

Ana Rita Lopes Ferreira

Terapêuticas Alternativas para a Quimioterapia por Via Oral

Monografia realizada no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada
pela Professora Doutora Ana Rita Figueiras e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TERAPÊUTICAS ALTERNATIVAS PARA A QUIMIOTERAPIA POR VIA ORAL

Monografia realizada no âmbito da unidade curricular Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Ana Rita Figueiras e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Ana Rita Lopes Ferreira

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Rita Lopes Ferreira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010147524, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Setembro de 2015.

(Ana Rita Lopes Ferreira)

A Tutora da Monografia,

(Professora Doutora Ana Rita Figueiras)

A Orientanda,

(Ana Rita Lopes Ferreira)

Os meus agradecimentos,

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pelos conhecimentos e oportunidades
que me proporcionou ao longo destes cinco anos.

À Professora Doutora Ana Rita Figueiras por todo o apoio que me concedeu para que a
elaboração desta monografia fosse possível.

Aos meus pais e à minha irmã, que sempre me apoiaram e estiveram presentes.

Aos meus amigos, que fizeram este longo caminho comigo.

A todos, um sincero obrigado.

Índice

Abreviaturas.....	2
Resumo	3
Abstract	3
1. Introdução.....	4
2. Introdução à Doença: O Cancro.....	6
3. A Quimioterapia.....	7
3.1. Inconvenientes da Quimioterapia por Via Intravenosa face à Via Oral.....	7
3.2. Desafios da Via Oral	8
4. Terapêuticas Alternativas para a Quimioterapia por Via Oral.....	9
4.1. Exemplo I – nanopartículas peguiladas: veículo na administração oral de paclitaxel.....	9
4.2. Exemplo II – nanopartículas lipídicas: como aumentar a biodisponibilidade oral do paclitaxel.....	12
4.3. Exemplo III – nanopartículas contendo ciclodextrinas e polianidrido: como aumentar a biodisponibilidade oral do paclitaxel.....	15
5. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	20
6. Referências Bibliográficas	22

Abreviaturas

ASC	Área sob a curva concentração plasmática/tempo
βCD	β-ciclodextrina
C_{máx}	Concentração máxima do fármaco no plasma
Fr	Biodisponibilidade relativa
HPCD	2-hidroxipropil-β-ciclodextrina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
iv	Intravenosa
mm	Milímetros
MS	Espetrometria de massa
NHCD	6-monodeoxi-6-monoamino-β-ciclodextrina
NP	Nanopartícula(s)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PEG	Polietilenoglicol
PTX	Paclitaxel
SLNs	Nanopartículas lipídicas sólidas
t_{1/2}	Tempo de meia-vida do fármaco
t_{máx}	Tempo correspondente ao pico de C _{máx} do fármaco no plasma
TRM	Tempo de residência

Resumo

Durante os últimos anos temos assistido a um aumento exponencial do número de casos de cancro. Estima-se que nos próximos anos este número aumente ainda mais. Como tal, é necessário que a medicina evolua a este ritmo.

Atualmente, a parte do tratamento oncológico que toca à quimioterapia é feita recorrendo a fármacos administrados por via intravenosa. Tal ocorre devido à baixa biodisponibilidade oral apresentada pela maioria deste tipo de fármacos.

Assim, diversos estudos têm sido conduzidos por forma a desenvolver sistemas capazes de aumentar a biodisponibilidade oral dos fármacos antitumorais, contribuindo desta forma para o aumento da adesão à terapêutica por parte do doente, uma vez que assim os efeitos colaterais e o desconforto da mesma serão diminuídos.

Até à atualidade a maioria dos estudos conduzidos têm apresentado resultados promissores. Neste campo cita-se a tecnologia das nanopartículas, associadas a diversos tipos de substâncias.

Palavras-chave: cancro, nanopartículas, via oral, quimioterapia.

Abstract

During the last years the number of cancer cases has been growing exponentially. It is estimated that in the coming years this number will increase further. For this reason medicine needs to evolve at the same rate.

Currently, most chemotherapeutic drugs used in the treatment of oncologic diseases are delivered through the intravenous route. This happens due to the low oral bioavailability of the majority of antitumoral drugs.

Thus, some studies have been conducted in order to develop systems capable of increasing the oral bioavailability of these drugs. This will contribute to increase the adherence to the therapy by the patient, decreasing the side effects of the drugs and the patient's discomfort.

Up until this point, the majority of the studies conducted have shown promising results. In this field it is possible to mention the nanoparticles technology, associated to several types of substances.

Key-words: cancer, nanoparticles, oral route, chemotherapy.

I. Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de novos casos anuais de cancro diagnosticados globalmente tem vindo a aumentar. Estima-se que atualmente sejam diagnosticados cerca de 10 milhões de novos casos por ano em todo o Mundo. No entanto, estes números irão aumentar em 2020, segundo os estudos realizados. Nesse ano, estima-se que o número irá ser cerca de 15 milhões por ano.^[1]

Assim, torna-se prioritário que a investigação nesta área seja uma constante, pois é sem dúvida de uma importância inquestionável. Cada vez se conhece mais detalhadamente os fatores que causam esta doença, como se desenvolve, e de que forma progride. Deste modo, é necessário que se consiga canalizar todos estes novos conhecimentos em "ferramentas" que permitam melhorar o tratamento do doente oncológico.

Atualmente, a medicina recorre a diversos métodos de tratamento, que variam, dependendo do tipo de cancro em questão. Estes vão desde a cirurgia, de modo a remover a massa tumoral, a radioterapia, a imunoterapia, a terapia hormonal, o transplante de células estaminais, até à quimioterapia. Segundo THANKI e colaboradores,^[2] apesar de existirem todos estes métodos de tratamento, a maior porção da terapia antitumoral, nas últimas décadas, incidiu sobre a quimioterapia.^[2]

O tratamento por quimioterapia pode ser feito por via intravenosa (iv) ou por via oral. Apesar de a via oral ser quase sempre a via de eleição nas diversas áreas terapêuticas, não o é no caso do doente oncológico.

Relativamente ao cancro, a maioria dos fármacos indicados no seu tratamento, os antitumorais, são administrados por via iv, ficando assim biodisponíveis, no organismo, na totalidade da dose administrada para atuar no seu alvo terapêutico. No entanto, a via iv causa diversos efeitos colaterais, podendo frequentemente levar à hospitalização do doente em causa.^[3] Deste modo, devido aos diversos aspetos negativos associados a esta via de administração no tratamento do cancro, a via oral é cada vez mais considerada como uma alternativa válida, e por conseguinte cada vez mais estudada.

A via oral é, segundo os estudos, a via de administração preferida pelos doentes oncológicos,^{[4],[5]} uma vez que passa pelo controlo pessoal em termos de administração: a pessoa está dependente de si mesma para tomar a medicação e não de alguém especializado para a administrar, sendo também mais flexível em termos do número de tomas.

No entanto, a percentagem de casos onde se pode aplicar a via oral é atualmente muito reduzida. Estima-se que cerca de 60% dos fármacos antitumorais possam ser usados por via oral, no entanto, apenas uma minoria se usa, pois a grande parte deste grupo não apresenta

Terapêuticas Alternativas para a Quimioterapia por Via Oral
uma boa biodisponibilidade oral, conferindo baixa viabilidade ao processo.^[6]

Após serem administrados oralmente, os fármacos têm que vencer barreiras fisiológicas e físico-químicas, tais como o metabolismo pré-sistêmico a que estão sujeitos e a instabilidade do trato gastrointestinal, o que não é simples para a maioria deles. Portanto, surge a necessidade de encontrar soluções que possam melhorar a viabilidade deste processo, para que se consiga conjugar a melhor tolerabilidade da administração oral, com a maior biodisponibilidade dos fármacos administrados por via iv.

A tecnologia farmacêutica baseada no uso de nanopartículas (NPs) tem demonstrado ser vantajosa quando estes sistemas são utilizados como veículos na administração de fármacos por via oral, nomeadamente no grupo dos antitumorais, ao diminuir a ocorrência de efeitos colaterais, e ao facilitar a orientação da molécula para o seu alvo terapêutico.

2. Introdução à Doença: O Cancro

O cancro é definido como uma doença complexa, associada a uma proliferação anormal de células, causada pela lesão de um tecido, associada a condições ambientais adversas e por conseguinte prejudiciais.^[7] A exposição persistente a diversos agentes considerados carcinogêneos, por exemplo, como o tabaco e as radiações ultravioleta, aumenta o risco de desenvolver a doença.^[2]

Num ambiente normal as células do organismo humano crescem e dividem-se de modo a dar origem a novas células. No entanto, quando este fenómeno é alterado, e se descontrola, pode originar uma massa tumoral. Essa massa tumoral pode ser de dois tipos: benigna ou maligna. Apenas neste último caso poderemos falar em cancro, onde as células tumorais poderão invadir ou danificar tecidos e órgãos, e, em casos mais avançados, podem mesmo vir a formar metástases.

3. A Quimioterapia

Um regime de quimioterapia pode ser constituído por um fármaco ou por uma associação de fármacos, podendo estes ser administrados por via iv ou por via oral.

A quimioterapia consiste num tratamento efetuado por ciclos, que se repetem de acordo com uma regularidade pré-determinada pela equipa médica que segue o doente oncológico.

Este tratamento acarreta quase sempre efeitos colaterais. Estes efeitos dependem maioritariamente dos fármacos em questão, das doses e da via de administração utilizada.

3.1. Inconvenientes da Quimioterapia por Via Intravenosa face à Via Oral

A via iv é considerada a via mais segura no que diz respeito à cinética dos fármacos administrados, pois é mais fácil prever o que irá acontecer após a sua entrada na corrente sanguínea. Quando administrado por via iv, o fármaco é absorvido na totalidade da dose administrada.

No entanto, esta é uma via de administração que está relacionada com a ocorrência de muitos efeitos colaterais. Um dos problemas poderá surgir inicialmente, na preparação das soluções e/ou suspensões a administrar. Para a preparação destas formas farmacêuticas é necessário recorrer ao uso de excipientes. Estes, por vezes, podem aumentar o grau de toxicidade da preparação, propiciando a ocorrência de efeitos colaterais no doente.^[3]

Além disso, a quimioterapia iv requer a deslocação do doente a um hospital para que um técnico especializado possa efetuar a administração da medicação. O doente pode, por vezes, requerer ainda cuidados paliativos. A quimioterapia por via iv é um tratamento que causa dor e indisposição, e, quando administrado por períodos de tempo prolongados pode facilitar a ocorrência de tromboembolismos e de infeções, neste último caso podendo mesmo afetar o sistema imunitário do doente.^[3]

A nível emocional, o doente poderá sentir-se deprimido e incapaz, por não se sentir totalmente independente no seu dia a dia, devido aos horários rigorosos que tem que cumprir para receber o tratamento. Como tal, a quimioterapia por via oral torna-se uma alternativa cómoda e interessante à via iv.

Quanto à biodisponibilidade conferida pela via iv, a qualquer fármaco, ela é praticamente total, pelo que este se irá encontrar 100% biodisponível na corrente sanguínea após a sua administração. Por esta razão, a probabilidade de causar efeitos colaterais é muito elevada, uma vez que o pico máximo de concentração é atingido quase instantaneamente após a administração. Um outro aspeto importante é que a quimioterapia por via iv requer quase

Terapêuticas Alternativas para a Quimioterapia por Via Oral sempre a administração de outros medicamentos, a chamada terapia pré-quimioterapia, de modo a tentar diminuir os efeitos colaterais que poderão surgir.

O uso da via oral como alternativa afetará diversos aspetos clínicos considerados relevantes. Torna-se possível controlar mais facilmente as concentrações plasmáticas de fármacos, e mantê-las estáveis por um tempo pré-determinado, utilizando sistemas de libertação controlada. Por outro lado, também é possível direccionar a molécula para um alvo terapêutico específico, aumentando deste modo a viabilidade do tratamento. Teoricamente poder-se-ia controlar as oscilações na concentração de fármaco, diminuindo a ocorrência de efeitos colaterais. Este tipo de via de administração evita também o desconforto das agulhas, tão utilizadas na via iv, diminuindo o desconforto do doente por um lado, e aumentando a sua cooperação na terapêutica por outro. O risco de infeção causado pela perfuração da pele no local da picada também seria eliminado neste caso, assim como a necessidade de pessoal especializado para proceder à administração.^[2]

3.2. Desafios da Via Oral

Apesar de mais apelativa do que a via iv, a via oral apresenta diversas barreiras. Destas, destacam-se a baixa solubilidade em água da maioria dos fármacos, a sua instabilidade química e a sua baixa permeabilidade ao longo do trato gastrointestinal. A variabilidade do valor de pH ao longo do trato gastrointestinal é outro fator que afeta a absorção e a estabilidade dos fármacos. Há ainda a considerar que o tempo de residência (TRM) destas moléculas no trato gastrointestinal é curto, o que dificulta o processo de absorção. Também as enzimas intestinais e hepáticas contribuem para a rápida degradação dos fármacos mesmo antes de estes serem absorvidos.^[6]

Um outro desafio desta via de administração prende-se com o facto de as altas concentrações de fármaco quando administradas oralmente poderem vir a causar dano às mucosas gástrica e intestinal.^[6]

Como tal, para ultrapassar estas limitações, têm vindo a ser estudadas formas de aumentar a estabilidade e solubilidade dos fármacos antitumorais, de aumentar o seu TRM no trato gastrointestinal, de aumentar a sua permeabilidade e conseqüentemente a sua biodisponibilidade.^[6]

4. Terapêuticas Alternativas para a Quimioterapia por Via Oral

A administração oral de fármacos em quimioterapia ainda apresenta lacunas. Como tal, diversos estudos com NPs têm sido conduzidos, de modo a concluir se será viável transpor os tratamentos de quimioterapia para esta via de administração.

Seguem-se alguns exemplos de estudos recentes nos quais foi estudada a tecnologia das NPs, de modo a avaliar a viabilidade da administração oral de fármacos específicos em quimioterapia.

4.1. Exemplo I – nanopartículas peguiladas: veículo na administração oral de paclitaxel

O paclitaxel (PTX) é um fármaco antimitótico, usado em oncologia no tratamento de diversos tipos de cancro. Este fármaco interage com a tubulina das células, bloqueando o ciclo de replicação celular na fase G2 da mitose.^[8] É apresentado comercialmente na forma de infusão iv, com o nome de Taxol[®] e de suspensão injetável com o nome de Abraxane[™].^[9]

É um composto com baixa solubilidade aquosa, substrato da glicoproteína-P intestinal e do citocromo P450. Por estas razões, a sua administração oral torna-se pouco apelativa, uma vez que a sua biodisponibilidade oral se encontra fortemente comprometida.

No entanto, a apresentação comercial do PTX causa frequentemente efeitos colaterais graves, devido a um composto que existe nesta formulação, o *Cremophor EL* (óleo de rícino polioxiethylado), que funciona como solubilizante do fármaco.^[9] Este pode causar choque anafilático e graves reações de hipersensibilidade, pelo que é obrigatório administrar aos doentes uma pré-medicação constituída por glucocorticoides de modo a evitar danos maiores.^[10] Por esta razão a carga de fármacos administrados aumenta, assim como o desconforto do doente e os custos a nível hospitalar.

Com o objetivo de diminuir todos estes entraves, e de modo a estudar métodos de aumentar a solubilidade aquosa do PTX, para que possa ser equacionada a sua administração oral, foi conduzida uma investigação com NPs peguiladas com propriedades mucoadesivas.

O objetivo do trabalho foi desenvolver um tipo de NP que permita aumentar a biodisponibilidade do PTX, através da incorporação de um inibidor da glicoproteína-P intestinal e do citocromo P450, e que seja capaz de aderir ao enterócito, libertando lentamente o fármaco que transporta, neste caso o PTX.

As NPs foram preparadas de acordo com um protocolo pré-estabelecido,^{[11],[12]} sendo que se utilizaram três tipos de formulações com polietilenoglicol (PEG), com diferentes pesos moleculares: PTX-NP2 (com PEG 2000), PTX-NP6 (com PEG 6000) e PTX-NP10

Terapêuticas Alternativas para a Quimioterapia por Via Oral (com PEG 10000). O PEG funciona por si mesmo como um inibidor da glicoproteína-P intestinal e do citocromo P450.

Foram estudados os três tipos de NPs, de acordo com o peso molecular do polímero, com o objetivo de compreender se este influenciava a eficiência de encapsulação e a incorporação de PTX nas NPs. Para tal, foram também preparadas NPs controle, PTX-NP, estas sem a incorporação de PTX. Após a realização de diversos estudos físico-químicos concluiu-se que as PTX-NP2 apresentavam uma eficiência de encapsulação maior, e foram, por conseguinte, aquelas em que se conseguiu incorporar uma maior quantidade de PTX. Por este motivo, foram estas as NPs selecionadas para prosseguir os estudos. É importante notar que a eficiência de encapsulação não é dependente do peso molecular do polímero, o PEG, no entanto, este mesmo peso influencia a quantidade de PTX que se consegue encapsular nas NPs. A Tabela I mostra as características físico-químicas das NPs peguiladas contendo fármaco, o PTX.

Tabela I. Características físico-químicas das NPs peguiladas contendo PTX (adaptado).^[10]

Formulação	Diâmetro (nm)	PTX ($\mu\text{g}/\text{mg}$ NP)	Eficiência de encapsulação (%)
PTX-NP	177 \pm 3	78,1 \pm 3,2	38,2 \pm 5,3
PTX-NP2	178 \pm 4	150,1 \pm 5,2	88,3 \pm 7,4
PTX-NP6	180 \pm 5	144,1 \pm 3,1	78,1 \pm 7,3
PTX-NP10	188 \pm 2	144,5 \pm 6,4	74,9 \pm 6,2

O estudo da formulação foi efetuado em ratinhos, tendo estes sido divididos em três grupos de seis elementos. As formulações usadas no estudo foram as seguintes: Taxol[®] iv; Taxol[®] oral; e PTX-NP2 liofilizadas, que posteriormente foram dispersas num volume de 200 μL de água.^[10] Após a administração das diferentes formulações, foram recolhidas amostras de sangue dos diferentes ratinhos com o objetivo de avaliar a ação de cada uma no respetivo grupo.

A análise farmacocinética foi realizada, tendo sido determinados os seguintes parâmetros: concentração máxima de fármaco no plasma ($C_{\text{máx}}$), tempo correspondente ao pico de concentração máxima do fármaco no plasma ($t_{\text{máx}}$), tempo de meia-vida do fármaco ($t_{1/2}$), área sob a curva concentração plasmática/tempo (ASC), TRM do fármaco e biodisponibilidade relativa (Fr).

O estudo da atividade antitumoral do PTX foi desenvolvido num modelo de tumor

Terapêuticas Alternativas para a Quimioterapia por Via Oral subcutâneo induzido em ratinhos por injeção subcutânea de células da linhagem do carcinoma pulmonar de *Lewis*. Quando o tumor atingiu um tamanho de 100 mm procedeu-se à divisão dos ratinhos em três grupos e à administração do fármaco em estudo sob diferentes formulações, mas na mesma concentração (10 mg/kg). Ao primeiro grupo foi administrado Taxol[®] iv, ao segundo grupo foi administrada a formulação de PTX-NP2 por via oral, e ao terceiro grupo foi administrado Taxol[®] oral, tendo sido este o grupo controlo. O Taxol[®] foi administrado a cada 24 horas durante 9 dias, e as NPs foram administradas com um espaçamento de 3 dias (1,4 e 7), tal como o Taxol[®] oral.

Os resultados evidenciaram que a formulação iv, apesar de ter biodisponibilidade de 100% logo após a sua administração, ao fim de 8 horas já quase não se encontrava no plasma, ao passo que a formulação com NPs demorava entre 3 a 6 horas a atingir a $C_{\text{máx}}$, diminuindo a concentração ao longo do tempo de modo lento, pelo que até 72 horas após a sua administração ainda se encontrava no plasma o fármaco em concentrações consideradas razoáveis (ver Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos da formulação iv de Taxol[®] e da formulação PTX-NP2, utilizada neste estudo, após administração de uma dose de 10 mg/kg (adaptado).^[10]

Formulação	Via	ASC ($\mu\text{g h/mL}$)	$C_{\text{máx}}$ (μg)	$t_{\text{máx}}$ (h)	TRM (h)	$t_{1/2}$ (h^{-1})	Fr (%)
Taxol [®]	iv	89 \pm 6	65 \pm 3	0,06	1,8 \pm 0,3	2,3 \pm 0,5	100
PTX-NP2	oral	76 \pm 2	4,0 \pm 0,4	4,0	27 \pm 6	25 \pm 3	85

Este estudo permitiu demonstrar que o tratamento com NPs por via oral, a cada 3 dias, retardava significativamente o crescimento do tumor (Figura 1), em comparação com o grupo controlo, ao qual se administrou Taxol[®] oral. Repare-se que a formulação de NPs demonstrou ter uma eficácia semelhante à de Taxol[®] iv.

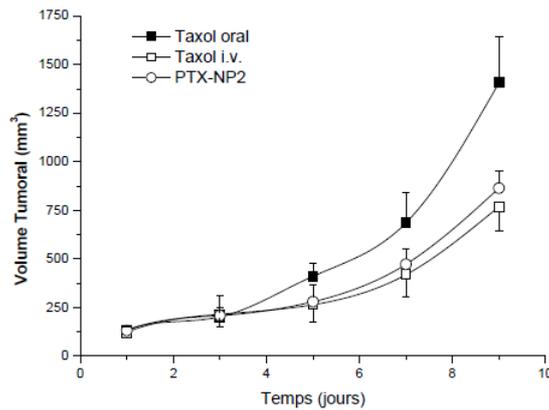


Figura 1. Evolução do volume tumoral nos ratinhos, após a administração das três diferentes formulações de PTX.^[10]

Neste estudo foi possível concluir que a combinação de NPs com PEG permite efetivamente obter sistemas capazes de libertar de forma controlada o PTX no trato gastrointestinal. Além disso, o PEG é inibidor da glicoproteína-P intestinal e do citocromo P450, ao mesmo tempo que adere ao enterócito, permitindo uma libertação controlada e eficaz do fármaco,^[10] uma melhor absorção, e consequentemente uma melhor biodisponibilidade.

4.2. Exemplo II – nanopartículas lipídicas: como aumentar a biodisponibilidade oral do paclitaxel

Nota: Neste segundo estudo, tal como no anterior, foi usado o PTX como fármaco modelo, estudando-se um sistema de entrega de fármaco diferente.

Diversos sistemas têm sido estudados com o intuito de otimizar a biodisponibilidade oral de fármacos. Neste estudo, o objetivo foi observar se as nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) produzidas seriam ou não vantajosas no que toca à administração oral de PTX.^[9]

As SLNs são nanopartículas lipídicas de primeira geração, que derivam de emulsões óleo/água. São compostas por lípidos sólidos biodegradáveis e biocompatíveis, tensoativos e água. Este tipo de sistema permite a libertação controlada do fármaco que incorpora, assim como a sua proteção contra agente externos.

Nesta pesquisa experimental foi estudada a hipótese de melhorar a biodisponibilidade do PTX por administração oral em ratinhos machos albinos, usando as SLNs como transportador. As NPs foram preparadas usando estearilamina como lípido e lecitina de soja e *poloxamer 188* como agentes emulsionantes/surfactantes.^[9] O *poloxamer 188* é um copolímero tribloco, biocompatível com as SLNs que foram usadas no estudo, mantendo a

Terapêuticas Alternativas para a Quimioterapia por Via Oral integridade das mesmas, de reações químicas e enzimáticas que possam ocorrer durante o TRM do fármaco no trato gastrointestinal, pelo facto de formar um filme hidrofílico em volta das SLNs.

As SLNs foram preparadas segundo um protocolo pré-estabelecido.^[13] Os sistemas contendo PTX foram denominados por PTX-SLNs.

Primeiramente foram preparadas SLNs com diferentes quantidades de PTX de modo a avaliar se tal influenciava a eficiência de encapsulação.

Tabela 3. Efeito da quantidade de PTX nas propriedades físico-químicas das NPs (adaptado).^[9]

Formulação	PTX (mmol)	Tamanho partícula (nm)	Eficiência encapsulação (%)
F1	0,0	70±11,6	-
F2	0,05	89±8,8	58,6±4,2
F3	0,25	96±4,4	75,42±1,5
F4	0,5	129±5,1	53,0±2,3

Como se pode observar na Tabela 3, a quantidade de PTX incorporado nas SLNs, tem impacto no tamanho das mesmas. Quanto maior a quantidade de PTX a incluir, maior será o seu tamanho. No entanto, deve-se também observar que a eficiência de encapsulação é maior quando a quantidade de PTX incorporada é de 0,25 mmol. Assim, a quantidade ideal de fármaco a incluir nas SLNs será de 0,25 mmol de PTX (F3), uma vez que esta formulação obteve a melhor eficiência de encapsulação. Este último parâmetro foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).^[14]

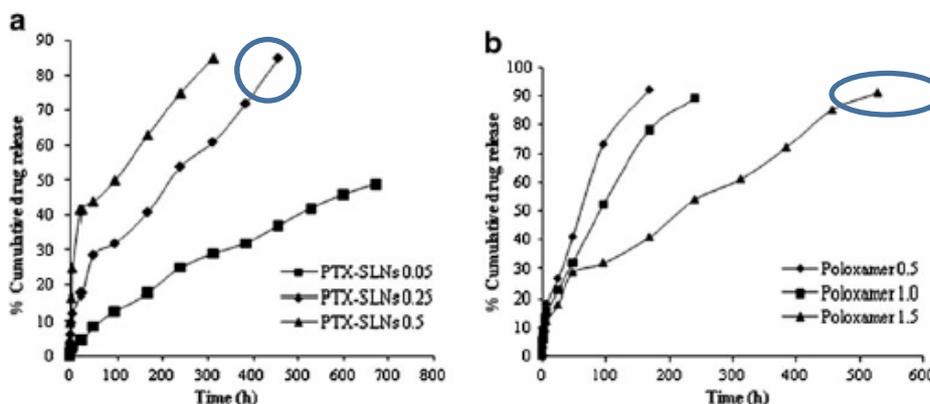


Figura 2. Libertação do fármaco *in vitro* com a) 0,05; 0,25 e 0,5 mmol de PTX; b) 0,5%; 1,0% e 1,5% de poloxamer 188.^[9]

Para além dos parâmetros anteriormente citados, também se procedeu ao estudo da influência da concentração de *poloxamer 188* no tamanho da partícula e na eficiência de encapsulação (Figura 2). Entre 0,5 a 1,5% de *poloxamer 188* a partícula diminuiu de tamanho e manteve-se estável. Quando se aumentou a concentração para os 2% a estabilidade perdeu-se e o tamanho da partícula aumentou.^[9] Por esta razão, a formulação considerada ideal, e que foi a eleita, foi a que continha 1,5% de *poloxamer 188*, com 0,25 mmol de fármaco. Esta combinação traduziu-se num sistema ideal, pois foi aquele que se manteve durante mais tempo estável e disponível para a absorção.

Foi, posteriormente, estudada a estabilidade das SLNs contendo uma concentração de 0,25 mmol de PTX, depois de formuladas, durante um ano, armazenadas a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, verificando-se que permaneciam estáveis.^[9]

O estudo foi realizado em ratinhos machos albinos, divididos em três grupos: ao primeiro grupo foi administrado Taxol[®] oral; ao segundo foi administrado Taxol[®] iv; e ao terceiro foi administrada a formulação PTX-SLNs via oral.^[9] A quantidade administrada de PTX foi de 40 mg/kg.^[15]

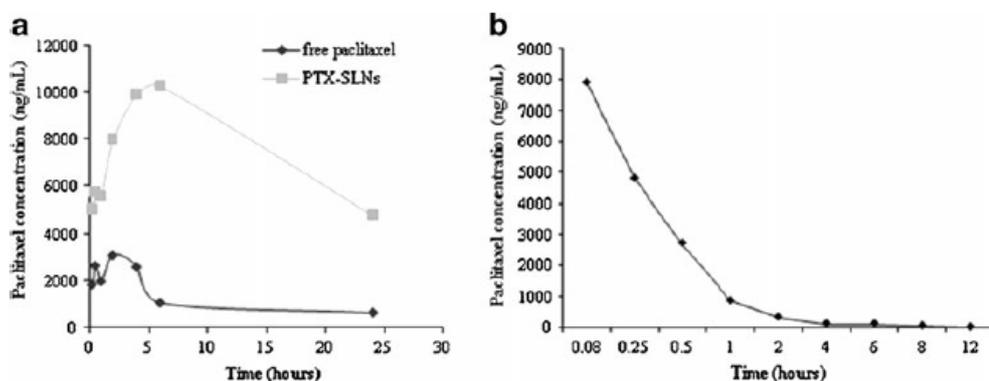


Figura 3. Perfil da concentração plasmática do PTX nos ratinhos aos quais se administrou a) Taxol[®] oral e PTX-SLNs oral, e, b) Taxol[®] iv.^[9]

Após sacrificar os ratinhos, foi avaliado o perfil da concentração plasmática em cada um dos três grupos, após a administração do fármaco (Figura 3). Verificou-se que a formulação PTX-SLNs exibiu uma libertação inicial lenta de PTX, o chamado efeito *burst*, que, posteriormente aumentou gradualmente até atingir a $C_{\text{máx}}$, a qual ocorreu perto das 6 horas após a administração. Posteriormente, a concentração decresceu de forma lenta e sustentada, ainda que dentro de limites terapêuticos aceitáveis, até às 24 horas.

As amostras recolhidas mostraram que os níveis plasmáticos de PTX nos ratinhos que foram tratados com PTX-SNLs eram mais elevados logo após a sua administração em relação aos níveis dos ratinhos tratados com Taxol[®] oral.

Comparando com o Taxol[®] iv, as SLNs mantiveram-se mais tempo na circulação sanguínea, exibindo uma depuração bastante lenta.

A biodisponibilidade das SLNs foi de aproximadamente 10,04%, a da formulação de Taxol[®] oral foi de 1,56%,^[9] e da administrada por via iv foi de 100%. Também a ASC foi drasticamente diferente quando comparada a formulação oral de Taxol[®] e a formulação de SLNs, sendo muito superior nesta última.^[9] Este aumento da ASC parece estar relacionado com a inibição da glicoproteína-P intestinal por ação do *poloxamer 188*. Com uma diferença tão acentuada de uma formulação para a outra, pode inferir-se que as SLNs protegem o fármaco da ação das enzimas hepáticas (efeito de primeira passagem), e das enzimas gastrointestinais, facto que conduziu a uma biodisponibilidade oral das SLNs bastante superior.

As análises realizadas mostraram também que o fígado, os rins e os pulmões dos ratinhos continham PTX em quantidades consideráveis,^[9] pelo que se pode aferir que a formulação em estudo possui uma absorção razoável.

Quinze dias após a administração, não foram evidenciados sinais de algum efeito tóxico do fármaco ou dos componentes da formulação.^[9]

O surfactante (*poloxamer 188*) protege a integridade das SLNs ao formar uma camada hidrofílica em volta das mesmas, protegendo os lípidos que as compõem da degradação química e enzimática que normalmente ocorre até à absorção do fármaco. Além disso, o *poloxamer 188* inibe a ação da glicoproteína-P intestinal, a principal responsável pela degradação do PTX previamente à sua absorção.

Em suma, as SLNs em estudo conferem proteção ao fármaco, o que diminui a sua taxa de degradação ao longo do trato gastro intestinal, ao mesmo tempo que aumentam o seu TRM no mesmo, aumentando a probabilidade de o fármaco ser absorvido.

4.3. Exemplo III – nanopartículas contendo ciclodextrinas e polianidrido: como aumentar a biodisponibilidade oral do paclitaxel

Nota: Neste terceiro estudo, tal como nos anteriores, foi usado o PTX como fármaco modelo, estudando-se um sistema de entrega do fármaco diferente.

A excelente capacidade de inclusão das ciclodextrinas, assim como a sua biocompatibilidade com a maioria das substâncias, tornou-as especialmente atrativas para o

Terapêuticas Alternativas para a Quimioterapia por Via Oral
estudo do desenvolvimento de formulações na engenharia biomédica.^[16]

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por unidades de glucose. As suas cavidades são lipofílicas, e o seu exterior hidrofílico. Isto permite-lhes interagir com uma vasta variedade de moléculas, formando complexos de inclusão mediante o estabelecimento de ligações não covalentes.^[17]

Recentemente um estudo *ex vivo* realizado permitiu observar que NPs bioadesivas contendo ciclodextrinas aumentavam a permeabilidade intestinal do PTX.^[18] Tal facto foi atribuído à capacidade das ciclodextrinas transportarem o fármaco eficazmente até à superfície da mucosa intestinal, aumentando assim o TRM do fármaco no local alvo, e, conseqüentemente, potenciando a sua absorção. Por outro lado, segundo AGUEROS e colaboradores,^[8] as ciclodextrinas têm um efeito inibitório na atividade da glicoproteína-P intestinal e do citocromo P450,^[8] o que facilita a absorção do PTX. Por este motivo foi conduzido o presente estudo, em que foi avaliada a farmacocinética dos transportadores sintetizados.

O objetivo deste estudo foi avaliar a biodisponibilidade oral do PTX em ratos, *in vivo*, quando encapsulado em NPs contendo ciclodextrinas e polianidrido, um polímero mucoadesivo.^[8]

O fenómeno de bioadesão ocorre quando dois substratos, sendo um deles de origem biológica, são unidos por forças interfaciais durante longos períodos de tempo. Quando este fenómeno ocorre com uma membrana mucosa, é denominado por mucoadesão.

Para se proceder ao estudo propriamente dito, foram seleccionados três tipos diferentes de ciclodextrinas: β -ciclodextrina (β CD), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD) e 6-monodeoxi-6-monoamino- β -ciclodextrina (NHCD). A dose de PTX definida para administração durante o estudo foi de 10 mg/kg.^[8]

As NPs foram preparadas segundo um protocolo pré-estabelecido.^{[18],[19]} Para controlo do estudo foram preparadas NPs sem ciclodextrinas, e NPs sem fármaco.

O estudo foi realizado em ratos, tendo estes sido divididos em seis grupos experimentais e um grupo controlo.

Ao primeiro grupo foi administrada a formulação de Taxol[®] por via iv. Aos restantes grupos foi administrado PTX via oral (10 mg/kg) sob a forma de diferentes formulações: a) NPs com PTX-HPCD; b) mistura de NPs vazias com NPs com PTX-HPCD; c) NPs contendo polianidrido, com: PTX- β CD, PTX-HPCD e PTX-NHCD; d) NPs contendo PTX. As formulações apresentadas foram diluídas com água antes da sua administração.

Verificou-se que a encapsulação do PTX dependia da natureza da ciclodextrina

Terapêuticas Alternativas para a Quimioterapia por Via Oral incorporada nas NPs. Quando incorporado nas NPs isoladamente, sem ciclodextrinas, a quantidade de fármaco assimilada era bastante reduzida (caso da formulação de PTX-NP). Pelo contrário, quando incorporado na forma de complexo de inclusão com ciclodextrinas, a capacidade de inclusão do PTX aumentava drasticamente.

Após a administração das formulações foram recolhidas amostras de sangue dos ratos, em tempos pré-determinados nos sete grupos. Procedeu-se à quantificação do PTX nas mesmas, usando a técnica de HPLC.

As diferentes formulações foram analisadas, sendo que as características das NPs se encontram resumidas na Tabela 4.

Tabela 4. Características físico-químicas das formulações estudadas (adaptado).^[8]

Formulação	Tamanho (nm)	Rendimento (%)	PTX (µg/mg)	EE (%)
NP	179±2	91,3±3,1	-	-
PTX-NP	204±4	51,2±6,6	0,29±0,1	0,14
PTX-βCD NP	298±6	68,6±4,4	38±3,1	28,1
PTX-HPCD NP	307±7	63,6±2,9	167±8,3	87,4
PTX-NHCD NP	310±6	59,5±4,6	91±7,6	61,6

Em relação à encapsulação do PTX, concluiu-se que esta foi dependente do tipo de oligossacárido utilizado para formar o complexo. Por este motivo, na formulação de NPs que apenas continham PTX a incorporação do fármaco foi muito baixa, ao contrário daquelas que continham ciclodextrinas, onde a incorporação do mesmo aumentou drasticamente.

Após a administração do Taxol[®] por via iv, verificou-se que ocorria de imediato um pico plasmático de concentração de fármaco, que decrescia ao longo do tempo.^[8] Por outro lado, quando se administrou Taxol[®] oralmente, foi observado que os níveis plasmáticos de PTX se encontravam abaixo do limite mínimo de quantificação.^[8] Pelo contrário, a Figura 4 ilustra o perfil de libertação do PTX no plasma sanguíneo dos ratos, sob os diferentes tipos de formulações de NPs onde a concentração do fármaco se manteve constante até às 24 horas.

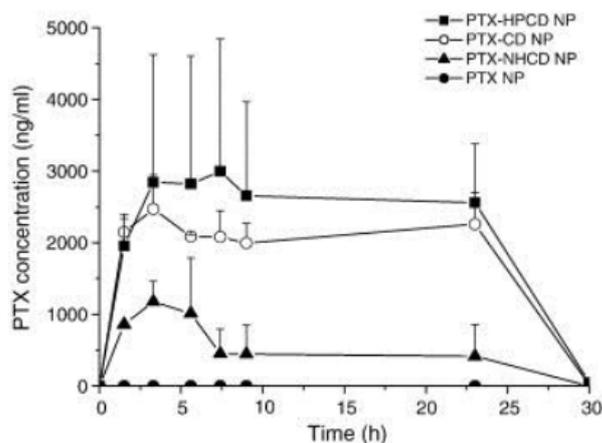


Figura 4. Concentrações plasmáticas de PTX após administração oral de uma única dose de 10 mg/kg.^[8]

As curvas das diferentes formulações podem ser divididas em três fases: 1 – níveis plasmáticos aumentam progressivamente; 2 – liberação sustentada e constante do PTX; 3 – declínio e eliminação do PTX.^[8]

Comparando os diferentes tipos de formulações, verificou-se que as concentrações plasmáticas dos complexos NPs PTX- β CD e NPs PTX-HPCD foram três a quatro vezes superiores à concentração do complexo NPs PTX-NHCD. É também de realçar que as NPs contendo PTX sem associação a ciclodextrinas, não permitiram a absorção do fármaco, o que pode ser observado na Figura 4, onde a concentração de PTX é nula. Para a realização da análise farmacocinética foram utilizadas as amostras de sangue recolhidas previamente dos ratos. Esta análise pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros farmacocinéticos do PTX em ratos para as diferentes formulações testadas (adaptado).^[8]

Formulação	Via	ASC ($\mu\text{g h/mL}$)	$C_{\text{máx}}$ (μg)	$t_{\text{máx}}$ (h)	TRM (h)	$t_{1/2}$ (h^{-1})	F (%)
Taxol	iv	79,2 \pm 3,3	21,6 \pm 0,4	0,06 \pm 0,01	2,63 \pm 0,3	4,54 \pm 0,2	100
Taxol	Oral	-	-	-	-	-	-
PTX-HPCD NP	Oral	67,1 \pm 32,7	2,8 \pm 0,9	6,17 \pm 2,31	11,09 \pm 1,45	1,32 \pm 0,43	84,7
PTX- β CD NP	Oral	65,9 \pm 21,6	2,4 \pm 1,1	4,90 \pm 2,46	13,72 \pm 0,57	1,48 \pm 0,57	83,2
PTX-NHCD NP	Oral	14,6 \pm 3,4	1,4 \pm 0,5	4,66 \pm 1,25	9,97 \pm 2,83	0,89 \pm 0,12	18,4
PTX-NP	Oral	-	-	-	-	-	-

As formulações que continham as ciclodextrinas HPCD ou β CD foram aquelas, como pode ser observado na Tabela 5, que demonstraram um melhor desempenho. A biodisponibilidade das mesmas foi superior a 80%, demonstrando assim uma boa capacidade de promover a absorção do fármaco *in vivo*.^[8] Estes resultados são concordantes com os obtidos *in vitro* para as duas formulações,^{[8],[18]} a partir das quais o fármaco é totalmente absorvido ao fim de 24 horas.

Após a administração das formulações orais de NPs cuja biodisponibilidade foi elevada, concluiu-se que até às 24 horas após a toma, não eram detetados metabolitos do PTX. Só após 30 horas estes foram detetados, recorrendo à técnica de HPLC associada à espectrometria de massa (MS).^[8] Este resultado suporta a evidência de que estas formulações evitam o metabolismo pré-sistémico do fármaco, ao direcioná-lo para o local de absorção.

Em suma, a combinação de ciclodextrinas com polímeros mucoadesivos, como é o caso do polianidrido, potencia a biodisponibilidade oral do PTX, na medida em que facilita o seu transporte até à superfície da mucosa onde este deve ser absorvido, ficando imobilizado no local alvo, facilitando a sua absorção, já que as NPs libertam o fármaco de forma lenta e controlada. De todas as ciclodextrinas utilizadas, os autores concluíram que as de eleição seriam a HPCD e a β CD, já que promoveram um aumento da biodisponibilidade do fármaco até pelo menos 80%.^[8]

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

A quimioterapia oral é reconhecida por ser de fácil administração, conveniente para o doente e por reduzir a necessidade de hospitalização, face à quimioterapia intravenosa.^[4] Como tal, o desenvolvimento tecnológico nas mais diversas áreas da ciência em relação a este tipo de tratamento parece ser cada vez mais promissor. A tecnologia neste aspeto tem que ser capaz de desenvolver formulações ideais capazes de proteger os fármacos de ambientes biológicos hostis, como é o caso da atividade das enzimas intestinais e hepáticas, que condicionam a biodisponibilidade dos fármacos administrados oralmente.

No caso dos exemplos descritos, o fármaco analisado foi o PTX. Este caracteriza-se por ser um fármaco com baixa solubilidade oral, estando a sua biodisponibilidade extremamente condicionada pela ação enzimática intestinal e hepática. No exemplo I foram analisadas NPs peguiladas; no exemplo II foram analisadas SLNs contendo *poloxamer 188* como surfactante; e, no exemplo III foram analisadas NPs às quais se associou ciclodextrinas e polianidrido. Em todas as situações verificou-se um aumento da biodisponibilidade oral do PTX em relação à administração oral do fármaco isoladamente. Todos os sistemas demonstraram ser capazes de libertar lenta e controladamente o fármaco ao nível das mucosas, facilitando a sua absorção. No entanto, foi observada uma discrepância de resultados no que toca às percentagens correspondentes à biodisponibilidade oral do PTX. Nos exemplos I e III a biodisponibilidade foi de pelo menos 80%, ao contrário do exemplo II, onde esta foi apenas cerca de 10%.

Pode inferir-se que dos três estudos, a formulação de SLNs parece ser a menos atrativa no que concerne ao PTX. No entanto, há que realçar que a biodisponibilidade foi aumentada em cerca de 10 vezes em relação à administração oral de Taxol[®], pelo que se espera que futuramente venham a surgir avanços ainda mais promissores neste tipo de estratégias. O conceito de nanotransportador surge como inovador, não podendo ser mais ignorado ou menosprezado, uma vez que poderá ser bastante atrativo quer para fármacos oncológicos, quer para outras classes terapêuticas.

A tecnologia capaz de disponibilizar meios para aumentar a efetividade dos fármacos com baixa solubilidade e permeabilidade oral é cada vez mais viável. Num futuro próximo a implementação de tratamentos oncológicos que tenham por base este tipo de tecnologia parece ser cada vez mais apelativa. Há que explorar, por exemplo, os diversos excipientes funcionais disponibilizados, de modo a desenvolver sistemas de transporte para vários tipos de doenças epidémicas, tais como o cancro.

No entanto há diversas questões que devem ser tidas em conta. No recurso ao uso de

Terapêuticas Alternativas para a Quimioterapia por Via Oral nanotransportadores, é necessário ter em consideração se estes têm ou não um bom perfil de segurança, tendo em atenção a correlação eficácia-toxicidade.^[2] Para além disso, uma vez que existem diversas categorias, nomeadamente, ciclodextrinas, micelas poliméricas, nanopartículas lipídicas, e muitos outros, deve saber-se *a priori* qual o mais indicado para cada tipo de fármaco e para cada situação terapêutica específica.

Em suma, sendo cada vez mais elevado o número de estudos que se realizam atualmente devido a esta problemática, é de esperar que a ciência evolua rapidamente neste campo. Assim, futuramente esperam-se tratamentos menos dispendiosos, mais fáceis e acessíveis a toda a população.

Assim espera-se que a quimioterapia oral realizada em casa se possa tornar numa realidade futura, brevemente, através da utilização da tecnologia farmacêutica para a administração oral de fármacos antitumorais.^[20]

6. Referências Bibliográficas

1. Global cancer rates could increase by 50% to 15 million by 2020, disponível em <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en/>, última consulta: 27-04-2015.
2. THANKI, K., GANGWAL, R.P., SANGAMWAR, A.T., e JAIN, S., *Oral delivery of anticancer drugs: challenges and opportunities*. J Control Release, 170 (2013) 15-40.
3. MAZZAFERRO, S., BOUCHEMAL, K., e PONCHEL, G., *Oral delivery of anticancer drugs I: general considerations*. Drug Discov Today, 18 (2013) 25-34.
4. BANNA, G.L., COLLOVA, E., GEBBIA, V., LIPARI, H., GIUFFRIDA, P., CAVALLARO, S., CONDORELLI, R., BUSCARINO, C., TRALONGO, P., e FERRAU, F., *Anticancer oral therapy: emerging related issues*. Cancer Treat Rev, 36 (2010) 595-605.
5. LAM, P.L. e GAMBARI, R., *Advanced progress of microencapsulation technologies: in vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries*. J Control Release, 178 (2014) 25-45.
6. LUO, C., SUN, J., DU, Y., e HE, Z., *Emerging integrated nanohybrid drug delivery systems to facilitate the intravenous-to-oral switch in cancer chemotherapy*. J Control Release, 176 (2014) 94-103.
7. O CANCRO, disponível em <http://www.ligacontracancro.pt/gca/index.php?id=9>, última consulta: 27/4/2015.
8. AGUEROS, M., ZABALETA, V., ESPUELAS, S., CAMPANERO, M.A., e IRACHE, J.M., *Increased oral bioavailability of paclitaxel by its encapsulation through complex formation with cyclodextrins in poly(anhydride) nanoparticles*. J Control Release, 145 (2010) 2-8.
9. PANDITA, D., AHUJA, A., LATHER, V., BENJAMIN, B., DUTTA, T., VELPANDIAN, T., e KHAR, R.K., *Development of lipid-based nanoparticles for enhancing the oral bioavailability of paclitaxel*. AAPS PharmSciTech, 12 (2011) 712-22.
10. ZABALETA, V., CALLEJA, P., ESPUELAS, S., CORRALES, L., PIO, R., AGUEROS, M., e IRACHE, J.M., *[Mucopenetrating nanoparticles: vehicles for the oral administration of paclitaxel]*. Ann Pharm Fr, 71 (2013) 109-18.
11. ARBOS, P., WIRTH, M., ARANGO, M.A., GABOR, F., e IRACHE, J.M., *Gantrez AN as a new polymer for the preparation of ligand-nanoparticle conjugates*. J Control Release, 83 (2002) 321-30.
12. ZABALETA, V., PONCHEL, G., SALMAN, H., AGUEROS, M., VAUTHIER, C., e IRACHE, J.M., *Oral administration of paclitaxel with pegylated poly(anhydride)*

Terapêuticas Alternativas para a Quimioterapia por Via Oral
nanoparticles: permeability and pharmacokinetic study. Eur J Pharm Biopharm, 81 (2012) 514-23.

13. PANDITA, D., AHUJA, A., VEPANDIAN, T., LATHER, V., DUTTA, T., e KHAR, R.K., *Characterization and in vitro assessment of paclitaxel loaded lipid nanoparticles formulated using modified solvent injection technique. Pharmazie, 64 (2009) 301-10.*
14. CROSASSO, P., CERUTI, M., BRUSA, P., ARPICCO, S., DOSIO, F., e CATTEL, L., *Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. J Control Release, 63 (2000) 19-30.*
15. KIM, S.C., KIM, D.W., SHIM, Y.H., BANG, J.S., OH, H.S., WAN KIM, S., e SEO, M.H., *In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. J Control Release, 72 (2001) 191-202.*
16. ZHANG, J. e MA, P.X., *Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective. Adv Drug Deliv Rev, 65 (2013) 1215-33.*
17. CHALLA, R., AHUJA, A., ALI, J., e KHAR, R.K., *Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. AAPS PharmSciTech, 6 (2005) E329-57.*
18. AGUEROS, M., RUIZ-GATON, L., VAUTHIER, C., BOUCHEMAL, K., ESPUELAS, S., PONCHEL, G., e IRACHE, J.M., *Combined hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and poly(anhydride) nanoparticles improve the oral permeability of paclitaxel. Eur J Pharm Sci, 38 (2009) 405-13.*
19. AGUEROS, M., ARESES, P., CAMPANERO, M.A., SALMAN, H., QUINCOCES, G., PENUELAS, I., e IRACHE, J.M., *Bioadhesive properties and biodistribution of cyclodextrin-poly(anhydride) nanoparticles. Eur J Pharm Sci, 37 (2009) 231-40.*
20. MEI, L., ZHANG, Z., ZHAO, L., HUANG, L., YANG, X.L., TANG, J., e FENG, S.S., *Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. Adv Drug Deliv Rev, 65 (2013) 880-90.*