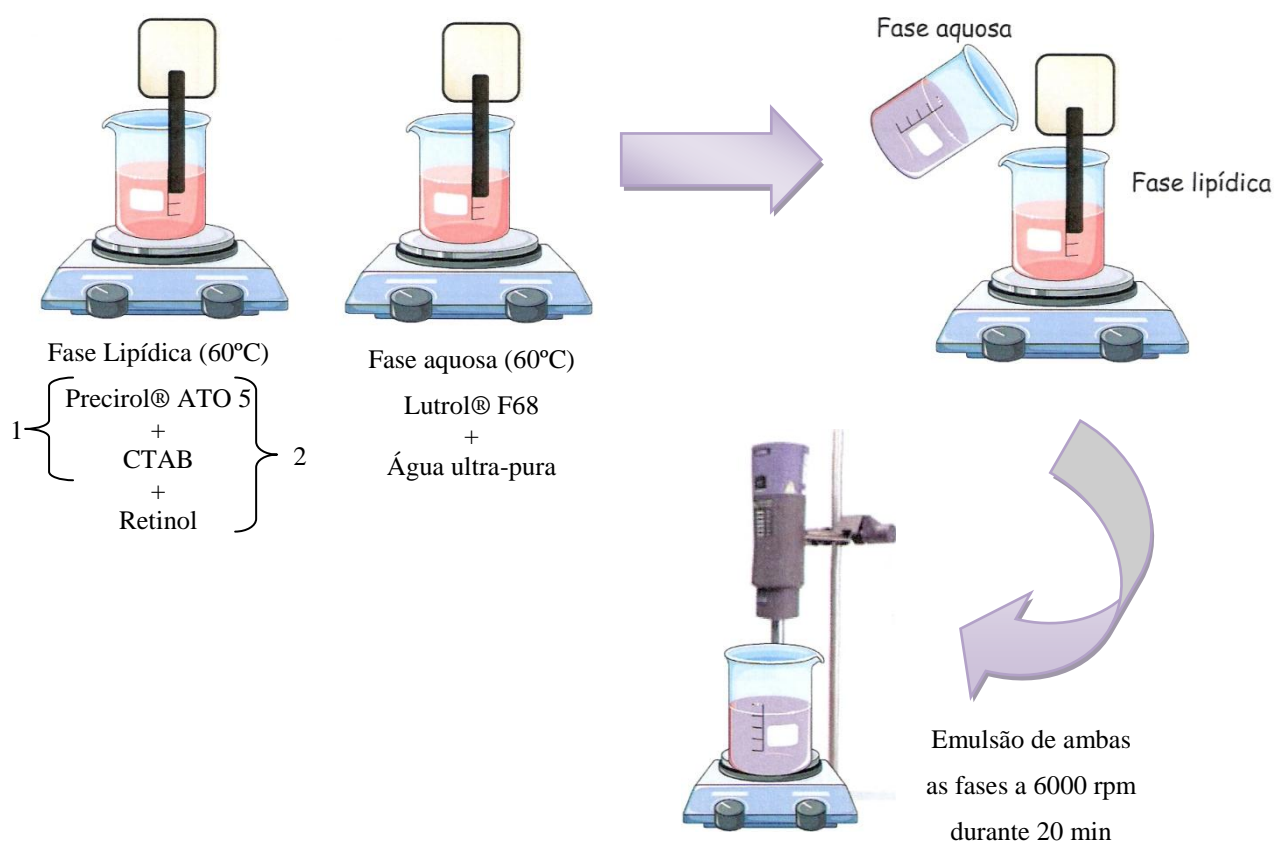
O lípido sólido utilizado foi o Precirol® ATO 5 (gliceril diestearato) que foi gratuitamente fornecido pela Gattefossé (Saint-Priest, França), o agente tensioativo Lutrol® F68 foi gratuitamente fornecido pela Basf (Ludwigshagen, Alemanha), o lípido catiónico brometo de cetiltrimetilamónio (do inglês, “*cetyltrimethylammonium bromide*”, CTAB) foi adquirido pela Sigma Aldrich (Sintra, Portugal), a SA utilizada foi o *all-trans*-retinal (aldeído do retinol) que foi obtido pela Sigma Aldrich (Sintra, Portugal), o etanol absoluto adquirido pela Panreac Química SA (Barcelona, Espanha), a água ultra purificada foi obtida a partir de um sistema MilliQ Plus (Millipore, Alemanha). Todos os reagentes foram utilizados sem qualquer tratamento adicional.

#### 1.2. Obtenção das SLN

A preparação das SLN foi realizada pelo método de homogeneização a alta velocidade. Neste método, efetua-se a fusão prévia do lípido sólido e, posteriormente, procede-se à incorporação da SA por dispersão ou dissolução. Após esta etapa, a fase aquosa, contendo um agente tensioativo do tipo O/A, é adicionada à fase lipídica, emulsionando-se por agitação mecânica a alta velocidade. A dispersão coloidal obtida é deixada à temperatura ambiente para a solidificação do lípido e, conseqüente, obtenção da dispersão aquosa de SLN (Souto *et al.*, 2011).

A aplicação do método de homogeneização a alta velocidade provoca a rutura das gotículas lipídicas de dimensões maiores, em gotículas de menores dimensões dispersas no seio da fase aquosa (Souto *et al.*, 2011), de forma menos agressiva comparativamente com o método de HPH e pelo uso de ultrassons. Este método torna-se, por isso, ideal para a manipulação de substâncias sensíveis, tais como as vitaminas.

Para a produção da dispersão coloidal de SLN foi utilizada a formulação apresentada na Tabela 6. A fase lipídica, constituída pelo Precirol® ATO 5 e pelo CTAB, foi colocada a fundir a 60°C, uma vez que o ponto de fusão do Precirol® ATO 5 se encontra entre 53-57°C. A fase aquosa, composta pela água ultrapura e pelo agente tensioativo O/A (Lutrol® F68) dissolvido foi submetida a aquecimento à mesma temperatura que a fase lipídica. Em seguida, emulsionaram-se ambas as fases a 6000 rpm durante 20 min (Figura 9). Finalmente, deixou-se a dispersão coloidal em repouso, à temperatura ambiente, para a formação da dispersão aquosa de SLN. Este foi o procedimento executado para a produção da formulação placebo.



**Figura 9:** Esquema ilustrativo da produção da SLN; 1) formulação placebo; 2) formulação contendo retinol.

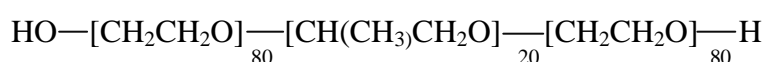
No que concerne à formulação contendo o retinol foi necessário realizar uma dissolução prévia da SA em 3,0 mL de etanol absoluto (devido a esta não ser completamente solúvel nos lípidos). Desta forma, o retinol dissolvido foi adicionado à fase lipídica fundida, a uma temperatura de 80°C, sob agitação, até evaporação do etanol, reduzindo-se gradualmente a temperatura até os 60°C.

Os agentes tensioativos, como o Lutrol® F68 (Figura 10), são utilizados para reduzir a tensão superficial das partículas (Mehnert e Mader, 2001), permitindo uma melhor dispersão das mesmas em meio aquoso. Os agentes tensioativos aceites para integrarem formulações de SNL para o tratamento de doenças oftálmicas encontram-se na Tabela 4 (Souto *et al.*, 2010).

**Tabela 4:** Agentes tensioativos utilizados em formulações de SLN destinadas à aplicação oftálmica (adaptado de (Souto *et al.*, 2010)).

Agentes tensioativos anfotéricos	Agentes tensioativos não-iônicos	Agentes tensioativos iônicos
L- $\alpha$ -phosphatidylcholine	Poloxâmero 188	Colato de sódio
Lipoid E80	Poloxâmero 407	Sulfato dodecilsódio
SP	Poloxamina 908	Glicolato de sódio
Epikuron 200, 95% SP	Diestearato de	Oleato de sódio
Lipoid S100	Poliglicerolmetilglucose	Taurocolato de sódio
Lipoid S75, 68% SP	Solutol HS15	Taurodeoxicolato de sódio
Phospholipon 90G, 90%	Span 20	
	Span 40	
	Span 60	
	Trehalose	
	Tween 20	
	Tween 40	
	Tween 80	
	Tyloxapol	

Dos agentes tensioativos aceites para utilização em aplicações oftálmicas (Mclain, 2008, *cit in Araújo et al.*, 2010,) foram selecionados três deles, de acordo com as referências bibliográficas consultadas para formulações de retinóides (Tween® 80 (Gonzalez-Mira *et al.*, 2010) e (Das *et al.*, 2011), Lecitina de soja (Lipoid® S75) (Liu *et al.*, 2007) e Lutrol® F68 (Araújo *et al.*, 2010)) para verificação de qual o agente tensioativo ideal para a formulação pretendida. Após a determinação do TMP, IP e PZ de cada uma das formulações (dados relativos a estas determinações não são demonstrados neste documento), aferiu-se que o melhor agente emulsivo seria o Lutrol® F68.



**Figura 10:** Estrutura química do Lutrol® F68.

O Lutrol® F68 é aceite pelas autoridades reguladoras para administração ocular pelo seu carácter não iónico e não causar irritação ocular quando aplicado neste tipo de formulações. Outros fundamentos tidos em consideração para esta escolha baseiam-se no facto de este agente tensioativo possuir um ponto de fusão próximo do ponto de fusão do lípido utilizado (Precirol® ATO 5) e um elevado valor de equilíbrio hidrolipídico (EHL) (Araújo *et al.*, 2010) (Tabela 5), e o facto de em estudos efetuados por Muhlen, ter-se verificado melhores resultados relativamente ao tamanho de partícula quando utilizava este agente tensioativo (Müller *et al.*, 1995).

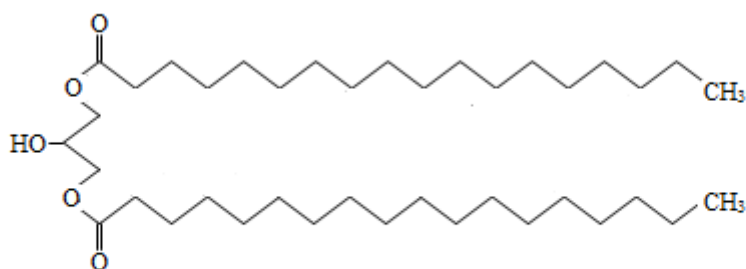
**Tabela 5:** Características do agente tensioativo Lutrol® F68 (adaptado de (Jannin *et al.*, 2006).

	Peso Molecular (g/mol)	% polímeros de polietilenoglicol	EHL	Ponto de fusão (°C)
Lutrol® F68	8436	81,8 ± 1,9	29	52

Este agente tensioativo é um copolímero com capacidade mucoadesiva, concedida pela sua carga positiva, o que confere às SLN essa carga permitindo a ocorrência de interações iônicas entre as nanopartículas e os resíduos de ácido siálico presentes no muco (carregados negativamente). Assim, verifica-se um aumento do tempo de residência das SLN e uma maior biodisponibilidade da SA (Nagarwal *et al.*, 2009). Por outro lado, o Lutrol® F68 permite a estabilização estérica das SLN fazendo com que a degradação das nanopartículas seja retardada, originando uma libertação prolongada da SA (Mehnert e Mader, 2001).

Gokce *et al.* (2008) num dos estudos realizados com Lutrol® F68 para avaliação da viabilidade das células epiteliais da córnea de coelho, verificou que estas não ficaram comprometidas na sua presença (Gokce *et al.*, 2008).

O Precirol® ATO 5 (Figura 11) foi o lípido escolhido para integrar a matriz lipídica sólida das SLN produzidas após a realização de um “*Lipid Screening*” (este método consiste em testar a solubilidade do retinol em diversos lípidos), no qual a SA a incorporar apresentou elevada solubilidade. Este lípido já tem sido aplicado noutras formulações como refere Souto *et al.* (2010), nomeadamente, algumas formulações destinadas à administração ocular (Gonzalez-Mira *et al.*, 2010).

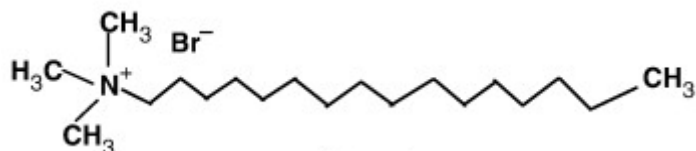


**Figura 11:** Estrutura química do Precirol® ATO 5.

Os estudos tem vindo a demonstrar que, por diversas vezes, a citotoxicidade verificada a nível ocular se deve à presença de agentes de superfície nas SLN do que propriamente devido à composição da matriz lipídica (Souto *et al.*, 2010).

Devido ao reduzido tamanho das SLN, estas apresentam propriedades adesivas, nomeadamente, propriedades mucoadesivas dependendo da composição superficial das nanopartículas. Desta forma, o uso de lípidos catiónicos permite um aumento da sua capacidade mucoadesiva para as células epiteliais oftálmicas, visto que estas apresentam carga aniónica, aumentando do tempo de contacto das SLN com a córnea, aumentando a biodisponibilidade da SA incorporada nas nanopartículas (Souto *et al.*, 2010).

O CTAB (Figura 12) é um lípido catiónico que foi selecionado para fazer parte desta formulação com base em estudo científicos onde foi demonstrado um transporte máximo da SA, quando esta se destina a ser aplicada na córnea, quando o sistema de transporte da SA se apresenta na forma catiónica, comparativamente com transportadores aniónicos e neutros (Gaudana *et al.*, 2010). Estes fenómenos ocorrem porque o epitélio corneal é carregado negativamente acima do ponto isoelétrico (Araújo *et al.*, 2009) permitindo uma atração entre as SLN e as células epiteliais da córnea.



**Figura 12:** Estrutura química do lípido catiónico (CTAB) (adaptado de (Manna e Chakravorti, 2012)).

Este tipo de lípidos são vulgarmente usados pela rapidez e simplicidade de os formular e por serem seguros do ponto de vista biológico (Lv *et al.*, 2006).

**Tabela 6:** Composição da Formulação

Constituintes	% (m/m)	
	Placebo	SLN com retinol
Precirol ATO 5	5	5
CTAB	0,5	0,5
Lutrol F 68	1	1
<i>all-trans</i> -retinal	-	0,05
Água ultra pura	qbp 100	qbp 100

## 2. Análise físico-química das SLN produzidas

### 2.1. Tamanho médio de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão

O TMP das SLN obtidas, assim como o PZ e o IP, foram medidos por espectroscopia de correlação fotônica a 25°C (espectrofotômetro de correlação fotônica; do inglês, “*photon correlation spectrophotometer*”, PCS) (Malvern Zetasizer Nanoseries) (Figura 13). As amostras foram diluídas em água ultra pura para a análise ocorrer em concentrações aceitáveis. No caso da determinação do PZ, as amostras foram diluídas em água ultra pura, cuja condutividade estava ajustada a -50  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , com uma solução de cloreto de sódio 0,9 % (m/v).

**Figura 13:** PCS utilizado (Ata Scientific – Specialists in Analytical Instrumentation).

A espectroscopia de correlação fotónica possui como fundamento a dispersão de luz que acontece devido à diferença dielétrica ocorrida entre o material e os meios circundantes na presença de partículas sólidas e líquidas envolvidas no campo eletromagnético do feixe de luz. Por conseguinte, as variações surgidas no campo eletromagnético induzem a oscilação dos dipolos das partículas procriando a irradiação de luz em diversas direções. Estas pequenas flutuações na intensidade da luz dispersa surgem devido aos movimentos brownianos (Gun'ko *et al.*, 2003).

Através do método anteriormente referido, tem sido exequível determinar o tamanho de partícula, peso molecular, forma das partículas, coeficientes de difusão bem como a sua agregação em dispersões coloidais e suspensões (Gun'ko *et al.*, 2003).

A determinação do TMP baseia-se na divergência da intensidade do campo eletromagnético, pela modificação da dispersão da luz quando há uma variação do tamanho da partícula e do comprimento de onda incidente na mesma (quanto menor o tamanho da partícula e do comprimento de onda, menor o tamanho da partícula) (Gun'ko *et al.*, 2003).

A determinação do IP permite saber quais as condições de estabilidade física das SLN produzidas, pois este parâmetro fornece a indicação da distribuição das SLN na dispersão coloidal. Quanto mais homogénea for esta distribuição, maior será a estabilidade da dispersão aquosa. Sabendo que o IP pode variar de 0-1, em que 1 representa a pior situação, isto é, na dispersão encontram-se presentes SLN de variados tamanhos, e em que 0 corresponde a uma situação ideal pois com essa premissa positiva, as SLN produzidas apresentariam todas o mesmo TMP.

A determinação do PZ fornece a informação acerca da estabilidade das nanopartículas durante as condições de armazenamento (Mehnert e Mader, 2001).

## 2.2. Estudos morfológicos por microscopia de fluorescência

Após a preparação das nanopartículas retirou-se 5,0  $\mu\text{L}$  para uma lâmina e foi observada com uma ampliação de 100x no microscópio de fluorescência (Eclipse 50i Nikon, Japão) (Figura 14).



**Figura 14:** Microscópio de fluorescência usado (Micron Optics - Nikon Microscope Systems for New Jersey and Puerto Rico).

Este é um método meramente auxiliar que permite verificar o estado das partículas, através da análise da sua morfologia e confirmando a ausência de agregados. Assim, o objetivo primário desta análise foi avaliar a qualidade das formulações de SLN produzidas, verificando, se as partículas se encontram agregadas/aglomeradas, a homogeneidade das partículas, bem como o tamanho das partículas, observando se estas apresentam grandes diferenças entre si.

## 2.3. Avaliação da estabilidade das formulações a longo prazo

A avaliação físico-química (TMP, IP e PZ) das formulações de SLN desenvolvidas foi realizada ao longo de 3 meses nos dias 0, 7, 14, 30, 60 e 90 após a sua produção. Para tal, as amostras foram armazenadas em tubos de Falcon devidamente selados a duas temperaturas diferentes, 25°C e 4°C. A avaliação a temperaturas distintas apresenta como objetivo a comparação da estabilidade das dispersões produzidas.

#### 2.4. Determinação da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga

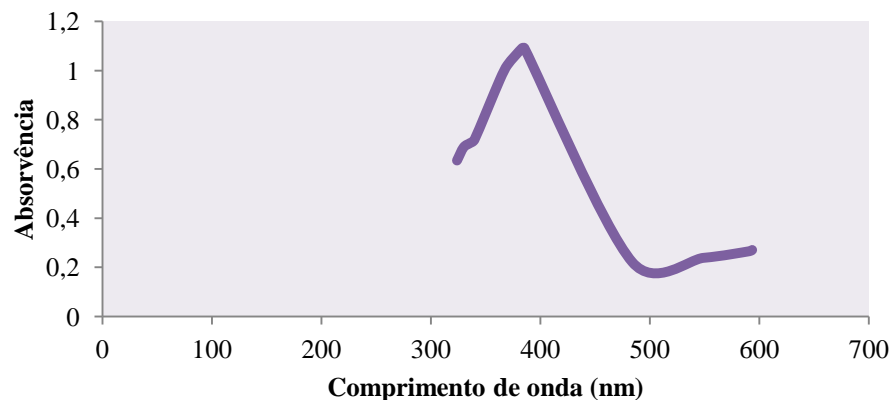
A avaliação da EE e da CC das SLN produzidas é aferida de forma indireta, através da determinação da quantidade de SA livre (não encapsulada) presente na fase aquosa.

A quantidade de retinol presente na fase aquosa é determinada através da elaboração de uma curva de calibração, tendo em consideração que o branco é realizado com o solvente usado (etanol absoluto) e que todas as amostras são medidas em triplicado.

Para a determinação do comprimento de onda efetuou-se um varrimento no espectro (Helios Gamma UV-Visible Spectrophotometer (Thermo)) (Figura 15) utilizando-se uma solução padrão de concentração de 1 mg/mL. O comprimento de onda máximo (384 nm) foi encontrado na solução de 1 ng/mL como se pode observar na Tabela 7 e na Figura 16.



**Figura 15:** Espectroscópio utilizado (Department of Chromatographic Methods).



**Figura16:** Representação gráfica da determinação do comprimento de onda máximo.

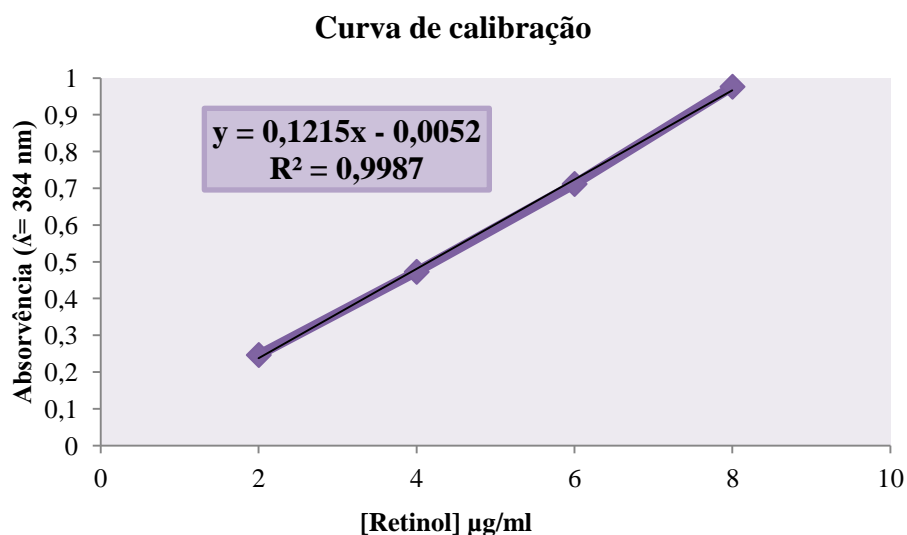
**Tabela 7:** Absorvências obtidas com uma solução padrão de concentração de 1 ng/mL a diferentes comprimentos de onda.

Comprimento de onda (nm)	Absorvência
316,0	0,543
324,0	0,634
330,0	0,687
336,0	0,705
340,0	0,719
363,0	0,961
370,0	1,022
383,5	1,091
385,5	1,091
484,0	0,221
549,0	0,238
591,0	0,265
593,5	0,270

Posteriormente, a obtenção da curva de calibração foi elaborada através da leitura das absorvências dos padrões de diferentes concentrações (1; 0,8; 0,6; 0,4 e 0,2 ng/mL), (apresentados na Tabela 8) representada na Figura 17.

**Tabela 8:** Apresentação das absorvências obtidas e respectivas médias para cada padrão.

[Retinol] µg/ml	Absorvência 1	Absorvência 2	Absorvência 3	Média das Absorvências
2	0,256	0,251	0,233	0,247
4	0,467	0,486	0,466	0,473
6	0,712	0,721	0,703	0,712
8	0,965	0,988	0,977	0,977



**Figura 17:** Curva de calibração obtida para o retinol nas concentrações compreendidas entre 2-8 µg/mL.

As amostras da formulação contendo o retinol necessitam de um tratamento prévio antes da leitura das respectivas absorvências no espectrofotômetro. Para tal, colocou-se 1mL da formulação num Eppendorf e procedeu-se à sua centrifugação (MiniSpin® Eppendorf) a 13,400 rpm durante 30 min. Após este procedimento, uma vez que as partículas depositam, é retirada uma alíquota de 100 µL de sobrenadante (a SA não encapsulada encontra-se em suspensão), perfazendo com o solvente utilizado até o volume de 1 mL e, então, é medida a absorvências das amostras (Tabela 9).

**Tabela 9:** Absorvências obtidas para as três alíquotas medidas e respetiva média.

Amostra	Absorvências
X1	0.257
X2	0.258
X3	0.252
Média	<b>0.256</b>

A avaliação da quantidade de retinol aprisionado nas SLN é um parâmetro bastante relevante pois este condiciona o perfil de libertação da SA bem como a concentração da SA presente na matriz lipídica.

Por interpolação gráfica, obtêm-se a quantidade de retinol presente nas alíquotas medidas.

A CC do NST está diretamente relacionada com os locais disponíveis na matriz cristalina das SLN produzidas para o aprisionamento da SA. Para a determinação deste parâmetro, aplica-se a seguinte fórmula:

$$CC (\%) = \frac{\text{Quantidade de SA encapsulada}}{\text{Quantidade total de lípido}} \times 100$$

A EE relaciona-se com a quantidade de SA que foi eficazmente incorporada nas SLN. Para a sua determinação utiliza-se a fórmula seguinte:

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantidade de SA encapsulada}}{\text{Quantidade total teórica de SA}} \times 100$$

## **Capítulo III – Apresentação e discussão dos resultados obtidos**

### **1. Preparação das SLN**

Após a observação macroscópica de ambas as formulações foi possível verificar que estas se apresentavam homogêneas, com aspeto leitoso e sem aderência às paredes. A formulação contendo o retinol ostentava uma coloração amarela característica da SA contida. Com base nas características acima indicadas conclui-se que as formulações se manifestam como dispersões macroscopicamente estáveis. Contudo, a sua caracterização físico-química é essencial para avaliar a sua estabilidade nanométrica.

### **2. Análise físico-química das SLN produzidas**

#### **2.1. Tamanho médio de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão**

A degradação das nanopartículas está diretamente relacionada com o grau de cristalinidade da matriz lipídica, morfologia e dimensão e com o estado físico e peso molecular da SA encapsulada.

O TMP é um dos parâmetros tidos em consideração no desenvolvimento de formulações para a aplicação tópica a nível ocular, uma vez que este influencia a sua absorção/penetração assim como a eficácia de encapsulação do retinol. Mediante a determinação do TMP é possível avaliar o risco de irritação e desconforto que as partículas puderam causar (Araújo *et al.*, 2010).

Nagarwal *et al.* (2009) refere que um TMP inferior a 100 nm demonstra uma maior absorção das SLN comparativamente com dimensões entre os 800 e 1000 nm e que

estas são capazes de penetrar mais facilmente as barreiras do olho aquando da administração tópica.

É de referir que, segundo Li *et al.* (2008), o TMP tolerado pelo olho humano é de cerca de 10  $\mu\text{m}$ .

A determinação do PZ fornece informação sobre a carga de superfície das partículas (Nagarwal *et al.*, 2009), sendo uma medida indireta de avaliação da estabilidade física das SLN a longo prazo (Gonzalez-Mira *et al.*, 2010).

Este parâmetro revela-se importante na medida em que determina as interações que podem ocorrer entre as membranas celulares e as SLN aquando da sua administração a nível ocular (Nagarwal *et al.*, 2009) remetendo para a sua capacidade mucoadesiva. O PZ das SLN interfere na estabilidade destas nanopartículas, pois estas encontram-se dispersas em solução aquosa e, a repulsão eletrostática entre elas evita a ocorrência de agregação (Gonzalez-Mira *et al.*, 2010).

Para que se verifique a estabilização eletrostática das partículas, isto é, uma repulsão elétrica das mesmas, é necessário que os valores de PZ (positiva ou negativamente carregados) sejam próximos de 30 mV, pois na presença de valores elevados de PZ, a dispersão mantém-se estável (Nagarwal *et al.*, 2009). Porém, nesta formulação, não se pode retirar uma conclusão tão linear, uma vez que, o agente tensioativo utilizado, permite uma estabilização estérica das SLN causando uma diminuição do PZ (Mehnert e Mader, 2001).

Consoante consta na Tabela 10 o TMP obtido na análise da formulação contendo o retinol, é de 209,5 nm, sendo bem tolerada pelo olho humano e tendo dimensões próximas das dimensões que apresentam maior absorção ao nível ocular.

Relativamente ao PZ determinado (20,5 mV), verificou-se que este se encontrava um pouco diferente dos 30 mV referidos na literatura como valor de referência para que adquira uma estabilização física a longo prazo por reações eletrostáticas. As SLN evidenciam uma carga de superfície positiva, o que lhes confere propriedades mucoadesivas, permitindo uma maior interação destas com a camada córnea.

No que concerne ao IP, em formulações destinadas a instilação ocular, este deve ser o menor possível com mencionado anteriormente. Após a sua determinação, verificou-se

que este se apresentava um pouco elevado (0,395) para a sua finalidade, podendo na sua administração surgir algum tipo de irritação e intolerância por incompatibilidade com os tecidos oculares.

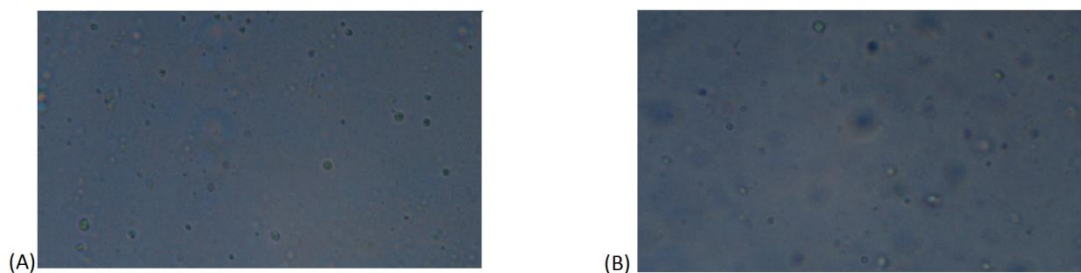
**Tabela 10:** Resultados da análise físico-química efetuada a ambas as dispersões coloidais

Formulação	TMP (nm)	IP	PZ (mV)
Placebo	263,6 ± 8,905	0,540 ± 0,047	22,9 ± 0,636
Com Retinol	209,5 ± 1,570	0,395 ± 0,005	20,5 ± 1,70

## 2.2. Estudos morfológicos por microscopia de fluorescência

A visualização das formulações placebo e com retinol obtida por microscopia de fluorescência, permitiu confirmar os resultados obtidos na análise macroscópica das mesmas. Assim, verificou-se a presença de SLN de forma esférica, dimensões semelhantes e ausência de agregados, como evidencia a Figura 18 e como comprovam os resultados obtidos da avaliação físico-química.

Um outro parâmetro analisado foi a movimentação das partículas, podendo visualizar-se que estas apresentavam os esperados movimentos brownianos (movimentos intrínsecos das partículas).



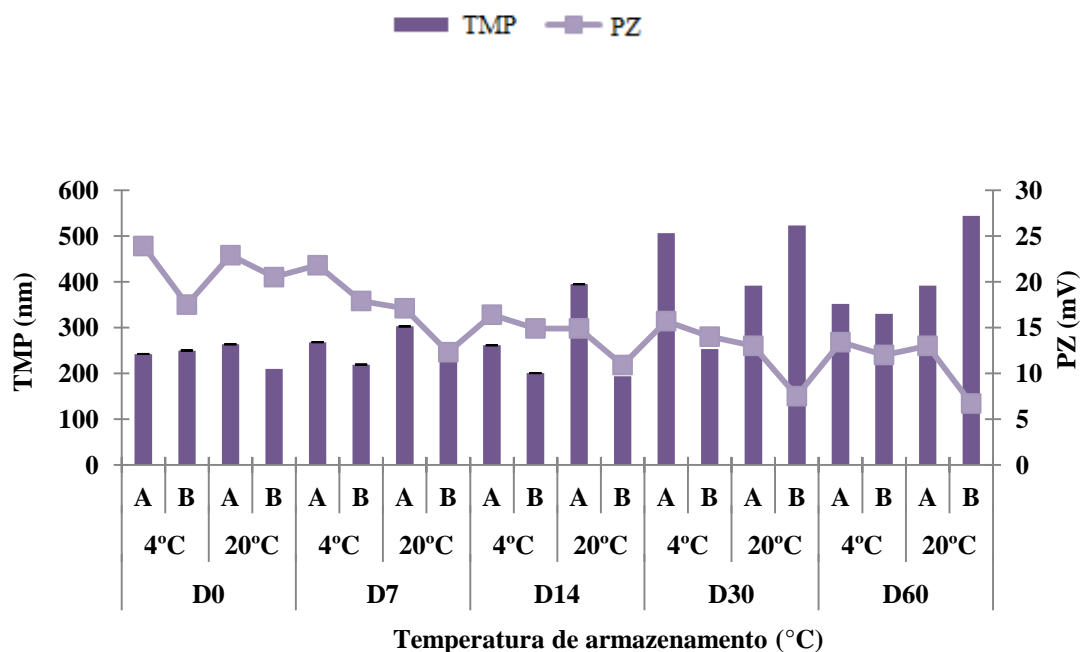
**Figura 18:** (A) – Fotografia da observação microscópica da formulação placebo obtida; (B) – Fotografia da observação microscópica da formulação obtida contendo retinol.

### 2.3 Avaliação da estabilidade das formulações a longo prazo

Os resultados obtidos da avaliação da estabilidade das formulações a longo prazo encontram-se documentados na Tabela 11 e podem ser visualizados na Figura 19.

**Tabela 11:** Resultados obtidos referentes à avaliação da estabilidade a longo prazo

Temperatura ambiente					4°C				
Dia	Formu- lação	TMP (nm)	PI	PZ (mV)	Dia	Formu- lação	TMP (nm)	PI	PZ (mV)
D <sub>0</sub>	Placebo	263,6±8,905	0,540±0,047	22,9±0,636	D <sub>0</sub>	Placebo	242,1±2,421	0,406±0,004	23,9±1,13
D <sub>0</sub>	Retinol	209,5±1,570	0,395±0,005	20,5±1,70	D <sub>0</sub>	Retinol	249,7±10,55	0,453±0,056	17,5±0,420
D <sub>7</sub>	Placebo	302,4±26,21	0,493±0,026	17,1±0,354	D <sub>7</sub>	Placebo	267,9±23,14	0,418±0,013	21,8±1,27
D <sub>7</sub>	Retinol	232,0±11,12	0,665±0,130	12,3±0,283	D <sub>7</sub>	Retinol	218,9±1,361	0,285±0,003	17,9±0,919
D <sub>14</sub>	Placebo	394,6±37,74	0,773±0,088	14,9±0,141	D <sub>14</sub>	Placebo	261,2±11,68	0,435±0,020	16,4±0,141
D <sub>14</sub>	Retinol	193,4±42,28	0,415±0,055	10,9±0,000	D <sub>14</sub>	Retinol	200,3±4,310	0,397±0,015	14,3±1,56
D <sub>30</sub>	Placebo	391,6±20,38	0,584±0,077	19,9±0,990	D <sub>30</sub>	Placebo	506,4±13,75	0,624±0,051	15,4±2,12
D <sub>30</sub>	Retinol	523,1±29,81	0,604±0,051	7,50±2,10	D <sub>30</sub>	Retinol	253,0±4,571	0,397±0,015	13,8±0,707
D <sub>60</sub>	Placebo	391,6±47,56	0,556±0,076	13,0±0,495	D <sub>60</sub>	Placebo	351,2±47,56	0,505±0,076	18,9±0,495
D <sub>60</sub>	Retinol	544,0±5,197	0,481±0,056	6,70±0,707	D <sub>60</sub>	Retinol	238,9±5,197	0,411±0,056	13,8±0,707



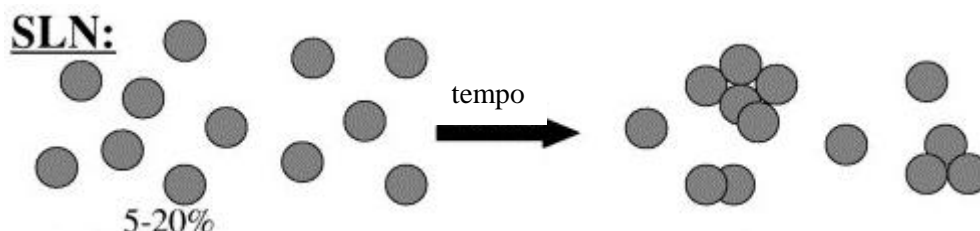
**Figura 19:** Representação gráfica da estabilidade físico-química das SLN (placebo e com retinol) a longo prazo (7, 14, 30 e 60 dias após a produção).

Como demonstrado na Tabela 11, o TMP tende a aumentar ao longo do tempo. Este fenómeno é facilmente explicado pelo facto de ao longo do tempo as partículas de menores dimensões apresentarem uma tendência para se depositarem sobre as partículas de maiores dimensões (Figura 20), incorporando-as, causando um aumento do TMP (Araújo *et al.*, 2011).

Como consequência do acontecimento referido anteriormente, verificam-se alterações sucessivas de aumento e decréscimo nos valores do IP das SLN produzidas (Tabela 11).

Relativamente ao PZ, este decresce ao longo do tempo devido às moléculas de CTAB se agregarem ao Precirol® ATO 5, como “*guest molecules*” (Tabela 11). Ao longo do tempo de armazenamento, ocorre um aumento da cristalinidade das SLN, que poderá estar associado à alteração da configuração termodinâmica da matriz lipídica para uma configuração mais estável. Este rearranjo na matriz lipídica das SLN, pode conduzir à expulsão das “*guest molecules*”, ou seja, à expulsão do CTAB da superfície da matriz lipídica e, conseqüente aumento do PZ (Vighi *et al.*, 2007).

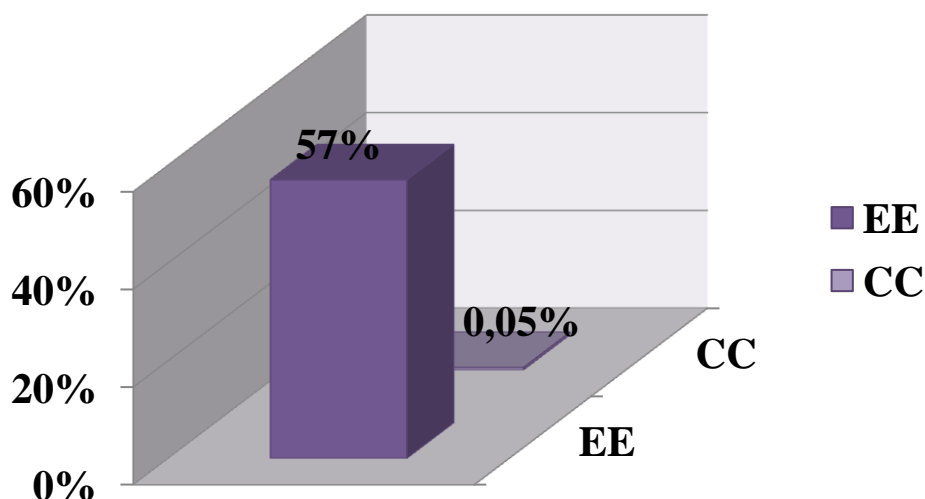
Comparando os resultados obtidos para ambas as temperaturas de armazenamento testadas, verifica-se uma maior estabilidade a longo prazo quando o armazenamento da formulação é efetuado a 4°C, quer ao nível do TMP, quer do IP, bem como do PZ.



**Figura 20:** Esquema ilustrativo do que acontece ao longo do tempo às SLN (adaptado de (Müller *et al.*, 2002).

#### 2.4 Análise da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga

Tendo por base os resultados apresentados na Tabela 11, após a interpolação gráfica na curva de calibração obtida (Figura 17), obteve-se a concentração final de retinol presente na formulação, tendo em consideração o fator de diluição de 1000:100. Seguidamente, determina-se a quantidade de retinol não encapsulado, sabendo que o volume final da formulação é de 10 mL, conseguindo-se, de forma indireta, determinar a quantidade de retinol encapsulada. Posteriormente, procedeu-se à aplicação das fórmulas anteriormente mencionadas, para a determinação da CC e da EE das SLN produzida. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 21.



**Figura 21:** Representação gráfica dos resultados obtidos para a EE e CC.

Com base nos resultados apresentados na Figura 21, verifica-se que 57% da quantidade de retinol adicionada à formulação foi aprisionada na matriz lipídica das SLN produzidas. Contudo, os locais disponíveis para a encapsulação de retinol são apenas de 0,05%. Desta forma, pode constatar-se que as SLN produzidas apresentam uma matriz lipídica estável pois possuem poucos locais livres para o aprisionamento do retinol, consequência de um elevado nível de organização da estrutura da matriz lipídica.

Em suma, para aumentar a eficácia de encapsulação do retinol teria de ocorrer uma modificação na estrutura tridimensional da matriz lipídica para uma forma estrutural de menor organização, para que existisse um maior número de locais disponíveis para o aprisionamento do retinol.

## Capítulo IV – Conclusão Geral

Nos últimos anos, tem sido evidente que a descoberta e criação de novas SA não é suficiente para um avanço na terapêutica e prevenção de doenças de diversas etiologias. Para que este avanço ocorra é necessário a criação de novos sistemas de transportes para as SA já existentes e para as que ainda se encontram em estudo. Desta forma, será possível obter todas as vantagens das suas aplicações, uma eficácia máxima e uma redução os efeitos colaterais.

As doenças do âmbito oftálmico passam, na maioria das vezes, por tratamentos invasivos em que não se verifica uma libertação controlada e prolongada da SA, sendo necessários repetir as aplicações. Para contornar este facto, o desenvolvimento de técnicas não invasivas com recurso a NST, como as SLN utilizadas neste projeto, apresentam um elevado potencial na área da oftalmologia.

Sabe-se que, a formulação de SLN produzidas apresenta 285 µg de retinol e, com base na Tabela 3, as necessidades diárias para o tratamento de uma deficiência na visão noturna, são de 50000 UI, 2 a 3 vezes por semana, o que corresponde a um total de 17200 µg. Desta forma, compreende-se que a formulação produzida não conseguiria responder de forma adequada quando utilizada como fim para o tratamento da cegueira noturna, sendo necessária uma formulação mais concentrada para uma terapêutica.

As SLN atualmente, tem estado a ser alvo de desenvolvimento, nomeadamente, para a aplicação a nível oftálmico. Uma mais-valia do desenvolvimento deste tipo de sistema coloidal prende-se com o facto de a sua produção ser facilmente executada a nível laboratorial em grande escala. À medida que são publicados mais estudos denota-se que a eficácia destes NST, não está apenas dependente da composição e do método selecionado para a obtenção das SLN. Desta forma, são necessários mais estudos para que as SLN se tornem mais eficazes como transportadores de SA destinados a administração ocular.

Futuramente, a aplicação de SLN no tratamento de doenças oftálmicas, esteja largamente investigada e que possa constituir um método seguro e eficaz para a terapêutica na área de oftalmologia.

## Capítulo V – Referências Bibliográficas

Araújo, J., *et alli.* (2009). Nanomedicines for ocular NSAIDs: safety on drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5, pp. 394-401.

Araújo, J., *et alli.* (2010). Optimization and physicochemical characterization of triamcinolone acetonide-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 393, pp. 167-175.

Araújo, J., *et alli.* (2011). Nanostructured lipid carriers for triamcinolone acetonide delivery to the posterior segment of the eye. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88, pp. 150-157.

Ata Scientific – Specialists in Analytical Instrumentation. [Em linha]. Disponível em <[http://www.atascientific.com.au/images/photos/cromatography/hplc-detectors/hplc-detectors04.jpg&w=278&h=231&ei=MYdLUK6EB6G\\_0QWrxYD4Bg&zoom=1&iact=hc&vpx=831&vpy=269&dur=150&hovh=184&hovw=222&tx=80&ty=121&sig=103579748960742478399&page=2&tbnh=138&tbnw=166&start=18&ndsp=22&ved=1t:429,r:14,s:18,i:172](http://www.atascientific.com.au/images/photos/cromatography/hplc-detectors/hplc-detectors04.jpg&w=278&h=231&ei=MYdLUK6EB6G_0QWrxYD4Bg&zoom=1&iact=hc&vpx=831&vpy=269&dur=150&hovh=184&hovw=222&tx=80&ty=121&sig=103579748960742478399&page=2&tbnh=138&tbnw=166&start=18&ndsp=22&ved=1t:429,r:14,s:18,i:172)>. [Consultado em 08/09/2012].

Cavalli, R., *et alli.* (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *International Journal of Pharmaceutics*, 238, pp. 241-245.

Cunha, A. P. D. (2005). Atividade biológica e interesse farmacêutico dos caratenóides. In: Cunha, A. P. D. (Ed.). *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, p. 480.

Das, S., *et alli.* (2011). Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: Effects of process variables. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88, pp. 483-489.

Department of Chromatographic Methods. [Em linha]. Disponível em <<http://chromatografia.umcs.lublin.pl/grafika/aparatura/heliosico.gif&w=157&h=100&ei=oQxPUOLCCueY1AWtwoCQDw&zoom=1&iact=hc&vpx=765&vpy=453&dur=149&hovh=80&hovw=125&tx=99&ty=63&sig=103579748960742478399&page=1&tbn>>

h=80&tbnw=125&start=0&ndsp=18&ved=1t:429,r:15,s:0,i:119>. [Consultado em 08/09/2012].

Deshpande, A., *et alli.* (1997). Therapeutic applications of retinoids in ophthalmology. *International Journal of Pharmaceutics*, 157, pp. 1-15.

Diebol, Y., *et alli.* (2010). Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29, pp. 596-609.

Falé, A. G. e Soares L. (2002). Vitaminas. In: Soares, M. A. (Ed.). *Medicamentos não Prescritos Aconselhamento Farmacêutico*. 2ª Edição. Lisboa, Publicações Farmácia Portuguesa, pp. 1091-1097.

Fathi, M., Mozafari, M. e Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 23, pp. 13-27.

Geroski, D. H. e Edelhauser, H. F. (2001). Transscleral drug delivery for posterior segment disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52, pp. 37-48.

Gokce, E. H. *et alli.* (2008). Cyclosporine A loaded SLNs: Evaluation of cellular uptake and corneal cytotoxicity. *International Journal of Pharmaceutics*, 364, pp. 76-86.

Gonnet, M., Lethuaut, L. e Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146, pp. 276-290.

Gonzalez- Mira, E. *et alli.* (2010). Design and ocular tolerance of flurbiprofen loaded ultrasound-engineered NLC. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81, pp. 412-421.

Guadana, R. *et alii.* (2009). Recent perspectives in ocular drug delivery. *Pharmaceutical Research*, 5, pp. 1197-1216.

Guadana, R. *et alii.* (2010). Ocular Drug Delivery. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 12, pp. 348-360.

Gun'ko, V. M. *et alli.* (2003). Photon correlation spectroscopy investigations of proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 105, pp. 201-328.

Gupta, H. *et alii.* (2010). Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6, pp. 324-333.

Hughes, P. M., *et alli.* (2005). Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, pp. 2010-2032.

Jannin, V., Pochard, E. e Chambin, O. (2006). Influence of Poloxâmicos on the dissolution performance and stability of controlled-release formulations containing Precirol® ATO 5. *International Journal of Pharmaceutics*, 309, pp. 6-15.

Jee, J.-P. *et alli.* (2006). Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 63, pp. 134-139.

Jenning, V. *et alii.* (2000). Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 49, pp. 211-218.

Jenning, V. *et alii.* (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN™) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a 1H-NMR study. *International Journal of Pharmaceutics*, 205, pp. 15-21.

Kaneko, F., Yano, J. e Sato, K. (1998). Diversity in the fatty-acid conformation and chain packing of cis-unsaturated lipids. *Current Opinion in Structural Biology*, 8, pp. 417-425.

Kuksa, V. *et alii.* (2003). Retinoid cycle in the vertebrate retina: experimental approaches and mechanisms of isomerization. *Vision Research*, 43, pp. 2959-2981.

Li, X., *et alli.* (2008). A controlled-release ocular delivery system for ibuprofen based on nanostructured lipid carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 363, pp. 177-182.

Liu, J. *et alli.* (2007). Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 328, pp. 191-195.

Lv, H. *et alli.* (2006). Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 114, pp. 100-109.

Manna, A. e Chakravorti, S. (2012). Effect micellar environment on charge transfer dye photophysics. *Journal of Molecular Liquids*, 168, pp. 94-101.

Mason, P. (1994). Fármacos y nutrición. Suplementos dietéticos. *In: Mason, P. (Ed.). Asesoramiento nutricional y dietético en la oficina de Farmacia*. Zaragoza, Editorial Acribia, SA, p. 261.

Mason, P. (1994). Apêndice. *In: Mason, P. (Ed.). Asesoramiento nutricional y dietético en la oficina de Farmacia*. Zaragoza, Editorial Acribia, SA, p. 326.

McBee, J. *et alli*. (2001). Confronting Complexity: the Interlink of Phototransduction and Retinoid Metabolism in the Vertebrate Retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 20, pp. 469-529.

Mehnert, W. e Mader, K. (2001). Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, pp. 165-196.

Micron Optics - Nikon Microscope Systems for New Jersey and Puerto Rico. [Em linha]. Disponível em [http://www.micron-optics.com/50i\\_360.jpg&w=360&h=360&ei=NIhLULKAGqLA0QWmw4DADQ&zoom=1&iact=hc&vpx=367&vpy=135&dur=204&hovh=225&hovw=225&tx=135&ty=138&sig=103579748960742478399&page=1&tbnh=141&tbnw=137&start=0&ndsp=21&ved=1t:429,r:1,s:0,i:72](http://www.micron-optics.com/50i_360.jpg&w=360&h=360&ei=NIhLULKAGqLA0QWmw4DADQ&zoom=1&iact=hc&vpx=367&vpy=135&dur=204&hovh=225&hovw=225&tx=135&ty=138&sig=103579748960742478399&page=1&tbnh=141&tbnw=137&start=0&ndsp=21&ved=1t:429,r:1,s:0,i:72). [Consultado em 08/09/2012].

Müller, R.H. *et alli* (1995). Solid lipid nanoparticles (SLN) – An alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 41, pp. 62-69.

Müller, R. H., Mader, K. e Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, pp. 161-177.

Müller, R. H., Mehnert, W. e Souto, E. B. (2005). Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for Dermal Delivery. *In: Bronaugh, R. L. e Maibach, H. I. (Ed.). Percutaneous Absorption – Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methods*. 4ª Edição. Informa Healthcare, pp. 719-738.

Nagarwal, R. C. *et alli.* (2009). Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 136, pp. 2-13.

Pardeike, J., Hommoss, A. e Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, 366, pp. 170-184.

Pozo-Rodríguez, A. D. *et alli.* (2008). Solid lipid nanoparticles for retinal gene therapy: Transfection and intracellular trafficking in RPE cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 366, pp. 177-183.

Sagalowicz, L. e Lesser, M. E. (2010). Delivery systems for liquid food products. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, pp. 61-72.

Seeley, R. R., Stephens, T. D. e Tate, P. (2005). Sistemas de Integração e Controle. *In: Seeley, R. R., Stephens, T. D. e Tate, P. (Ed.). Anatomia & Fisiologia. 6º Edição.* Loures, Lusociência, pp. 520-539.

Seeley, R. R., Stephens, T. D. e Tate, P. (2005). Regulação e Manutenção. *In: Seeley, R. R., Stephens, T. D. e Tate, P. (Ed.). Anatomia & Fisiologia. 6º Edição.* Loures, Lusociência, pp. 930-932.

Shah, K. A., *et alli.* (2007). Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potential in topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 345, pp. 163-171.

Souto, E.B. e Müller, R. H., (2007). Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Drug Delivery. *In: Domb, J. et alli (Ed.). Nanoparticles for Pharmaceutical Applications.* American Scientific Publishers, pp. 103-122.

Souto, E.B. e Müller, R. H., (2010). Lipid Nanoparticles: effect on Bioavailability and Pharmacokinetic Changes. *In: Shafer-Korting (Ed.). Drug Delivery.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 197, pp. 115-141.

Souto, E. B. *et alli.* (2010). Feasibility of Lipid Nanoparticles for Ocular Delivery of Anti-Inflammatory Drugs. *Current Eye Research*, 35, pp. 537-552.

Souto, E. B. *et alii.* (2011). Nanopartículas de Lípidos Sólidos: Métodos Clássicos de Produção Laboratorial. *Química Nova*, XY, pp. 1-8.

Thrimawithana, T. R. *et alii*. (2011). Drug delivery to the posterior segment of the eye. *Drug Discovery Today*, 16, pp. 270-277.

Urtti, A. (2006). Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, pp. 1131-1135.

Vighi, E. *et alli*. (2007). Redispersible cationic solid lipid nanoparticles (SLNs) freeze-dried without cryoprotectors: characterization and ability to bind the pEGFP-plasmid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67, pp. 320-328.

Wissing, S. A. e Müller, R. H. (2003). Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, 254, pp. 65-68.

Zuccari, G. *et alli*. (2005). Modified polyvinylalcohol for encapsulation of all-trans-retinoic acid in polymeric micelles. *Journal of Controlled Release*, 103, pp. 369-380.