

MESTRADO

TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

Micelas contendo Paclitaxel para uma Terapêutica direcionada ao Cancro Colorretal por Administração Via Retal

Stephanie Esteves Albino

M

2019

Micelas contendo Paclitaxel para uma Terapêutica direcionada ao Cancro Colorretal por
Administração Via Retal
Stephanie Esteves Albino

Faculdade de Farmácia

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto



**Micelas contendo Paclitaxel para uma
Terapêutica direcionada ao Cancro Colorretal por
Administração Via Retal**

Stephanie Esteves Albino

Dissertação realizada no âmbito do
Mestrado em Tecnologia Farmacêutica

Orientador: Professor Doutor Domingos Ferreira
Coorientadora: Professora Doutora Mafalda Videira

Porto, Setembro de 2019

"Learning never exhausts the mind"

Lionardo da Vinci

© Autor, 2019

Resumo

O cancro colorretal (CRC) é uma neoplasia maligna com desenvolvimento no intestino grosso, na região do colon e reto. Esta caracteriza-se pela mutação de células normais em neoplásicas com a capacidade de disseminar tecidos adjacentes ou distantes. A terapêutica atualmente utilizada no tratamento do CRC inclui modalidades como a cirurgia, quimioterapia, entre outras.

A quimioterapia tem como finalidade impedir o desenvolvimento e multiplicação de células cancerígenas pela administração de fármacos antitumorais. Contudo, apesar dos progressos feitos com o aparecimento de novos agentes quimioterapêuticos, o tratamento continua a ser limitado, com a exposição de todo o organismo ao fármaco.

Atualmente, os fármacos utilizados em quimioterapia atuam maioritariamente sobre o ciclo celular das células em proliferação, sendo estes denominados de citostáticos. O Ptx é um citostático frequentemente utilizado em diversos cancros, como o CRC, atuando no ciclo celular na fase G2/M a nível da polimerização dos microtúbulos. Apesar da sua eficácia terapêutica e aprovação pelo FDA este fármaco apresenta diversos efeitos adversos. Assim, de modo a ultrapassar estas limitações o uso de nanossistemas para o encapsulamento de fármacos antitumorais surge como abordagem promissora, a fim de diminuir a toxicidade destes e aumentar a sua seletividade.

As micelas são um tipo de nanossistemas obtidas a partir de copolímeros anfifílicos usados como sistemas de veiculação e entrega de fármacos para o cancro.

Este trabalho teve como objetivo a preparação de um nanossistema polimérico, tendo como base o polímero Pluronic® F127, para o encapsulamento e direcionamento do Ptx na terapêutica do CRC, com posterior incorporação do nanossistema numa formulação farmacêutica para administração por via retal.

Os resultados demonstraram que a incorporação do Ptx nas micelas não afetou o diâmetro médio e potencial zeta do sistema, tendo uma eficácia de encapsulação de 100%. *In vitro* as Mic-Ptx apresentaram maior eficácia terapêutica em doses intermédias (5 e 0,5 μM) quando comparadas com a administração do Ptx livre ao fim de 24h de incubação.

Em suma, foram obtidas micelas com características apropriadas à veiculação e internalização do Ptx, como estáveis físico-quimicamente quando mantidas as condições de micelização.

Palavras-chave: Administração via retal, Cancro colorretal (CRC), Copolímeros anfifílicos, Micelas (Mic), Paclitaxel (Ptx) e Quimioterapia direcionada.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is a malignant neoplasm that develops in the large intestine, colon and rectum. This neoplasm is characterized by the mutation of normal cells in neoplastic cells having the ability to spread adjacent or distant tissues. The therapy currently used to treat CRC includes modalities such as surgery, chemotherapy, among others.

Chemotherapy aims to prevent the development and multiplication of cancer cells by administering antitumor drugs. However, despite the progress achieved with the emergence of new chemotherapeutic agents, treatment remains limited, with whole body exposure to the drug.

Currently, drugs used in chemotherapy act mainly on the cell cycle of proliferating cells, and are called cytostatic. Ptx is a cytostatic frequently used in various cancers, such as CRC, acting in the G2 / M cell cycle and hindering the levels of microtubule polymerization. Despite its therapeutic efficacy and FDA approval, this drug has several adverse effects. Thus, in order to overcome these limitations, the use of nanosystems to encapsulate antitumor drugs appears as a promising approach in order to decrease their toxicity and increase their selectivity.

Micelles are a type of nanosystems obtained from amphiphilic copolymers used as cancer drug delivery and delivery systems.

This work aimed to prepare a polymeric nanosystem, based on Pluronic® F127 polymer, for the encapsulation and direction of Ptx in CRC therapy, with subsequent incorporation of the nanosystem in a pharmaceutical formulation for rectal administration.

The results showed that the incorporation of Ptx in the micelles did not affect the average diameter and zeta potential of the system, having an encapsulation efficiency of 100%. In vitro Mic-Ptx showed higher therapeutic efficacy at intermediate doses (5 and 0.5 μM) when compared to administration of free Ptx after 24h of incubation.

In short, micelles with characteristics suitable for Ptx placement and internalization were obtained as chemically stable when the micellization conditions were maintained.

Keywords: *Rectal administration, Colorectal cancer (CRC), Amphiphilic copolymers, Micelles (Mic), Paclitaxel (Ptx), and Targeted chemotherapy.*

Agradecimentos

Gostaria de expressar os mais sinceros agradecimentos a todos os que tiveram uma intervenção na execução desta Dissertação.

Ao Professor Doutor Domingos Ferreira, pelo apoio e disponibilidade em ter aceite o meu pedido em ser meu Orientador. O meu mais profundo agradecimento pela forma como me acolheu, pela sua amizade e disponibilidade, em permitir que fosse possível o desenvolvimento desta dissertação

À Professora Doutora Mafalda Videira, pela sua orientação científica, pela sua amizade, pelos seus conselhos, pela sua disponibilidade, pela sua exigência, pelo seu apoio e pela revisão cuidada desta dissertação. O meu sincero muito obrigada, por tornar possível o desenvolvimento desta dissertação.

À Carla Vânia, agradeço a sua disponibilidade que coorientou a validação do método analítico e os estudos de estabilidade. Um reconhecimento muito especial pela sua dedicação, simpatia e rigor crítico.

À Carolina Sousa, manifesto o meu agradecimento pelo auxílio no laboratório.

A todos os professores e alunos de doutoramento que estiveram presentes neste período, pelo apoio e palavras de encorajamento e incentivo.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, agradeço a cedência dos laboratórios, dos equipamentos e materiais utilizados neste trabalho de investigação.

Um agradecimento à minha família e a todos os meus amigos, pois sem o apoio incondicional dos mesmos não seria possível ultrapassar todos os percalços que fui encontrando.

À minha família, especialmente aos meus pais, Albino José e Maria Esteves, e irmãos, Maria Esteves e Sérgio Esteves, o meu Muito Obrigada, pelo vosso amor incondicional. Nada seria possível sem a vossa presença, pois sois os alicerces da minha vida e os responsáveis por eu ser quem sou e estar onde estou.

A todos aqueles que de certo modo fazem parte da minha vida, e continuaram a fazer, e tiveram o seu impacto na realização deste trabalho. Um obrigada especial à Eloísa Ribeiro, Carolina Veríssimo, Ana Laura Dias, Catarina Pires, Li Fernandes, Rita Sousa, Frederico Pratas, Gustavo Almeida, Andreia Marinho, Joana Marto, André Esgalhado, Rui Soares, Patrícia Oliveira, Lília, Denise, Dona Rosário, Dona Teresa e a todos os que não estão nesta lista Muito Obrigada a todos por ter tido o privilégio de vos ter na minha vida e puder contar convosco ao longo deste período.

Às minhas estrelinhas que iluminam e amparam cada passo que dou nesta vida, os meus avós ausentes, mas presentes, obrigada por me terem ensinado a amar com os olhos e coração de uma eterna criança.

A ti que nunca desistas dos teus sonhos, que mesmo sem chão para pisar nunca te esqueças que podes voar. Não existe limites para um coração cheio de vontade. Sorri, ama e luta como uma eterna criança sonhadora que és.

Índice

Capítulo 1.....	1
Introdução	1
1. Cancro Colorretal	2
2. Quimioterapia	3
3. Fármacos antitumorais	5
3.1. Paclitaxel	5
3.1.1 Nomenclatura	5
3.1.2 Estrutura	6
3.1.3 Propriedades Físico-químicas	6
3.2. ADME	7
3.2.1. Propriedades Farmacocinéticas	7
3.2.2. Mecanismo de ação	7
4. Sistemas para a administração de fármacos	9
4.1. Nanossistemas	9
4.2. Nanotecnologia em oncologia	10
4.3. Micelas	13
5. Objetivos	18
Capítulo 2.....	21
Preparação e Caracterização de Micelas Poliméricas contendo Paclitaxel	21
1. Introdução	22
2. Material e Métodos	24
2.1. Materiais	24
2.2. Métodos	24
2.2.1. Preparação das micelas poliméricas	24
2.2.2. Determinação do potencial zeta	25
2.2.3. Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão	26
2.2.4. Caracterização morfológica das micelas	27
2.2.5. Eficácia de encapsulação	27
2.2.6. Estabilidade	28
3. Resultados e Discussão	30
3.1. Resultados	30
3.1.1. Aspecto macrocópico das formulações	30
3.1.2. Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta	30
3.1.3. Caracterização morfológica das micelas	32
3.1.4. Eficácia de encapsulação	32
3.1.5. Estabilidade	33
4. Conclusões.....	35
Capítulo 3.....	37
Desenvolvimento do método analítico para o doseamento do Paclitaxel	37
1. Introdução	38
2. Material e Métodos	41
2.1. Materiais	41
2.2. Métodos	41
2.2.1. Especificidade	42
2.2.2. Linearidade	42
2.2.3. Precisão	43
2.2.4. Exatidão	44
2.2.5. Determinação do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	44
3. Resultados e Discussão	45
3.1. Resultados	45
3.1.1. Especificidade	45
3.1.2. Linearidade	47
3.1.3. Precisão	49

3.1.4. Exatidão	49
3.1.5. Determinação do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	49
4. Conclusões	50
Capítulo 4.....	51
Estudos <i>in vitro</i>	51
1. Introdução.....	52
2. Material e Métodos	55
2.1. Materiais	55
2.2. Métodos	55
2.2.1. Preparação e caracterização das micelas poliméricas marcadas	55
2.2.2. Linha celular e condições de cultura	56
2.2.3. Avaliação da citotoxicidade e determinação do IC50	56
2.2.4. Determinação do tipo de morte celular	57
2.2.5. Internalização celular das micelas	58
3. Resultados e Discussão	60
3.1. Materiais	60
3.1.1. Caracterização das micelas poliméricas marcadas	60
3.1.2. Avaliação da citotoxicidade e determinação do IC50	60
3.1.3. Determinação do tipo de morte celular	63
3.1.4. Internalização celular das micelas	66
4. Conclusões	68
Capítulo 5.....	69
Administração por Via Retal	69
Capítulo 6.....	73
Conclusões Finais e Perspetivas Futuras	73

Lista de figuras

Figura 1 - Ilustração anatômica do intestino grosso, colon e reto. Adaptado de <i>U.S. National Library of Medicine</i> (6).....	2
Figura 2 - Estrutura química do Paclitaxel (23).....	6
Figura 3 - O Ptx suprime a instabilidade dinâmica dos microtúbulos, impedindo que a despolarização dos mesmos ocorra, inibindo assim a progressão do ciclo celular, levando conseqüentemente à morte da célula. Adaptado de Gornstein <i>et al.</i> (2014) (35).	8
Figura 4 - Vantagens e desvantagens dos nanossistemas atualmente em estudo e uso clínico em medicina (43, 44).	10
Figura 5 – Esquemática do efeito de permeabilidade e retenção (EPR) no transporte de fármacos antitumorais através da vectorização passiva. Esta faz uso da permeabilidade aumenta presente na arquitetura anormal do tecido endotelial tumoral, permitindo a passagem dos nanossistemas pelo endotélio fenestrado alcançando o tumor e conseqüente libertação do fármaco encapsulado. Adaptado de Gao <i>et al.</i> (2016) (47)....	11
Figura 6 – Representação dos diferentes mecanismos de internalização dos nanossistemas pelas células após interação membrana celular-nanossistema. Adaptado de Akash <i>et al.</i> (2015) (53).	12
Figura 7 – Tipos estruturais de copolímeros. Adaptado de Gungor <i>et al.</i> (2015) (58).	14
Figura 8 – Representação da estrutura molecular de um copolímeros tri-bloco (esquerda) e gráfica dos Pluronic® (direita) de acordo com o seu estado físico (verde – líquido, vermelho – pastoso e laranja – sólido). Adaptado de Pitto-Barry <i>et al.</i> (2014) (56).	15
Figura 9 – Ilustração do processo da formação de micelas por copolímeros tri-bloco quando atingida a CMC (concentração micelar crítica) ou a CMT (temperatura micelar crítica). Adaptado de Lucia <i>et al.</i> (2017) (63).	16
Figura 10 – Esquema das possíveis associações do fármaco com a micela dependendo da polaridade da molécula a encapsular. Moléculas polares (1), apolares (5) e polaridades intermédias (2, 3 e 4). Adaptado de Torchilin (2001) (54).....	17
Figura 11 - Diagrama representativo do potencial zeta de uma partícula em meio aquoso adaptado. Adaptado de Kaszuba <i>et al.</i> (2010) (88).	25
Figura 12 - Aspeto final das formulações (A) formulação de Pluronic® F127, na concentração de 1mg/ml; (B) formulação de Pluronic® F127 com Ptx, na concentração de 1mg/ml de F127 e 80µg/ml de Ptx.	30
Figura 13 - Imagens obtidas por TEM das micelas poliméricas de Pluronic® F127, com e sem a incorporação do fármaco, Mic-1 (A), Mic-2 (B), Mic-3 (C) e Mic-Ptx (D).	32
Figura 14 - Cromatograma da solução padrão de Ptx a 20 µg/ml.	45
Figura 15 - Cromatograma da solução de solvente, metanol.	46
Figura 16 - Cromatograma da solução da matriz, micelas vazias.	46

Figura 17 - Cromatograma da solução de trabalho, micelas com Ptxa 80 µg/ml (Mic-Ptx2).....	46
Figura 18 - Cromatograma da solução da fase móvel.	47
Figura 19 - Curva de Calibração da linearidade do método de doseamento do Ptx.	47
Figura 20 - Distribuição de resíduos da linearidade do método de doseamento do Ptx.	48
Figura 21 - Análise do normalizado em percentagem da linearidade do método de doseamento do Ptx.	48
Figura 22 - Ilustração das diferentes vias de internalização dos nanossistemas e respetivos mecanismos de ação. Adaptado de Ajdary <i>et al.</i> (2018) (116).	53
Figura 23 - Esquema ilustrativo da marcação com anexina-V e iodeto de propídeo (PI), para a determinação do tipo de morte celular por apoptose ou necrose, respetivamente (124).....	58
Figura 24 - Viabilidade celular da linha celular HCT-116 após o tratamento com a formulação de Ptx encapsulado (Mic-Ptx) e Ptx não encapsulado (Ptx) durante 24h (A), 48h (B) e 72h (C) de incubação, no intervalo de concentrações de 10 a 0.01 µM de Ptx. A viabilidade foi determinada pelo ensaio de MTT, usando as células não tratadas como control negativo. Os resultados foram expressos como media ± DP, para cada experiência das diferentes formulações de Mic-Ptx e de Ptx (p<0,0001).	61
Figura 25 - Imagens da linha celular HCT-116 obtidas por microscopia ótica de contraste de fase (ampliação 10x). As células foram incubadas com a formulação de Ptx livre (B) e com a formulação de Ptx encapsulado (C) na concentração de 5µM. Após a incubação com as formulações ao fim de 24h observaram-se alterações na morfologia das células, comparativamente com as células não tratadas (A), controlo.....	63
Figura 26 - Análise de apoptose celular da linha celular HCT-116 por citometria de fluxo, células controlo (A), incubadas com o Ptx (B) e incubadas com as Mic-Ptx (C) na concentração de 10 µM ao fim de 24h, recorrendo à marcação com Anexina V-FITC e PI. As células que apresentaram marcação para o PI, mas não para a Anexina-V, apresentam uma morte celular por necrose (quadrante superior esquerdo); marcação positiva tanto para a Anexina-V como para o PI é apoptose tardia (quadrante superior direito); marcação positiva para Anexina-V e negativa para o PI é morte por apoptose (quadrante inferior direito); as células viáveis não apresentam qualquer marcação (quadrante inferior esquerdo).	64
Figura 27 - Representação gráfica da percentagem de células viáveis e células com diferentes tipos de morte celular, tendo-se avaliado a percentagem de células em apoptose, induzida pelos diferentes tratamentos, Mic-Ptx e Ptx, após 24h de incubação. Os resultados foram expressos como média ± DP.	65
Figura 28 - Micrografias de microscopia de confocal representativas da internalização das Mic-DTAF pelas HCT-116, após 30 min (B), 2h (C) e 24h (D) de incubação, tendo (A) como controlo. As micelas foram previamente marcadas com DTAF, cor verde, e posteriormente os núcleos foram marcados com DAPI, cor azul, e a membrana com VIM, cor vermelha. As imagens foram obtidas para os diferentes tempos de incubação, tendo como controlo células não tratadas.	66
Figura 29 - Quantificação da internalização das Mic-DTAF após incubação com as HCT-116 em diferentes tempos de incubação. Os resultados foram expressos em termos de média ± desvio padrão.....	67

Lista de tabelas

Tabela 1 – Sistemas descritos na literatura para a veiculação do Ptx dependendo da via de administrada utilizada.	18
Tabela 2 - Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta (ζ) determinado para as micelas poliméricas vazias (Mic-1, Mic-2 e Mic-3) e contendo Ptx (Mic-Ptx), na concentração de 80 μ g/ml, preparadas pelo método da evaporação de solvente. Os resultados são expressos em média \pm DP.	31
Tabela 3 – Eficácia de encapsulação das formulações Mic-Ptx1 e Mix-Ptx2. Resultados são expressos em média ($p>0.05$).	33
Tabela 4 – Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta determinado para a Mic-3 após 1 e 6 meses de armazenamento à temperatura ambiente protegido da luz. Os resultados são expressos em média \pm DP.	33
Tabela 5 - Eficácia de encapsulação da formulação Mix-Ptx2 após 1 mês de armazenamento à temperatura ambiente protegido da luz. Os resultados são expressos em média ($p>0.05$).	34
Tabela 6 - Parâmetros necessários para a validação de um método analítico (92).	38
Tabela 7 - Avaliação da repetibilidade e precisão intermédia do método de doseamento para a determinação do Ptx.	49
Tabela 8 - Avaliação da exatidão do método de doseamento do Ptx.	49
Tabela 9 - Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta (ζ) determinado para as micelas poliméricas marcadas com 5-DTAF (Mic-DTAF). Os resultados são expressos em média \pm DP.	60

Abreviaturas e Símbolos

ADME	Absorção Distribuição Metabolização e Excreção
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> , Microscopia de força atômica
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Tissue Type Culture Collection</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i> , (Trifosfato de adenisina)
CAS	Número de registo CAS
CMC	<i>Critical Micelle Concentration</i> , Concentração micelar crítica
CMT	<i>Critical Micelle Temperature</i> , Temperatura micelar crítica
CO ₂	Dióxido de carbono
CRC	Cancro Colorretal
CrEL	<i>ChremophorEL</i>
CV	Coefficiente de variação Comissão dos Medicamentos para uso Humano
C8	8 átomos de carbono
C18	18 átomos de carbono
DAPI	<i>4',6'-diamino-2-fenil-indol</i>
DDSs	<i>Drug Delivery Systems</i> , Sistemas de veiculação de fármacos
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , Meio de cultura modificado
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> , Tampão fosfato-salino
DTAF	<i>5-([4,6-DICHLOROTRIAZIN-2-yl]amino)fluorecein hydrichloride</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ácido etilenodiamino tetra-acético
E.E.	Eficácia de encapsulação
EPR	<i>Enhanced permeability and retention effect</i> , Efeito de permeabilidade e retenção
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
F127	<i>Pluronic® F127 (PEG-PPO-PEG)</i>
GDP	<i>Guanosine Diphosphate</i> , Difosfato de guanosina
GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i> , Trifosfato de guanosina
G2	Fase G2 do ciclo celular, 3ª etapa da interfase
HCT	<i>Human Cells Tissues</i>
HPMA	<i>N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide</i>

HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> , Cromatografia Líquida de alta eficiência
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IC50	<i>Half maximal inhibitory concentration</i> , Metade da concentração inibitória máxima
IP	<i>Polydispersity Index</i> , Índice de polidispersão
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
M	Fase mitótica, ocorre a divisão nuclear
mAU	Medida de “Unidades de Absorbância”
MDR	<i>Multidrug Resistance</i> , Células cancerígenas multirresistentes
Mic	Micelas
Mic-DTAF	Micelas marcadas com DTAF
Mic-Ptx	Micelas contendo Ptx encapsulado
MPS	<i>Mononuclear Phagocytic System</i> , Sistema mononuclear fagocitário
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NaOH	Hidróxido de sódio
NLC	<i>Nanostructured Lipid Carrier</i> , Transportadores Lipídicos Nanoestruturados
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCL	<i>Poly(ϵ-caprolactone)</i> , Poli(caprolactona)
PEG	<i>Poly(ethylene glycol)</i> , Polietileno glicol
PEO	<i>Polyethylene oxide</i> , Poli(óxido de etileno)
Pgp	<i>P-glycoprotein</i> , Glicoproteína-P
PHO	<i>Poli(3-hydroxyoctanoate)</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i> , Iodeto de propídeo
PLA	<i>Poly(lactic acid)</i> , Poli(ácido-láctico)
PLGA	<i>Poly(D,L-lactide-co-glycolic acid)</i> , Ácido láctico – co- glicólico
PPO	<i>Polypropylene oxide</i> , Poli(óxido de propileno)
PS	<i>Phosphatidylserine</i> , Fosfatidilserina
Ptx	<i>Paclitaxel</i>
RES	<i>Reticuloendothelial system</i> , Sistema Reticuloendotelial
r.p.m.	Rotações por minuto
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i> , Microscopia eletrônica de varredura
siRNA	<i>small interfering Ribonucleic acid</i> , Ácido ribonucleico interferente
SLN	<i>Solid lipid nanoparticles</i> , Nanopartícula lipídica sólida
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i> , Microscopia eletrônica de transmissão
UV/Vis	Ultravioleta Visível
VIM	Vimentina

Lista de símbolos

A	Absorbância
c	Concentração analítica
°C	Temperatura em Graus Celsius
D	Coeficiente de difusão
Da	Dalton
d.m.	Diâmetro médio
ϵ	Coeficiente de absorção
g	Gramas
g/l	Gramas por litro
g/ml	Gramas por mililitro
g/mol	Gramas por mol
h	Hora
k	Kilodalton
K	Constante de Boltzman
logP	Coeficiente de partilha
mg	Miligramas
mg/m ²	Miligramas por metro quadrado
mg/ml	Miligramas por mililitro
mg/toma	Miligramas por toma
min	Minuto
ml	Mililitro
ml/min	Mililitro por minuto
mm	milímetro
MM	Massa molar
mM	milimolar
mV	milivolt
nm	Nanometro
nM	nanomolar
pH	Potencial de hidrogénio
pKa	Constante de acidez
p/v	Peso por volume
R	Raio hidrodinâmico
r	Coeficiente de correlação
r ²	Coeficiente de determinação
T	Temperatura
η	Viscosidade
μg	Microgramas

$\mu\text{g/ml}$	Micrograma por mililitro
μl	Microlitro
μM	Micromolar
v/v	Volume por volume
ζ	Zeta
π	Valor de pi
%	Porcentagem
2D	Dois dimensões

Capítulo 1

Introdução

1. Cancro Colorretal

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a neoplasia como patologia de crescimento descontrolado e consequente disseminação para tecidos adjacentes e/ou distantes (1). Esta caracteriza-se como uma massa de tecido anormal, resultante de uma taxa de proliferação elevada e irregular, com um nível de morte celular inferior ao normal (2, 3).

A carcinogénese não é nada mais do que a transformação gradual e progressiva de uma célula normal numa neoplásica, devido a mutações genéticas ou alterações epigenéticas, que induzem a ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor. Os oncogenes são proto-oncogenes que sofreram alterações, estes genes são responsáveis pelo crescimento e divisão normal numa célula. Enquanto que, os genes supressores de tumor são responsáveis pela codificação de proteínas que inibem a divisão celular, reparam alterações no DNA e dão indicação à célula quando deve ocorrer a sua morte. A combinação de mutações nestes genes, são o ingrediente chave para originar a formação de células cancerígenas (2-4).

O cancro colorretal (CRC) é uma neoplasia maligna com desenvolvimento no intestino grosso, na região do colon e reto. Considerando este dividido em cego, colon ascendente, transversal e descendente, sigmoide e reto. Estes dois últimos em conjunto, dão origem à parte terminal do trato gastrointestinal (5, 6).

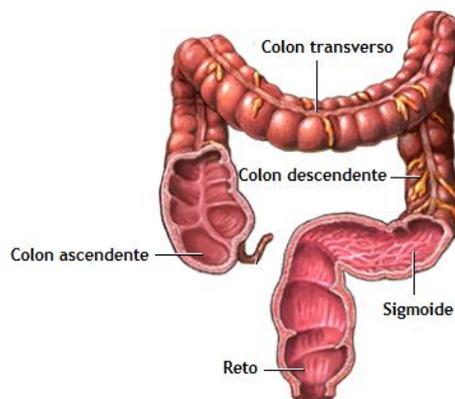


Figura 1 - Ilustração anatómica do intestino grosso, colon e reto. Adaptado de *U.S. National Library of Medicine* (7).

Este órgão possui como funções principais a absorção de água e eletrólitos, armazenamento dos resíduos alimentares, formação de fezes, até à defecação. Este apresenta movimentos que permite a mistura das fezes e as propulsa em direção ao reto. Ao longo deste percurso o muco é produzido de modo a não só lubrificar o epitélio intestinal, como a facilitar o fluxo das fezes e proteger o mesmo contra a ação dos ácidos produzidos pelas bactérias (8, 9).

O CRC é uma patologia que ocorre, na maioria das situações clínicas, pela mutação de células saudáveis, quando expostas a diversos fatores externos, o que leva inicialmente à formação de pólipos no intestino. A não remoção dos mesmos poderá refletir-se no

desenvolvimento de uma neoplasia maligna com a capacidade de metastizar para tecidos/órgãos adjacentes e distantes (6, 10, 11).

Uma limitação fundamental desta patologia é a reduzida hipótese de diagnóstico precoce, mesmo com os avanços tecnológicos atualmente disponíveis. Isto deve-se a um período inicial de crescimento “silencioso”, sem qualquer tipo de sintomatologia, levando a uma detecção em estágio avançado, com presença de metástases, tornando assim o CRC um dos tumores mais mortais a nível mundial (10, 12).

Atualmente, o tratamento para o CRC inclui várias opções terapêuticas, como a cirurgia, sendo esta terapêutica a de eleição pela resseção cirúrgica do tumor, a quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e a terapia combinada (9).

Contudo, apesar das vantagens da cirurgia, a possibilidade de desenvolver metástases mais agressivas após resseção no mesmo local são elevadas e recorrentes. Assim, a aplicação de uma terapêutica combinada, cirurgia com quimioterapia localizada é fundamental para diminuir a probabilidade de recorrência da patologia e, respetiva metastização, pois uma das características principais do CRC é a sua elevada heterogeneidade celular (6, 10-12).

2. Quimioterapia

Para o tratamento de neoplasias várias modalidades terapêuticas são aplicadas, como, a cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e imunoterapia. Cada modalidade de tratamento apresenta vantagens e desvantagens, sendo a sua combinação, terapia multimodal, por vezes necessária para produzir resultados mais efetivos, na remissão de células cancerígenas metastáticas (13-15). Estas devem ser utilizadas segundo indicações específicas, de modo multidisciplinar e coordenado, para proporcionar a melhor terapêutica e, com menores efeitos adversos aos pacientes diagnosticados com este tipo de patologia (2).

A quimioterapia é hoje em dia uma das terapêuticas em crescimento, onde diversos estudos têm sido realizados com a finalidade de se obter um tratamento (16, 17):

- ✓ menos agressivo, no que se refere à via de administração, frequência e respetivas doses;
- ✓ específico e com menores efeitos adversos possíveis, pela encapsulação dos fármacos antitumorais em sistemas de direcionamento e veiculação de fármacos (DDSs).

Esta modalidade além da aplicação no tratamento de neoplasias disseminadas, assume um impacto crescente como terapêutica adjuvante da cirurgia, com o objetivo de remover micrometástases, ou ainda como terapêutica neoadjuvante ou primária, com a finalidade de

reduzir o tamanho do tumor, de forma a que terapêuticas secundárias/complementares como a cirurgia/radioterapia sejam mais eficientes (2, 18).

A quimioterapia tem como principal função impedir o desenvolvimento e multiplicação das células cancerígenas, como única terapêutica ou em associação com outras. Este é um tratamento que recorre a substâncias químicas com ação antineoplásica, sob a forma isolada ou em combinação, de forma a garantir uma dose suficiente, num determinado período, adequado à eliminação do tumor (14, 15).

A eficácia desta modalidade depende de vários fatores incluindo o tipo de fármaco, a dosagem, a forma farmacêutica, a via de administração, a condição do doente, entre outros (13), apresentando limitações no(a) (13, 15, 19):

- ✓ desenvolvimento de formulações contendo medicamentos antineoplásicos, devido à elevada hidrofobicidade dos fármacos, obrigando ao uso de excipientes não aquosos para os veicular, pondo em risco a vida dos pacientes;
- ✓ disponibilidade do fármaco *per si*, como por exemplo o fármaco antitumoral Paclitaxel, um diterpenoide extraído da casca do teixo do Pacífico ou Ocidental;
- ✓ lesão de células saudáveis, apesar das substâncias usadas no tratamento serem mais eficazes nas células cancerígenas, devido à sua elevada taxa de proliferação;
- ✓ desenvolvimento de resistência aos fármacos por parte do tumor.

A resistência dos fármacos pelas células neoplásicas pode ser (13, 14, 20, 21):

- ✓ farmacocinética, devido à dose-efeito do fármaco;
- ✓ cinética, devido a uma pequena porção de células expostas à substância química, ou seja, devido à forma/estrutura do tumor só as células presentes na periferia do mesmo sofreram a ação do fármaco;
- ✓ genética devido à resistência bioquímica por parte das células.

Apesar dos progressos feitos com o aparecimento de novos agentes anticancerígenos, o tratamento continua a ser limitado, com a exposição de todo o organismo ao fármaco. Este problema deve-se em parte à inespecificidade da citotoxicidade dos fármacos utilizados nesta patologia (2).

3. Fármacos antitumorais

Atualmente, os fármacos utilizados em quimioterapia atuam maioritariamente sobre o ciclo celular das células em proliferação, sendo estes denominados de citostáticos (18).

Segundo a sua ação no ciclo celular, estes podem ser divididos em dois grupos. Os agentes específicos de fase, onde a sua ação se exerce numa determinada fase do ciclo celular, isto é, possuem uma toxicidade seletiva quando a célula se encontra numa fase específica do seu crescimento, dependendo a eficácia da substância de quando é administrada. As neoplasias características de uma rápida proliferação são as mais sensíveis a este tipo de fármacos. Neste grupo encontrando-se as substâncias inibidoras mitóticas, como o Paclitaxel (18).

Os citostáticos não específicos de fase são ativos em todas as fases do ciclo celular e, podem ser mais eficazes contra neoplasias de proliferação lenta. Exemplos são os agentes alquilantes, antibióticos antitumorais, entre outros (18, 22).

Sendo o nosso objetivo desenvolver um nanossistema para a veiculação de um fármaco antitumoral para o CRC e este caracterizar-se como um adenocarcinoma, neoplasia precursora de células glandulares com elevada taxa de proliferação, devido à elevada regeneração do tecido mesmo em situação saudável, o fármaco escolhido foi um agente específico de fase, o Paclitaxel.

3.1. Paclitaxel

O Paclitaxel (Ptx), como referido, é um fármaco citostático, específico de fase, comumente usado na terapêutica neoplásica com elevada taxa de divisão celular.

Esta substância pertence à classe dos agentes antitumorais do grupo dos taxanos diterpenóides, com ação antimitótica frequentemente usado no cancro do ovário, pulmão, mama, colon, entre outros (23).

É um composto natural, proveniente da casca do teixo do Pacífico, *Taxus brevifolia*, por fermentação, tendo como seu análogo semissintético, o docetaxel (13, 24).

3.1.1. Nomenclatura

DCI/INN - *Paclitaxelum* (24).

Nome químico (segundo as regras da IUPAC) – 4,10-Diacetato de 2-benzoato 13-[(2R,3S)-3(benzoilamino)-2-hidroxi-3-fenilpropanoato] de 5β,20-epoxi-1,7β-di-hidroxi-9-oxotax-11-eno-2α,4,10β,13β-tetraílo (24).

CAS Reg. No. - 33069-62-4.

3.1.2. Estrutura

Fórmula de estrutura

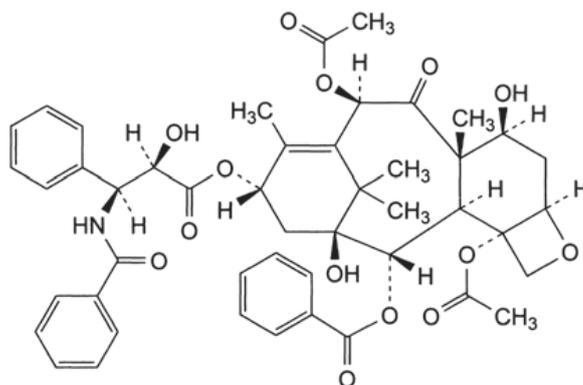


Figura 2 - Estrutura química do Paclitaxel (24).

Fórmula Molecular: C₄₇H₅₁NO₁₄ (24).

3.1.3. Propriedades Físico-químicas

O Ptx apresenta-se como um pó de coloração branca, com uma massa molecular de 854g/mol, ponto de fusão entre 216 – 217°C e um logP igual a 3,5¹ (25, 26). Este diterpenoide apresenta uma estrutura com caráter lipofílico, sem grupos funcionais desionizados, sendo por isso uma substância praticamente insolúvel na água, pouco solúvel ≤ 0,5mg/ml (13) em solventes aquosos, solúvel em metanol e facilmente solúvel em cloreto de metileno caracterizando-se assim como fármaco de baixa biodisponibilidade oral² (23, 24, 26, 27).

¹ O logP é o coeficiente de partilha definido como a relação entre a concentração do fármaco em um solvente orgânico e em água (solventes imiscíveis). Caracterizando-se que quanto maior o coeficiente menor será a polaridade da molécula, maior facilidade em atravessar as membranas biológicas, menor biodisponibilidade oral. Exemplo é o caso do ácido salicílico que caracteriza-se por uma biodisponibilidade oral rápida com logP de 1,31 (24).

² A biodisponibilidade de um fármaco é caracterizada segundo a classificação biofarmacêutica (26).

Classe	Solubilidade	Permeabilidade
I	Alta	Alta
II	Baixa	Alta
III	Alta	Baixa
IV	Baixa	Baixa

Possuindo um anel taxano como núcleo, a relação estrutura-atividade antitumoral do Ptx encontra-se na cadeia lateral, localizado no carbono 13 do anel (no grupo éster), no carbono 2, pelo grupo benzoilo (23) e no anel oxetano (13, 26).

3.2. ADME

Na farmacologia encontramos duas áreas de extrema relevância, aquando da administração de fármacos, a farmacocinética e a farmacodinâmica. A farmacodinâmica refere-se à ação farmacológica do fármaco administrado, ou seja, os mecanismos pelos quais ele atua para exercer o seu efeito no organismo, seja ela organotrópica ou etiotróica, enquanto que a farmacocinética, descreve o tipo de absorção, distribuição, biotransformação e excreção dos fármacos (18).

3.2.1. Propriedades Farmacocinéticas

A administração do Ptx é feita por via intravenosa e, por isso, a substância não é submetida ao efeito de primeira passagem, etapa pelo qual os fármacos normalmente são submetidos após administração oral. Convencionalmente a administração é realizada em intervalos de tempo de 3 semana, com uma dosagem de 135-175mg/m² (18, 28).

Em termos de distribuição, aproximadamente 90-95% do fármaco liga-se a proteínas presentes no plasma, como a albumina sérica, ficando reduzida a sua percentagem de fármaco livre no sangue (29, 30).

A distribuição é homogênea ao longo de todos os tecidos, com a exceção do SNC. Esta segue uma distribuição não linear, dependente da dose e/ou frequência de administração, ou seja, alterações na dosagem ou frequência irão refletir-se em alterações na concentração do fármaco no organismo (31, 32).

A metabolização é maioritariamente hepática, pelas enzimas do citocromo P450 (31), e a nível de excreção a eliminação é a nível fecal. Uma minoria ocorre pela urina na sua estrutura inalterada (26, 33).

3.3. Mecanismo de ação

O Ptx atua no ciclo celular na fase G2/M a nível da polimerização dos microtúbulos, isto é, a polimerização e alongamento dos microtúbulos leva à sua estabilização no citoesqueleto, impedindo assim a progressão do ciclo celular e induzindo a morte da célula por apoptose (33-36).

De forma resumida, os microtúbulos são estruturas dinâmicas na forma de cilindros longos e ocos formados pela proteína tubulina, ligada frequentemente a um centro organizado de microtúbulos, o centrossoma (2).

O polímero da proteína tubulina é um heterodímero formado por 2 subunidades de proteínas globulares intimamente ligadas, não covalentemente, a α - e β -tubulina. Cada monômero α - ou β - desta proteína possui um sítio de ligação para uma molécula de GTP. No monômero α -, esta liga-se fisicamente à interface do dímero, não sendo por isso hidrolisado ou substituído. Enquanto que no monômero β - esta pode encontrar-se na forma de GTP ou GDP, passível de ser substituído no dímero da tubulina solúvel (quando se encontra não polimerizada) (2, 36).

A tubulina e, conseqüentemente, os microtúbulos são sintetizados durante a fase G2 e na prófase da mitose. Tendo como função principal a formação do fuso mitótico durante a divisão celular, e conseqüentemente manter a estrutura celular e mobilidade citoplasmática da célula (2, 33, 34).

Perante o exposto, fármacos com ação na polimerização e/ou despolimerização dos microtúbulos, possuem interesse farmacológico para quimioterapia, devido às neoplasias se caracterizarem por uma divisão celular aumentada e desregulada. Exemplos de substâncias químicas com ação nos microtúbulos são os antineoplásicos nocodazole, que interage com as subunidades da tubulina e, o Ptx que se liga aos microtúbulos estabilizando-os, bloqueando assim a sua dinâmica, que é essencial para o correto funcionamento do fuso mitótico (2, 36).

A ação do Ptx deve-se à ligação da cadeia lateral do carbono 13 do anel taxano com a subunidade β - da tubulina no N-terminal (34, 37). Este processo estabiliza os microtúbulos, inibindo a mitose celular, pela incapacidade de as células poderem formar o eixo normal, levando à morte das células (23).

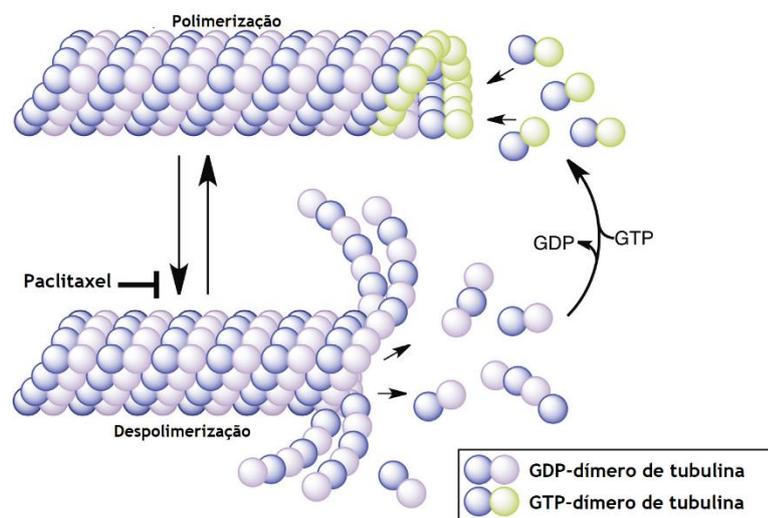


Figura 3 - O Ptx suprime a instabilidade dinâmica dos microtúbulos, impedindo que a despolimerização dos mesmos ocorra, inibindo assim a progressão do ciclo celular, levando conseqüentemente à morte da célula. Adaptado de Gornstein *et al.* (2014) (36).

A primeira formulação aprovada pelo FDA de Ptx, Taxol®, é uma preparação injetável contendo uma mistura orgânica de ChremophorEL (CrEL), óleo de rícino polietoxilado, e etanol di-hidratado, de modo a melhorar a biodisponibilidade do Ptx. Apesar da sua aprovação esta formulação apresenta diversos efeitos adversos como reações de hipersensibilidade, neutropenia, mielossupressão, neurotoxicidade, cardio e nefrotoxicidade. Para a redução destes efeitos, o tratamento com o Taxol®, requer um pré-tratamento com glucocorticóides, como a dexametasona, e anti-histamínicos, como a difenidramina (13, 23).

4. Sistemas para a administração de fármacos

A nanotecnologia surgiu como abordagem promissora para o encapsulamento de agentes terapêuticos, a fim de diminuir a toxicidade destes, aumentar a seletividade e reduzir a resistência que os mesmos possam provocar devido a terapêutica utilizada.

Os sistemas de administração de fármacos (DDSs) tem ganho crescente atenção no tratamento de diversas patologias, como o cancro, recorrendo a vias de administração oral, intravenosa, pulmonar, vaginal, retal, etc.

4.1. Nanossistemas

Os nanossistemas são partículas coloidais sólidas variando o seu tamanho entre 1 e 100nm de diâmetro, mas dependendo do contexto podem medir até 500nm. Estes sistemas podem ser obtidos a partir de materiais biodegradáveis, biocompatíveis e não tóxicos, de origem natural ou sintética, onde compostos ativos, como os fármacos antitumorais, podem ser incorporados no interior da matriz (núcleo), ou adsorvidos à superfície do sistema, por ligações não covalentes. Vários métodos para a preparação dos DDSs encontram-se descritos na literatura, dependentes do material usado para o desenvolvimento do nanossistema, como do fármaco a incorporar (38, 39).

Dentro dos nanossistemas atualmente descritos, podemos referir os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), as partículas lipídicas nanoestruturadas (NLC), niossomas, dendrímeros, micelas, nanopartículas poliméricas, entre outras.

Os lipossomas são sistemas definidos como vesículas esféricas com núcleo aquoso, formadas por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas, com a capacidade de incorporar fármacos hidrofílicos no interior do núcleo aquoso e hidrofóbicos no interior ou adsorvidos à bicamada lipídica (40).

As SLN e as NLC são nanopartículas lipídicas com a principal diferença na configuração da sua matriz lipídica. Enquanto que as SLN apresentam uma matriz lipídica sólida ordenada, as NLC possuem uma matriz menos ordenada, devido à mistura de lípidos sólidos com líquidos, de

modo a aumentar a taxa de encapsulação e evitar a libertação do fármaco, maior limitação das SLN (41-43).

Outros sistemas descritos são as nanopartículas poliméricas. Estes sistemas apresentam como vantagem, maior estabilidade que os sistemas à base de lípidos, devido à integridade estrutural da matriz polimérica. No entanto, a desvantagem recai no uso de solventes orgânicos para dissolver os polímeros. O quitosano, dextrano, alginato, PLGA (ácido láctico-co-glicólico), PEG (polietileno glicol), os agentes tensoativos, como os Pluronic[®], são polímeros aprovados e amplamente explorados atualmente para nanossistemas (44).

Um aspeto importante que se deve ter em consideração no desenvolvimento de DDSs, são as vantagens e desvantagens que estes oferecem perante a administração do fármaco livre.

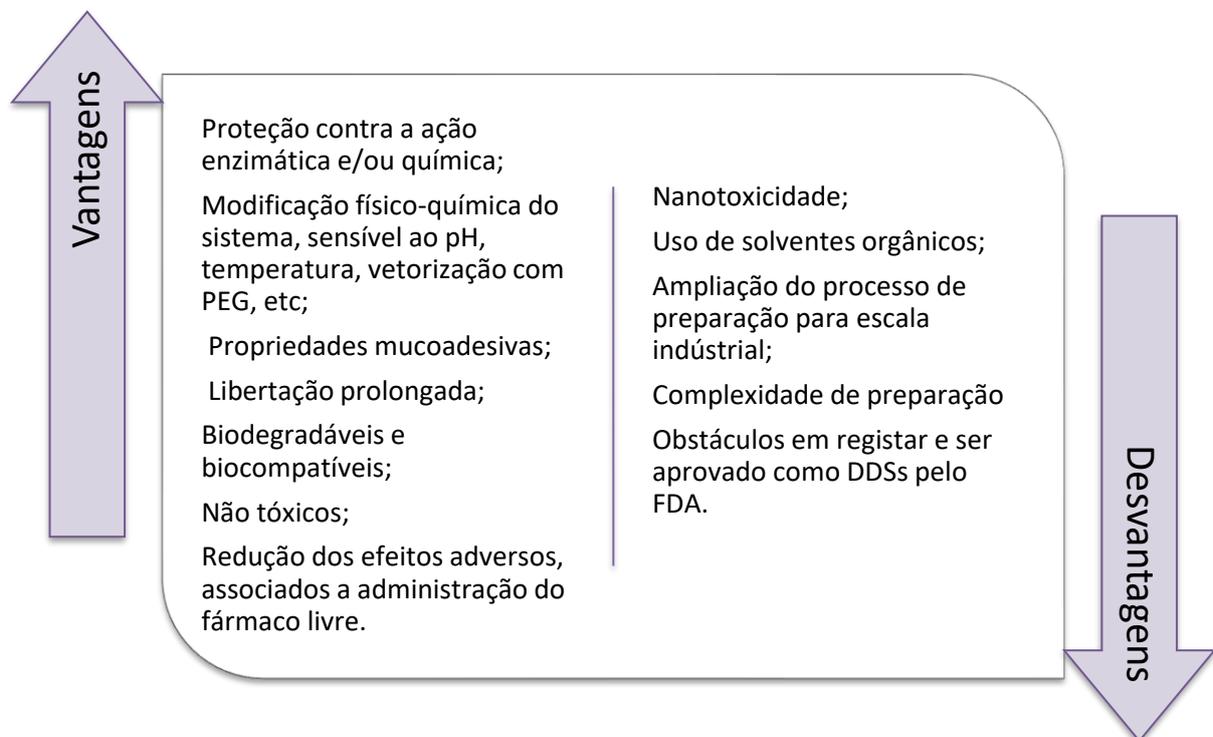


Figura 4 - Vantagens e desvantagens dos nanossistemas atualmente em estudo e uso clínico em medicina (45, 46).

4.2. Nanotecnologia em oncologia

Na terapêutica do CRC, o principal objetivo é ter uma mínima absorção sistémica, com níveis máximos de fármaco na mucosa intestinal. Contudo, isto não acontece, pois, a administração de fármacos antitumorais é por via oral ou intravenosa, submetendo-os ao ambiente hostil do trato gastrointestinal, variações de pH e ação enzimática, como o efeito de primeira passagem com a metabolização hepática e, as diferenças de permeabilidade intestinal. Esta terapêutica devido à

absorção em locais não alvo e a elevada taxa de eliminação, obriga à administração de doses elevadas, resultando muitas vezes em toxicidade (47).

No entanto, este problema pode ser ultrapassado pela terapêutica direcionada recorrendo a nanossistemas. Segundo o descrito na literatura, as neoplasias possuem um endotélio capilar vascular altamente desorganizado, quando comparado ao dos tecidos normais, proliferando de modo rápido e descontínuo, originando um endotélio desorganizado, lesado e dilatado, devido a uma angiogênese anormal, com a formação de fenestras que variam entre os 200 e 600nm. Esta malformação do endotélio permite que nanossistemas com diâmetros inferiores a 200nm, consigam passar por entre as fenestras alcançando e acumulando-se no interstício do tumor e, serem posteriormente endocitadas pelas células tumorais (48).

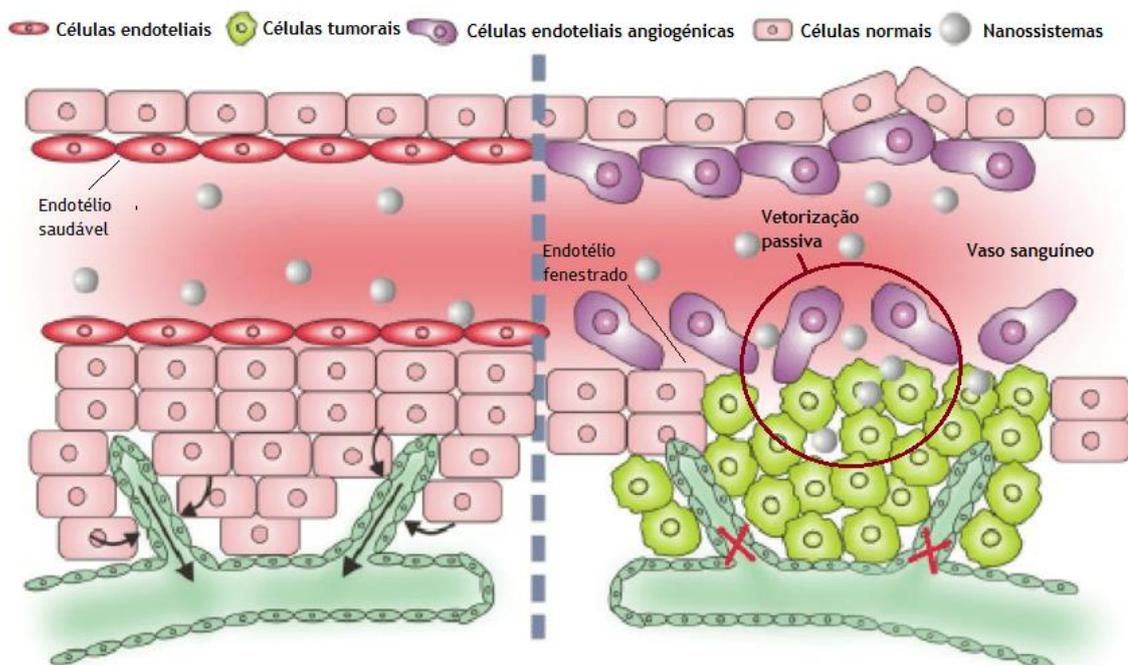


Figura 5 – Esquemática do efeito de permeabilidade e retenção (EPR) no transporte de fármacos antitumorais através da vectorização passiva. Esta faz uso da permeabilidade aumentada presente na arquitetura anormal do tecido endotelial tumoral, permitindo a passagem dos nanossistemas pelo endotélio fenestrado alcançando o tumor e consequente libertação do fármaco encapsulado. Adaptado de Gao *et al.* (2016) (49).

Devido a esta anomalia no endotélio vascular do tumor é possível recorrer a uma vectorização do fármaco de forma passiva, ou seja, tirando partido das características fisiológicas do tecido para o direcionamento da substância, em vez de recorrer à vectorização ativa, que requer a ligação do transportador com ligandos específicos de recetores celulares do local alvo, devido ao efeito de permeabilidade e retenção (EPR) se encontrar aumentada neste tipo de patologias, resultando num aumento de nanossistemas no interstício do tumor e consequentemente uma inibição do seu crescimento (50, 51). O aumento do efeito EPR é um fenómeno evidenciado em todas as neoplasias sólidas, como o caso do CRC (52).

Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis desempenham um papel fundamental como solução quimioterapêutica sustentada, quando projetados para o desenvolvimento de nanossistemas, onde DDSs obtidos a partir deste tipo de biomateriais podem fornecer uma administração de fármacos controlada e direcionada, com a finalidade de aumentar os efeitos terapêuticos e reduzir os efeitos adversos das substâncias veiculadas (53).

No desenvolvimento deste tipo de sistemas três fatores afetam a sua identidade tecnológica (53, 54):

- ✓ fatores relacionados com os nanossistemas, como as suas propriedades físico-químicas, tamanho, forma e carga de superfície, que são os principais determinantes da cinética de depuração e biodistribuição;
- ✓ fatores biológicos, a absorção de proteínas presentes no plasma que levam ao seu reconhecimento por parte do sistema reticuloendotelial (RES) ou sistema mononuclear fagocitário (MPS);
- ✓ fatores experimentais, tipo de mistura, temperatura, força iônica e osmolaridade.

Os nanossistemas quando atingem a membrana externa da célula, podem interagir com os componentes presentes na mesma e entrar para o interior da célula por endocitose. Este mecanismo caracteriza-se por o envolvimento do nanossistema por invaginações da membrana, que levam à formação de vesículas endocíticas, que transportam o sistema para o interior da célula (54, 55).

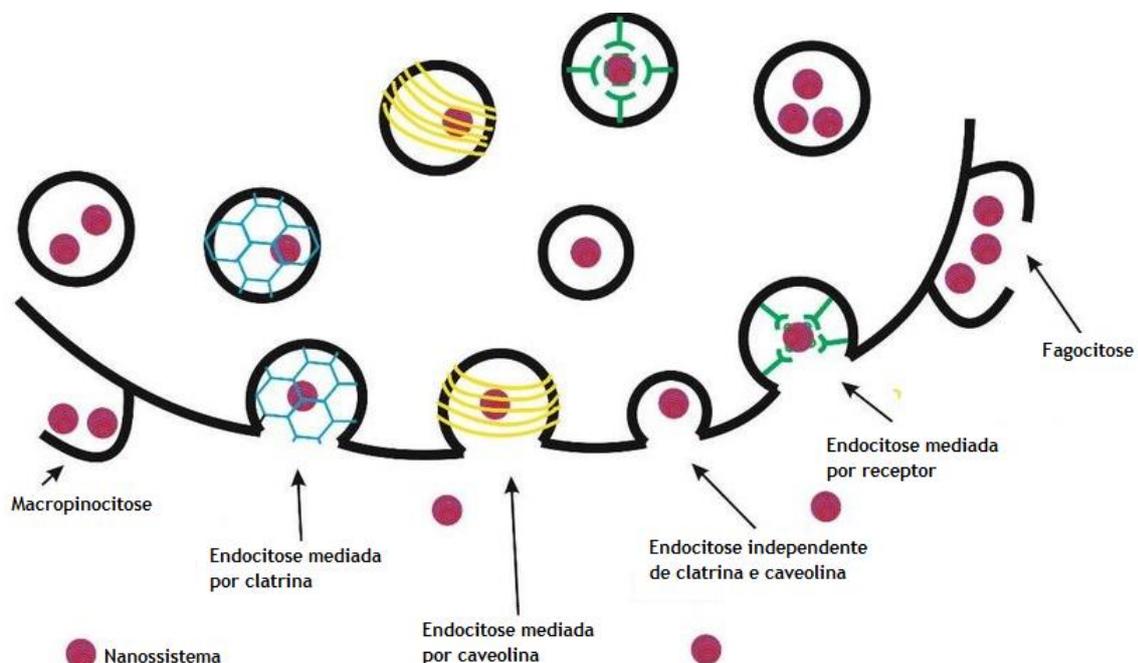


Figura 6 – Representação dos diferentes mecanismos de internalização dos nanossistemas pelas células após interação membrana celular-nanossistema. Adaptado de Akash *et al.* (2015) (55).

Face ao exposto, é de prever que as propriedades físico-químicas do nanossistema como tamanho, carga, forma, natureza química e índice de polidispersão, (possibilidade de formação de agregados/estabilidade do sistema), são fatores importantes na internalização do sistema no local alvo.

Assim, nanossistemas de tamanho reduzido, <200 nm, obtidos a partir de copolímeros biodegradáveis com equilíbrio hidrofóbico/hidrofílico e taxa de degradação desejada, são portanto, necessárias para aplicação na administração de fármacos em oncologia (53).

4.3. Micelas

As micelas são nanossistemas poliméricos caracterizados como uma dispersão coloidal distribuída dentro de uma fase contínua ou meio dispersante. Os polímeros que as constituem foram usados inicialmente como potenciadores de libertação de fármacos ou como surfactantes para alterar a morfologia e outras propriedades dos DDSs. Como por exemplo, o revestimento com o PEG para escapar ao sistema reticulo-endoplasmático, aumentando assim o tempo de circulação no organismo (56).

A combinação de um diâmetro médio inferior a 1000 nm, normalmente entre 10 e 250 nm, e consequentemente elevada área de superfície, formam sistemas ideais para (57):

- ✓ Formulações coloidais;
- ✓ Dispersões inalatórias (ex:por spray dry);
- ✓ Uma maior superfície de contacto nanossistema-célula.

Este tipo de sistemas é formado por moléculas com propriedades anfífilicas, isto é, a sua estrutura é composta por grupos hidrofóbicos e grupos hidrofílicos (58). O termo “anfílico”, provem de origem grega, em que anfi significa “ambos” e fil significa “gostar”, ou seja, são moléculas que possuem afinidade para meios polares e apolares.

A combinação destas propriedades opostas numa única molécula confere a estas, características únicas quando em contacto com solventes aquosos e/ou orgânicos, que se traduz na formação de uma estrutura capsular acima de determinada concentração, capaz de solubilizar no seu interior substâncias insolúveis em água (59).

O uso de copolímeros anfífilicos, tem surgido como nanossistemas promissores, especialmente por a sua presença implicar para o fármaco nele encapsulado uma ADME mais favorável do ponto de vista clínico (58). Esta dicotomia polar-apolar é fundamental para que o nanossistema apresente propriedades ativas de superfície (56, 57):

- ✓ proteger o fármaco/biológicos de degradação, por exemplo enzimática;
- ✓ diminuir os efeitos adversos associados ao fármaco por aumento da seletividade;

- ✓ biocompatível e não tóxico, aprovados pela FDA e utilizados na prática clínica, exemplo.

As micelas podem ser preparadas por polímeros ou copolímeros, que de modo simplificado podem ser classificados como (56, 60):

- ✓ homopolímeros, composto por monómeros hidrofílicos, ex: PEG;
- ✓ copolímeros, composto por dois tipos de monómeros, diferindo estes na sua solubilidade.

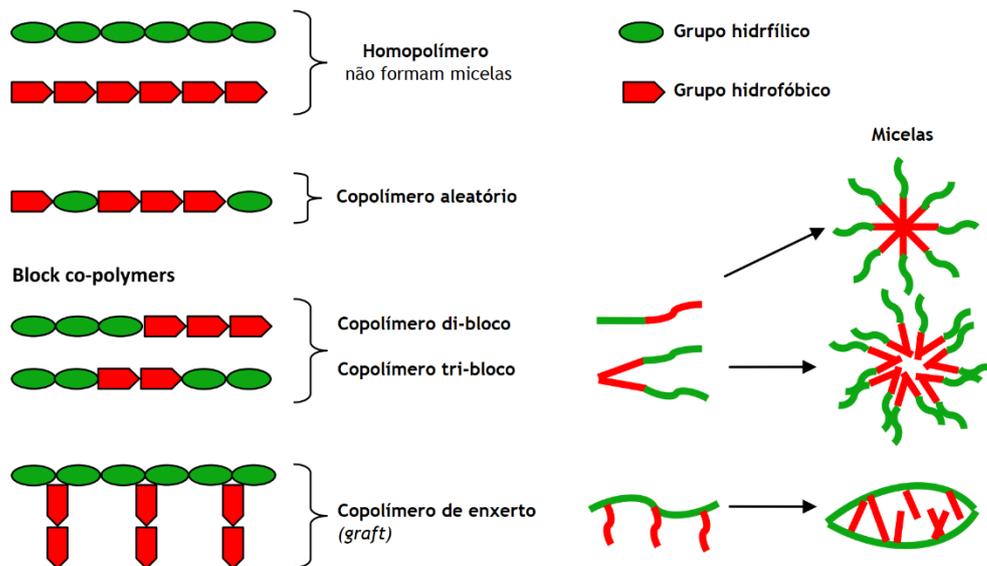


Figura 7 – Tipos estruturais de copolímeros. Adaptado de Gungor *et al.* (2015) (60).

Os copolímeros podem ainda ser classificados como di-bloco ou tri-bloco, formados por blocos hidrofílicos com cadeias de PEO (poli(óxido de etileno), polímero referido comumente como PEG e blocos hidrofóbicos com cadeias de PPO (poli(óxido de propileno), por exemplo (56, 58). Monómeros quimicamente diferentes (polar e apolar) tornam os copolímeros biomateriais com propriedades ativas de superfície (57). Os polímeros de PPO só são solúveis em água até pesos moleculares de 800-900 Da, pela combinação com o PEO é possível obter-se produtos de variada hidrofília (61).

A classe de copolímeros triblocos A-B-A, entre os quais os Pluronic®, são polímeros sintéticos anfífilos, solúveis em água e polimórficos, (A = bloco hidrofílico, poli(óxido de etileno) (PEO) e B = grupo hidrofóbico, (poli(óxido de propileno) (PPO), usados para a obtenção de micelas como sistema de incorporação e veiculação de fármacos (58).

Para a identificação dos Pluronic[®], o fabricante BASF, atribui-lhe uma nomenclatura formada por uma letra que indica o estado físico dos copolímeros em condições ambientais: L = líquido (verde), P = pastoso (vermelho) e F = floculado (laranja); seguido de 2 algarismos, o primeiro relaciona-se com o peso molecular do PPO e o segundo indica a percentagem de PEO nas moléculas (57, 58, 61).

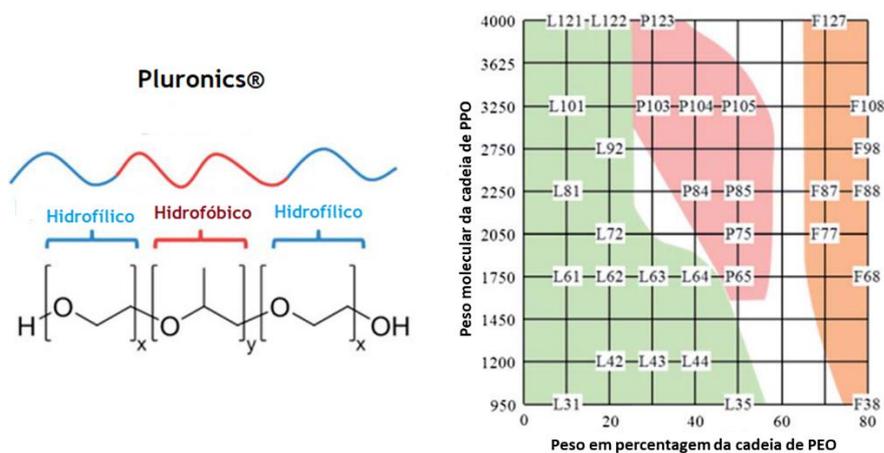


Figura 8 – Representação da estrutura molecular de um copolímeros tri-bloco (esquerda) e gráfica dos Pluronic[®] (direita) de acordo com o seu estado físico (verde – líquido, vermelho – pastoso e laranja – sólido). Adaptado de Pitto-Barry *et al.* (2014) (58).

Devido às suas propriedades tornam-se passíveis de vários tipos de processamento dos quais resultam diferentes formas, como micelas, hidrogéis e cristais líquidos liotrópicos, que são estruturas termodinamicamente estáveis, se respeitadas as condições de micelização, dependentes da concentração de polímero, temperatura e co-solventes da solução (57).

A micelização é o processo pelo qual ocorre a agregação das cadeias polares como cápsula, enquanto as apolares organizam-se centralmente em micelas, em solução aquosa de forma espontânea. Este é um processo endotérmico, devido à rutura das ligações de hidrogénio entre as moléculas de água, a fim de acomodar os polímeros em solução. Esta “automontagem” inicia-se quando se atinge a concentração micelar crítica (CMC) do polímero a uma temperatura fixa. Do mesmo modo, aumentando a temperatura para a temperatura micelar crítica (CMT), ou temperatura de Krafft, mantendo a concentração fixa também pode induzir a micelização (57, 62).

A CMC é definida como a menor concentração de moléculas de polímero na qual se inicia o processo de formação de micelas em meio aquoso (63).

No entanto, deve ter-se em consideração que as micelas em solução só se formam a partir de dada temperatura, temperatura de Krafft, que pode ser definida como a temperatura mínima a partir do qual se formam micelas, onde a solubilidade do polímero é iguala a CMC (56, 57).

A CMC pode ser determinada por espectroscopia de fluorescência ou UV/vis, tensão superficial e calorimetria (64).

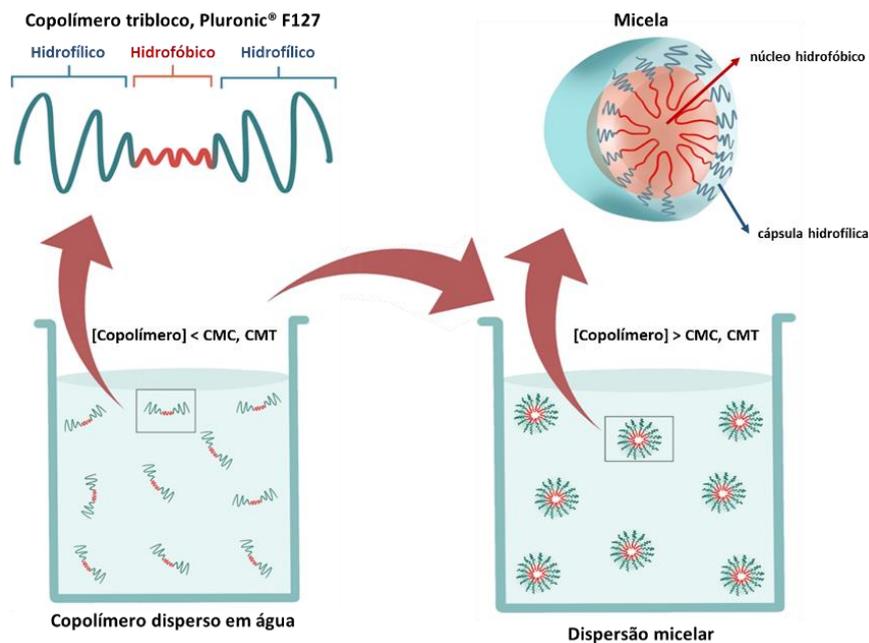


Figura 9 – Ilustração do processo da formação de micelas por copolímeros tri-bloco quando atingida a CMC (concentração micelar crítica) e a CMT (temperatura micelar crítica). Adaptado de Lucia *et al.* (2017) (65).

De acordo com o descrito na literatura, as micelas podem apresentar diâmetro médio entre 5 e 100 nm, e uma CMC de 10^{-7} a 10^{-3} mM em solução aquosa (66). As principais técnicas descritas para a obtenção deste tipo de sistemas são a dissolução direta, diálise, evaporação do solvente, liofilização, separação de microfases, homogeneização, entre outras (57, 64).

Para a incorporação do fármaco no interior da micela dois métodos distintos são descritos (67):

- ✓ a incorporação física, ocorre uma mistura/dissolução de polímero com o fármaco a encapsular recorrendo a um solvente aquoso e/ou orgânico;
- ✓ por reação química, onde ocorre a formação de oligómeros com grupos pendentes para permitir a ligação entre o polímero e o fármaco.

De todas as aplicações das micelas, a de maior interesse advém da sua capacidade de solubilizar substâncias pouco solúveis ou mesmo insolúveis em água, podendo estas ser transportadas depois de encapsuladas nas micelas. Segundo Torchilin, 2001, em solventes aquosos a localização do fármaco na micela depende da sua polaridade (56):

- ✓ moléculas polares – adsorvidas à superfície da cápsula hidrofílica;
- ✓ moléculas apolares – solubilizadas no núcleo hidrofóbico;
- ✓ moléculas com polaridades intermédias – distribuição entre a cápsula e núcleo da micela.

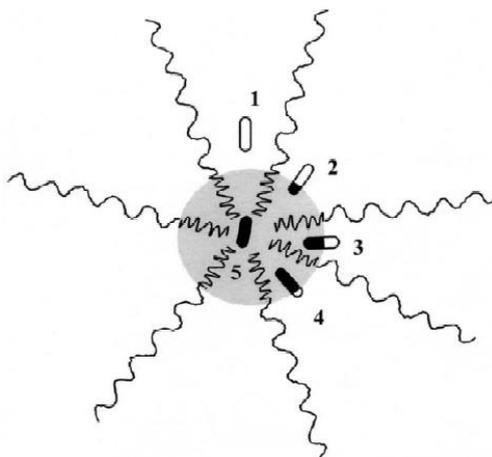


Figura 10 – Esquema das possíveis associações do fármaco com a micela dependendo da polaridade da molécula a encapsular. Moléculas polares (1), apolares (5) e polaridades intermédias (2, 3 e 4). Adaptado de Torchilin (2001) (56).

Sistemas micelares além de encapsular fármaco(s) alterando o perfil farmacocinético destes, podem também modificar as respostas biológicas na sensibilização de células cancerígenas multirresistentes (MDR), e promover a acumulação do fármaco intracelular (58). O fármaco encapsulado em micelas quando em ambiente biológico pode (63):

- ✓ modificar a microviscosidade da membrana celular;
- ✓ levar à diminuição do nível de ATP disponível nas células cancerígenas;
- ✓ inibir os transportadores de tipo bombas-efluxo de fármacos, como a glicoproteína-P;
- ✓ abolição na retenção do fármaco nas vesículas citoplasmáticas.

O uso de micelas como sistemas de veiculação e administração de fármacos, não é recente, a primeira formulação descrita para o cancro consistia numa mistura de doxorubicina com micelas de Pluronic® L61 e F127, encontrando-se atualmente em estudos clínicos na fase 2 com a denominação SP1049C (68).

Dos polímeros mais usados em medicina podem destacar-se os copolímeros de polietilenoglicol (PEG), poli(D,L-lactico-co-glicólico) (PLGA), poli(acido-lactico) (PLA), poli(caprolactona)(PCL), Pluronic®, N-(2-hidroxipropil)-mateacrilato (HPMA) e poli(aminoácidos) (58).

Em conclusão, as micelas poliméricas possuem inúmeras vantagens em comparação com outros sistemas, pois o seu reduzido tamanho entre 5-100 nm confere-lhes a capacidade de penetrar não só os tecidos tumorais, devido ao efeito EPR associado, como atravessar a barreira hematoencefálica e escapar ao sistema MPS. Sendo descritos como sistemas com elevado tempo de circulação, capacidade de solubilizar fármacos hidrofóbicos, aumentando a sua biodisponibilidade, acumulação no local de interesse e baixa toxicidade (56, 58, 64).

5. Objetivos

Na literatura encontram-se descritos nanossistemas para a veiculação e direcionamento do Ptx. A Tabela 1, apresenta algumas das formulações descritas, de sistemas de vectorização contendo o fármaco em estudo.

Tabela 1 – Sistemas descritos na literatura para a veiculação do Ptx dependendo da via de administrada utilizada.

Via de administração	Sistema de veiculação	Ref.
Oral	Micelas de PF127-CS/PF127-cysteine/NaC	(69)
Nasal	Nanopartículas de PLGA-glutathione	(70)
Transdérmico	Microemulsões	(71)
Implante	Implantes de PLGA	(72)
Vaginal	Nanopartículas de Pluronic® F127	(73)
Intravenosa	Nanopartículas contendo o Ptx ligado à albumina, Abraxane®, alternativa ao Taxol®, aprovado pelo FDA	(74)

Os nanossistemas descritos e aprovados tem como hipótese alterar a ADME do fármaco a administrar, pelo seu encapsulamento e veiculação permitindo:

- ✓ modificar a biodisponibilidade do fármaco;
- ✓ obter uma terapêutica mais seletiva e direcionada;
- ✓ diminuir a toxicidade e efeitos adversos, associados à via de administração, dose e frequência da terapêutica.

Tendo em mente o exposto, o objetivo deste trabalho foi preparar um nanossistema polimérico, tendo como base o polímero Pluronic® F127, para o encapsulamento e direcionamento do Ptx na terapêutica do CRC, com posterior incorporação do nanossistema numa formulação farmacêutica para administração por via retal.

Primeiro, avaliaram-se os métodos de preparação e caracterização do nanossistema selecionado, micelas de Pluronic® F127, com o fármaco encapsulado e não encapsulado. Em seguida, o desenvolvimento e validação do método analítico por HPLC foi necessário para a quantificação e determinação da quantidade de Ptx encapsulado no interior das micelas obtidas.

Por fim, foram realizados estudos *in vitro* foram realizados de modo a avaliar e prever os efeitos citotóxicos do nanossistema desenvolvido, numa linha celular tumoral de CRC, a linha HCT-116, representativa do adenocarcinoma colorretal.

Apesar de fazer parte do nosso objetivo, a preparação de um veículo final para a incorporação do nanossistema para administração retal, este não foi possível desenvolver. Contudo, redigiu-se um capítulo sobre esta via de administração e tipo de veículos disponíveis, bem como exemplos descritos na literatura com nanossistemas para administração via retal, para que possíveis estudos na progressão deste trabalho sejam possíveis.

Capítulo 2

Preparação e Caracterização de Micelas Poliméricas contendo Paclitaxel

1. Introdução

Nos últimos anos, o uso da nanotecnologia na área dos medicamentos tem sido amplamente estudado para ultrapassar vários problemas associados com a administração de fármacos num veículo de administração. Exemplos desta aplicação é a aprovação por parte do FDA nos anos 90 do Abraxame®, que consiste numa formulação de nanopartículas contendo Ptx associados à albumina para a terapia do cancro da mama metastático, bem como, o Daunoxome® e Doxil®, que são lipossomas peguilados contendo daunorrubicina e doxorubicina, respetivamente, para o tratamento do sarcoma de Kaposi (75-77).

Esta área baseia-se na obtenção de sistemas de dimensões da ordem dos nanómetros, 1 a 100 nm, tendo a possibilidade de serem modificados a fim de otimizar as propriedades físicas, químicas e biológicas do sistema dependendo da sua aplicação em biomedicina.

Os sistemas atualmente aplicados no encapsulamento e direcionamento de fármacos são diversos, podendo destacar-se as: nanossuspensões, lipossomas, nanopartículas lipídicas, poliméricas, metálicas ou cerâmicas, nanotubos, dendrímeros, micelas, nanocápsulas, etc. Podendo estes transportadores ser de origem natural ou sintética e, dependendo do método utilizado para a sua obtenção, podem apresentar diversas formas, dimensões com propriedades físico-químicas e biológicas específicas (78, 79).

A preparação do nanossistema é um passo crucial para o desenvolvimento de um transportador eficaz na entrega do fármaco para o local alvo. Pois sendo o objetivo, conseguir um sistema eficiente e de libertação controlada, a sua preparação deve ter em consideração parâmetros como: o diâmetro médio (d.m), propriedades físico-químicas do fármaco, carga e características da superfície do sistema, interações fármaco-sistema, biocompatibilidade, toxicidade, biodistribuição e a possibilidade de poderem ocorrer reações imunológicas adversas (antigenicidade) (80-82).

Os nanossistemas apresentam vantagens como (80-82):

- ✓ devido ao seu reduzido tamanho, podem alcançar zonas do organismo menos acessíveis, pela via endocítica e ultrapassando diversas barreiras anatómicas, como a barreira cutânea, hematoencefálica e alcançar neoplasias, pelo efeito de permeabilidade e retenção (EPR) aumentado;
- ✓ encapsulamento de diferentes tipos de moléculas como fármaco hidrossolúveis/lipossolúveis, DNA, proteínas, siRNA;
- ✓ minimização dos efeitos adversos dos fármacos quando administrados livremente, pela terapêutica seletiva;
- ✓ proteção contra a degradação, maior biodistribuição, diminuição da citotoxicidade e da dose de administração, alterando o perfil farmacocinético do fármaco;
- ✓ aumento do tempo de circulação, pelo não reconhecimento por parte do sistema fagocitário mononuclear (MPS).

No entanto, os nanossistemas também apresentam limitações que devem ser tidas em consideração, como o reduzido tamanho, tornando difícil a sua manipulação levando à possibilidade de formação de agregados o que influencia a eficiência de encapsulação e a capacidade de provocar reações inflamatórias em locais de difícil acesso (83).

Como referido anteriormente, as micelas são sistemas muito utilizados, podendo ser obtidas a partir de copolímeros constituídos por monómeros de PEO e PPO, como os Pluronic®. Apresentam como vantagens não só a possibilidade de encapsular fármacos hidrossolúveis e lipossolúveis, como de permanecer mais tempo em circulação devido a cadeias de PEO, que minimizam a ligação de opsoninas e proteínas do soro, diminuindo o seu reconhecimento por parte do MPS e consequentemente menor índice fagocitário (84).

Outra razão pelo qual tem havido interesse nestes copolímeros, deve-se a sua habilidade em modificar a fluidez da membrana e, como tal, interferir com processos intracelulares, inibir proteínas transmembranares que funcionam como bombas de efluxo de fármacos, contribuindo para a inibição da MDR (63, 85).

A formação das micelas ocorre da solubilização do polímero num solvente aquoso, numa concentração acima da CMC, mesmo à temperatura ambiente. Os métodos mais usados e que se encontram descritos na literatura para a obtenção de micelas como sistema de entrega de fármacos são a dissolução direta numa solução aquosa, ideal para polímeros com elevada solubilidade em água, e o método de evaporação de solvente para polímeros mais hidrofóbicos (57, 64, 66).

O nosso objetivo foi preparar um nanossistema previamente desenvolvido no nosso laboratório para a veiculação de oligonucleotídeos (86, 87), micelas poliméricas de Pluronic® F127, para melhorar a eficácia terapêutica do Ptx no tratamento do CRC. O Pluronic® F127 é um copolímero também denominado por poloxâmero 407, aprovado pela FDA como aditivo alimentar e/ou excipiente farmacêutico (88). É atualmente um dos polímeros descritos e usados em estudos com fármacos anticancerígenos como o paclitaxel (54) e a doxorubicina (58).

2. Material e Métodos

2.1. Materiais

O Pluronic® F127 (copolímeros sólido apropriado para cultura celular), e o Paclitaxel de origem natural *Taxus brevifolia*, foram adquiridos na Sigma Life Science (Sigma-Aldrich, EUA). O metanol da classe de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foi da VWR® CHEMICALS (Merck, Alemanha) e a água ultrapura (Sartorius, Alemanha).

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação das micelas poliméricas

As micelas foram obtidas pelo método da evaporação do solvente, também conhecido como o método da hidratação do filme. Este método consiste em dissolver o polímero num solvente orgânico, com posterior evaporação do mesmo a determinada temperatura sobre vácuo, para a formação de um filme polimérico. Após a obtenção do filme, este é hidratado com um solvente aquoso sobre agitação ou sonicação, com a formação espontânea das micelas (64).

Protocolo experimental

Micelas

Como referido as micelas foram preparadas de acordo com o método desenvolvido no nosso laboratório (86, 87), tendo apenas estudado a estabilidade físico-química do sistema dependendo da sua concentração final.

Massas de 2,5 mg, 5,0 mg e 7,5 mg de Pluronic® F127 ($MM = g/mol$) foram pesadas para balões de diluição de fundo redondo, com posterior dissolução em 5 ml de metanol. Os balões foram selados com parafilme e deixados a solvatar durante a noite. Após a solvatação, procedeu-se à evaporação do solvente, usando um rotavapor com bomba de vácuo, a uma agitação de 60 r.p.m., em banho de água a 60°C. O balão de diluição foi encaixado no agitador e imerso na água do banho, durante cerca de 30 min. Depois da evaporação, selaram-se novamente os balões e foram colocados na câmara de fluxo durante a noite para total secagem do filme. Este filme foi posteriormente hidratado com água ultrapura à temperatura ambiente.

Micelas com paclitaxel

Para a obtenção de micelas com Ptx encapsulado, o procedimento foi igual ao descrito para as micelas vazias, a concentração final de polímero escolhido foi de 1mg/ml.

5 mg de Pluronic F127 foram pesados, dissolvidos em 5 ml de metanol em balão de diluição de fundo redondo, tendo-se adicionado a esta solução concentrações entre 10 e 80 $\mu\text{g/ml}$ de Ptx.

2.2.2. Determinação do potencial zeta

As propriedades referentes à superfície dos nanossistemas, como a carga, são de extrema importância, pois permite prever a estabilidade do sistema quando em suspensão. Segundo a literatura, partículas com potenciais elétricos elevados terão menor tendência para agregar, ou seja, partículas com carga elétrica abaixo de -30 mV e acima de +30 mV são mais estáveis em suspensão, logo menor será a tendência para formar agregados (89).

A carga de superfície de uma partícula é normalmente traduzida pelo potencial zeta, parâmetro que reflete a carga, podendo ser positiva, negativa ou neutra. Este depende do tipo de polímero utilizado, da matriz formada pelo sistema e das interações com o solvente e fármaco encapsulado (90).

O potencial zeta pode ser definido como a diferença de tensão elétrica entre a superfície da partícula e da suspensão que a envolve. Isto é, o movimento de partículas carregadas num meio contínuo ou o movimento do meio sobre a superfície carregada de uma partícula, traduz um fenómeno eletrocinético, resultante numa acumulação de cargas elétricas nas interfaces (90).

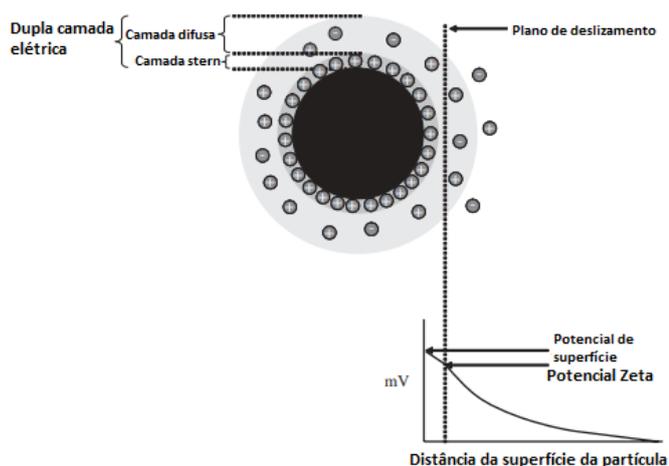


Figura 11 - Diagrama representativo do potencial zeta de uma partícula em meio aquoso adaptado. Adaptado de Kaszuba *et al.* (2010) (90).

Este parâmetro é importante ser determinado, porque dependendo da carga do sistema, irá influenciar no tipo de proteínas que irão se adsorver, ou seja, partículas aniônicas são facilmente opsonizadas, enquanto que as catiónicas adsorvem proteínas presentes no soro. Assim, os sistemas para a administração de fármacos devem possuir um potencial zeta neutro ou relativamente negativo para não interagir com o MPS, logo maior tempo de circulação (91).

Protocolo experimental

O potencial zeta foi determinado usando a técnica de espalhamento de luz eletroforética na dispersão aquosa contendo as micelas, com e sem o Ptx encapsulado, usando microeletroforese Doppler a laser, num sistema NanoZS (Malvern Instruments, UK). Cada formulação foi analisada em triplicado e os resultados expressos em média \pm desvio-padrão.

2.2.3. Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão

O diâmetro médio de um sistema é outro dos parâmetros que deve ser analisado, onde a sua ordem de grandeza tem impacto na liberação do fármaco encapsulado, como na estabilidade/comportamento do sistema após administração no organismo. De acordo com a literatura, partículas de grandes dimensões permitem um maior rendimento na incorporação do fármaco no interior do sistema e, uma liberação mais lenta, com a desvantagem de poder ser reconhecido pelo MPS mais facilmente devido às suas dimensões. Enquanto, as partículas pequenas possuem maior área de superfície e, portanto, a liberação da substância ativa será mais rápida, com maior propensão à agregação (92).

A determinação deste parâmetro consiste na medição da dispersão provocada na fonte de radiação incidente por parte das partículas em suspensão. Ou seja, não se encontrando estas estáticas (possuem movimentos Brownianos), a difração da luz ao longo do tempo varia em função do coeficiente de difusão (D) do meio dispersante, onde as variações da intensidade da difração da luz são tanto mais rápidas quanto menores forem as dimensões das partículas suspensas (93). Assim, o raio hidrodinâmico (R) da partícula pode ser obtido através da equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta R} \quad (\text{equação 1})$$

Fondu, K é a constante de Boltzman, T a temperatura da solução, η a viscosidade da amostra a analisar e R o raio hidrodinâmico (93).

Protocolo experimental

O diâmetro médio das partículas foi determinado por dispersão dinâmica de luz, à temperatura de 25°C, no NanoZS (Malvern Instruments, UK). Com posterior confirmação por microscopia eletrónica de transmissão (TEM).

2.2.4. Caracterização morfológica das micelas

Atualmente existem diferentes técnicas para a caracterização da morfologia das micelas, tais como, a microscopia de força atómica (AFM), e microscopia eletrónica de varrimento (SEM) ou transmissão (TEM). As técnicas de microscopia eletrónica baseiam-se na incidência de um feixe de luz sobre a amostra, sendo detetado a interação dos eletrões com a amostra, enquanto, no AFM mede-se as interações atrativas ou repulsivas entre a ponta do cantiléver do AFM e os átomos da superfície da amostra. As micelas preparadas foram caracterizadas por TEM.

Protocolo

Para a análise da morfologia das formulações desenvolvidas, as amostras foram colocadas numa grelha e deixas secar ao ar. Posteriormente, foram observadas por TEM (Hitachi H8100/ThermoNoran System SIX), procedimento realizado pela Engenheira Isabel Nogueira do MicroLab, Laboratório de Microscopia eletrónica, do Instituto Superior Técnico de Lisboa.

2.2.5. Eficácia de encapsulação

A capacidade que um sistema consegue encapsular determinado fármaco é outro parâmetro que deve ser avaliado, de modo a garantir a eficácia e qualidade do mesmo. Este parâmetro pode ser obtido recorrendo à equação de eficácia de encapsulação, E.E. (%):

$$E.E. (\%) = \frac{\text{Concentração de fármaco encapsulado}}{\text{Concentração de fármaco inicial}} \times 100 \quad (\text{equação 2})$$

Para este estudo recorreu-se a duas metodologias para a obtenção e determinação do fármaco livre vs fármaco encapsulado. A separação do sobrenadante por ultrafiltração/centrifugação e a centrifugação para a separação dos constituintes da formulação após destruição do sistema pela adição de etanol.

Protocolo experimental

Fármaco livre

Para a extração e posterior quantificação do Ptx livre recorreu-se à separação da fase continua da suspensão das micelas por ultrafiltração/centrifugação.

A formulação foi previamente diluída em água ultrapura na razão 1:1, com posterior centrifugação durante 20 min, a 6 000 r.p.m., em um Nanosep® com uma membrana de ultrafiltração de *cut-off* de 3K. A fração da fase externa foi recolhida e quantificada por HPLC.

Fármaco encapsulado

Na quantificação do fármaco encapsulado, optou-se por destruir o sistema previamente com etanol, numa diluição de etanol:formulação de 2:1. Após a destruição do sistema, a amostra foi submetida a agitação de 120 r.p.m., durante 30 min, à temperatura ambiente, com posterior centrifugação a 4 000 r.p.m., durante 30 min, para a separação do Ptx da matriz polimérica. O sobrenadante foi quantificado por HPLC.

Todos os estudos foram realizados em triplicado. A análise estatística das diferenças entre as formulações foi realizado por *One-way* ANOVA.

2.2.6. Estabilidade

A estabilidade de uma formulação farmacêutica refere-se à capacidade de manter dentro de limites específicos e durante o tempo de armazenamento a integridade física e química da formulação (94). Dentro dos fatores ambientais responsáveis pela alteração das propriedades e características das formulações, incluem-se (95):

- ✓ o pH, fator de maior relevância na estabilidade da formulação;
- ✓ a temperatura, aumentando a taxa de velocidade das reações duas vezes por cada aumento de 10°C;
- ✓ a luz, pode fornecer a energia necessária para ocorrer uma reação de degradação;
- ✓ o solvente, que afeta as propriedades físico-químicas dos fármacos como a constante de acidez (pKa);
- ✓ o tamanho das partículas, quanto menor o tamanho, maior é a área de superfície logo maior é a sua reatividade, entre outros.

Protocolo

Para avaliar a estabilidade das formulações desenvolvidas foram realizados estudos de estabilidade físico-química, como determinação do diâmetro médio das partículas, potencial zeta e teor de fármaco nas micelas.

As formulações foram armazenadas durante 1 a 6 meses à temperatura ambiente, protegidas da luz.

3. Resultados e Discussão

3.1.1. Aspeto macroscópico das formulações

Na figura 12 é possível verificar o aspeto das formulações de micelas produzidas pelo método da evaporação do solvente. O aspeto final das preparações é função quer da natureza do polímero utilizado na obtenção da matriz micelar, do solvente de hidratação, quer do fármaco encapsulado. Na imagem é possível observar, da esquerda para a direita, a formulação de micelas vazias de Pluronic® F127 e de micelas com Ptx encapsulado. A solução contendo o Ptx encapsulado apresentava uma ligeira coloração esbranquiçada, sendo a restante transparente.

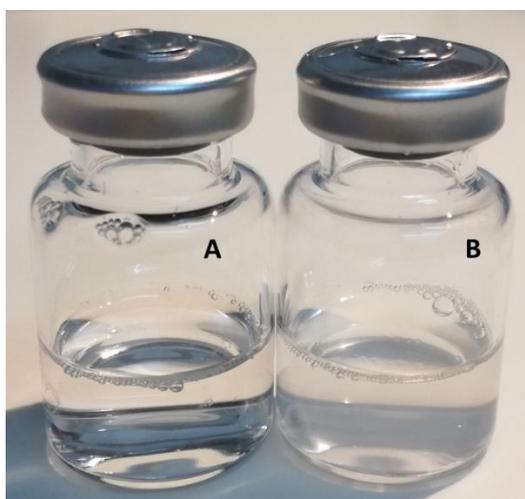


Figura 12 - Aspeto final das formulações (A) formulação de Pluronic® F127, na concentração de 1mg/ml; (B) formulação de Pluronic® F127 com Ptx, na concentração de 1mg/ml de F127 e 80µg/ml de Ptx.

3.1.2. Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

Como referido anteriormente, de forma a escapar ao sistema fagocitário mononuclear e, conseqüentemente, aumentar o tempo de circulação no organismo, a literatura tem descrito que as partículas devem apresentar um tamanho inferior a 200 nm. Pois este parâmetro tem demonstrado impacto sobre o tempo e biodistribuição dos nanossistemas no organismo.

Neste estudo, o tamanho médio e respetiva distribuição de tamanho, como o potencial zeta das micelas vazias e contendo Ptx encapsulado foi determinado, encontrando-se os resultados na Tabela 2. Numa fase inicial, foi analisado a relação concentração de polímero versus diâmetro da partícula e potencial zeta obtidos.

Preparação e Caracterização de Micelas Poliméricas contendo Paclitaxel

Tabela 2 - Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta (ζ) determinado para as micelas poliméricas vazias (Mic-1, Mic-2 e Mic-3) e contendo Ptx (Mic-Ptx), na concentração de 80 μ g/ml, preparadas pelo método da evaporação de solvente. Os resultados são expressos em média \pm DP.

Formulação	Concentração de F127 (mg/ml)	Diâmetro (nm)	IP	Potencial ζ (mV)
<i>Mic-1</i>	0,50	15,1 \pm 5,5	0,60	-0,38 \pm 4,17
<i>Mic-2</i>	1,00	15,0 \pm 5,9	0,60	-0,67 \pm 3,08
<i>Mic-3</i>	1,50	7,4 \pm 1,8	0,50	-0,67 \pm 4,25
<i>Mic-Ptx</i>	1,00	72,4 \pm 15,5	0,59	-0,21 \pm 4,44

Perante a análise dos resultados verificou-se que o diâmetro médio das micelas está entre 7 e 15 nm para as micelas vazias e 72,4 nm para as micelas contendo Ptx. O índice de polidispersão foi sempre superior ao esperado.

Os resultados obtidos vão ao encontro com o descrito na literatura, referindo que o diâmetro de micelas obtidas a partir do Pluronic® F127 podem variar entre os 7 e 25 nm (57, 96-98). A coexistência de micelas e agregados maiores também se encontra descrito em estudos anteriores, tendo estes revelado a formação de micelas esféricas de pequeno tamanho juntamente com aglomerados reversíveis dependentes do tipo de polímero utilizado para a obtenção da matriz (96).

Segundo Farzaneh et al. (2016), refere que um aumento na concentração do polímero resulta numa diminuição do tamanho das micelas, indicando que este parâmetro está inversamente relacionado com a massa de polímero presente na formulação. Esta relação foi possível verificar também no nosso estudo onde a formulação com maior concentração de polímero apresentou um menor diâmetro de partícula, quando comparada com as formulações de menor concentração.

O IP é considerado uma medida quantitativa da homogeneidade da dispersão, na distribuição do tamanho das partículas na suspensão coloidal. Sendo que um valor próximo de zero indica que a amostra é monodispersa, enquanto que, valores próximos de um indicam uma amostra polidispersa. Esta grandeza encontra-se normalmente relacionada com a composição química do polímero utilizado na formulação. As cadeias hidrofílicas dos copolímeros, PEO, tem tendência em se agrupar em solução aquosa, levando à formação de agregados de grande diâmetro, termodinamicamente reversíveis (97). Perante o exposto, e devido à coexistência de aglomerados de micelas na nossa formulação era espectável que o IP fosse elevado.

Quanto ao potencial zeta não se verificaram diferenças significativas entre as formulações, tendo um valor médio de -0,48 mV. A incorporação do Ptx no nanossistema levou a uma ligeira redução da carga de superfície das partículas. Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura, onde cargas superficiais ligeiramente negativas são descritas por contribuírem na captação celular e diminuir as interações inespecíficas com a membrana celular. O aumento do valor da carga superficial resulta na eliminação dos nanossistemas pelos macrófagos, reduzindo a difusão do sistema para as células-alvo (99).

3.1.3. Caracterização morfológica das micelas

A morfologia das micelas foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão, TEM. As fotomicrografias representativas das micelas Mic-1, Mic-2, Mic-3 e Mic-Ptx, encontram-se representadas na Figura 13.

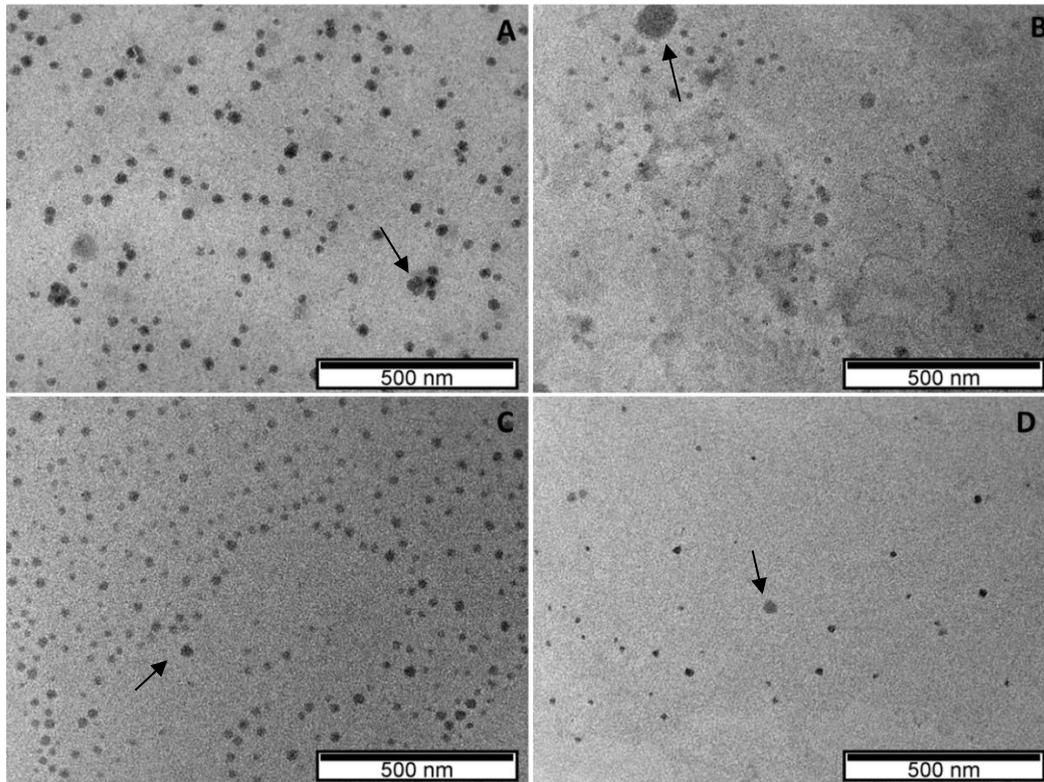


Figura 13 - Imagens obtidas por TEM das micelas poliméricas de Pluronic® F127, com e sem a incorporação do fármaco, Mic-1 (A), Mic-2 (B), Mic-3 (C) e Mic-Ptx (D).

Perante os resultados obtidos, foi possível evidenciar a presença de partículas esféricas de reduzidas dimensões, como a coexistência de aglomerados de grandes dimensões (Fig. 13, B). Estes resultados estão em concordância com os descritos anteriormente na determinação do diâmetro médio da partícula por dispersão dinâmica de luz.

3.1.4. Eficácia de encapsulação

A eficácia de encapsulação, E.E., das micelas contendo Ptx foi determinada após a preparação das formulações, tendo os resultados obtidos demonstrado uma E.E. superior a 100%. A Tabela 3, apresenta a concentração teórica encapsulada versus a concentração quantificada.

Tabela 3 – Eficácia de encapsulação das formulações Mic-Ptx1 e Mix-Ptx2. Resultados são expressos em média ($p > 0,05$).

Formulação	Concentração teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração real ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Mic-Ptx1</i>	10	11
<i>Mic-Ptx2</i>	80	134

Perante os resultados é possível verificar que a concentração quantificada é superior à teórica, isto poderá ter três explicações possíveis:

- ✓ a presença de aglomerados na amostra recolhida para análise, levou a uma maior concentração de Ptx;
- ✓ a heterogeneidade da amostra, comprovada pelo IP acima de 0.5;
- ✓ a possível evaporação do solvente orgânico que constitui a solução stock do Ptx dissolvido durante a preparação, resultando numa maior concentração de Ptx relativamente à concentração inicial.

3.1.5. Estabilidade

Durante 6 meses a formulação das Mic de concentração de Pluronic® F127 1,5 mg/ml, manteve-se com aspeto homogéneo e incolor, nas condições de conservação.

O tamanho médio e respetiva distribuição de tamanhos, como o potencial zeta foi determinado ao fim de 1 e 6 meses de armazenamento, Tabela 4.

Tabela 4 – Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta determinado para a Mic-3 após 1 e 6 meses de armazenamento à temperatura ambiente protegido da luz. Os resultados são expressos em média \pm DP.

Formulação	Tempo de armazenamento (meses)	Diâmetro (nm)	IP	Potencial ζ (mV)
<i>Mic-3</i>	0	7,41 \pm 1,8	0,50	-0,67 \pm 4,25
	1	6,97 \pm 1,8	0,48	-0,69 \pm 3,29
	6	6,26 \pm 1,5	0,53	-0,35 \pm 4,11

Perante a análise dos mesmo verificou-se que o sistema se manteve estável nas propriedades físicas, respetivamente no diâmetro médio e carga de superfície.

Estudos preliminares, para a avaliação da estabilidade física das micelas foram realizados. Tendo como objetivo a incorporação deste numa forma gel (enema), procedeu-se à sua diluição num solvente aquoso na razão de 1:1, e determinou-se a estabilidade física, diâmetro médio e potencial zeta das micelas. Os resultados após diluição demonstraram que a diluição do sistema

num meio aquoso leva à sua destabilização. O diâmetro médio variou entre 312 e 427 nm e o potencial zeta entre -28,0 e -28,6 mv. O problema relativamente ao IP manteve-se, tendo ocorrido um agravamento deste parâmetro, permitindo assim aferir que estamos presentes à formação de agregados. Perante estes resultados podemos aferir que ocorreu uma desorganização/reorganização na estrutura das micelas na presença de maior volume de solvente aquoso.

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos da determinação do teor de Ptx no interior das micelas após 1 mês de armazenamento.

Tabela 5 - Eficácia de encapsulação da formulação Mix-Ptx2 após 1 mês de armazenamento à temperatura ambiente protegido da luz. Os resultados são expressos em média ($p > 0,05$).

Formulação	Concentração teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração real ($\mu\text{g/ml}$)	
		5 dias	1 mês
Mic-Ptx2	80	134	150

Paralelamente, os dados experimentais relativamente às concentrações de Ptx encapsulado ao longo do tempo apresentaram valores similares ($p > 0,05$). Este resultado reforça a hipótese de estarmos perante fenómenos de agregação porque não provocam a perda de fármaco encapsulado.

4. Conclusões

O desenvolvimento de sistemas particulados para a encapsulação de fármacos tem como objetivo obter sistemas eficientes e de liberação controlada, onde parâmetros como o diâmetro, carga de superfície e eficácia de encapsulação devem ser determinados.

Micelas poliméricas de Pluronic® F127 contendo Ptx foram obtidas pelo método de evaporação do solvente. A incorporação do Ptx nas micelas não afetou o diâmetro médio das partículas. Foram obtidas micelas esféricas com carga elétrica de -0,48 mV e tamanho médio entre 15 e 7 nm para micelas vazias e 72,4 nm para micelas com o Ptx encapsulado. Relativamente à eficácia de encapsulação obteve-se valores de 100% de incorporação.

Face à análise dos resultados obtidos das formulações micelares, concluiu-se que o sistema é estável em suspensão devido à sua carga de superfície, como também, possui características que lhe permitem um maior tempo de circulação. Relativamente à sua ordem de grandeza, estas apresentaram tamanhos inferiores ao intervalo de diâmetro médio definido como vantajoso no tratamento do cancro, 10 a 100 nm. O limite inferior é definido tendo em consideração o coeficiente de eliminação de primeira passagem pelos rins (99).

Em termos de estabilidade físico-química podemos concluir que as formulações em estudo foram estáveis no período de 1 mês de armazenamento à temperatura ambiente, se mantidas as condições de micelização.

Perante os resultados obtidos, pretende-se futuramente aumentar a carga de encapsulação do Ptx para obter um menor volume de formulação a administrar, visto o nosso objetivo ser a aplicação da formulação via retal e esta apresentar como limitação um volume de líquido retal entre 1 e 3 ml (100). Como também, diminuir a heterogeneidade do sistema, por exemplo aumentar ligeiramente a sua carga de superfície, pois a agregação é comumente associada à cargas neutras, tendo este fator influência na captação celular e tráfego intracelular (101).

Capítulo 3

Desenvolvimento do método analítico para o doseamento do Paclitaxel

1. Introdução

A escolha criteriosa e fundamentada de uma metodologia analítica adequada é de elevada importância para proceder ao controlo de qualidade de uma formulação farmacêutica, em fase de desenvolvimento, como na fase de produto final.

Na sequência desta necessidade de controlo da qualidade surge o conceito de validação do método analítico. De modo a garantir que o mesmo forneça uma análise segura com resultados fiáveis.

A validação de um processo analítico consiste em assegurar dentro de uma gama de concentrações onde o produto é analisado, que o método é específico, exato, reprodutível, preciso e robusto. Sendo esta validação a confirmação formal de que o método utilizado na formulação para análise do produto, sucede como previsto previamente, ao estabelecer os métodos de produção e controle. Este, é um aspeto muito importante, não apenas por questões regulamentares, mas para certificar a sua aplicação eficiente e reprodutível. A exatidão e fiabilidade dos resultados analíticos são determinantes para assegurar a qualidade, segurança e eficácia das formulações farmacêuticas (95, 102).

A validação do método analítico deve estar de acordo com as linhas orientadoras “ICH: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)”. Estas linhas descrevem os parâmetros exigidos para a validação de um método analítico, baseando-se no princípio de que cada método deve seguir um conjunto específico de parâmetros para ser validado, como apresenta a seguinte tabela (95).

Tabela 6 - Parâmetros necessários para a validação de um método analítico (95).

Características	Identificação	Impurezas		Doseamento
		Quantificação	Limite	
Exatidão	-	+	-	+
Precisão				
Repetibilidade	-	+	-	+
Precisão Intermédia	-	+ ³	-	+ ⁴
Especificidade	+	+	+	+
Limite de Detecção	-	- ⁵	+	-
Limite de Quantificação	-	+	-	-
Linearidade	-	+	-	+
Amplitude	-	+	-	+

- Característica normalmente não avaliada;

+Característica normalmente avaliada;

³ Nos casos onde a reprodutibilidade é realizada, não é necessário realizar a precisão intermedia;

⁴ O parâmetro de especificidade de um método pode ser compensado por outros métodos analíticos;

⁵ Pode ser necessário em alguns casos.

O método escolhido para realizar o ensaio de doseamento do PTX foi a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A cromatografia é um método físico-químico de separação de substâncias químicas, pela migração diferencial dos componentes presentes numa matriz, devido à diferente interação entre as duas fases imiscíveis da técnica. A fase estacionária que possui em regra uma grande área superficial, pode ser um sólido ou líquido covalentemente ligado a partículas sólidas ou às paredes de uma coluna capilar oca, e a fase móvel, fluido que se move através da fase estacionária, podendo ser um líquido ou um gás (103).

Nesta técnica a fase móvel migra ao longo da fase estacionária por ação da capilaridade, denominando-se a este processo por corrida cromatográfica. Como tal, a separação dos diferentes analitos deve-se às diferentes interações com a fase estacionária, resultando num arrastamento com velocidades diferentes, permitindo assim a separação dos diferentes componentes de uma amostra, e respetiva identificação.

As interações que ocorrem ao longo da coluna cromatografia podem ser classificadas como interação de partição, adsorção, exclusão ou troca iónica, devendo-se esta classificação aos diferentes tipos de enchimento da fase estacionária, pelo que a sua seleção deve ser criteriosa, pois a mesma tem influência sobre o método de separação, podendo interferir negativamente na seletividade e eficiência do processo (103).

Em HPLC usam-se colunas fechadas sobre pressões elevadas, onde a separação do analito pode ser em fase normal ou reversa, segundo a polaridade das fases de separação do sistema. Na primeira, fase normal, a fase móvel é apolar e a estacionária polar (enchimento composto em regra por sílica), onde os analitos polares ficam retidos na coluna e os menos polares, como apresentam uma maior afinidade para a fase móvel são eluídos mais rapidamente da coluna cromatográfica. Por sua vez, na fase reversa, a fase móvel é polar e a estacionária apolar (sílica modificada quimicamente com cadeias de hidrocarbonetos, denominadas por colunas C8 e C18, dependendo do número de hidrocarbonetos acoplados), ficando retidos ao longo da coluna os analitos mais apolares. Após saírem da coluna, os analitos são identificados por um detetor que deve ser sensível para detetar as diferentes variações de sinal associadas às diferentes concentrações das substâncias químicas em análise. Os detetores devem possuir características, como a seletividade, alta sensibilidade, linearidade, e insensibilidade às variações de temperatura e fluxo. O detetor mais comumente utilizado em HPLC é o de UV/Vis, este consiste num fotómetro que mede a absorção de luz pelos analitos em determinado comprimento de onda, na região visível e ultravioleta.

O princípio de detecção baseia-se na Lei de Lambert-Beer, onde a concentração da substância é relacionada com a fração de luz transmitida (103-105).

$$A = l \times c \times \varepsilon \quad (\text{Equação 3})$$

em que, A é a absorvância, l o percurso ótico percorrido pelo feixe ao longo da amostra, c a concentração analítica da substância absorvente na amostra e, ε coeficiente de absorção molar do analito (constante).

A validação do método analítico teve como objetivo demonstrar que a técnica era adequada para o doseamento do Ptx na formulação desenvolvida, tendo sido realizada a mesma de acordo com as recomendações da linha orientadora "ICH: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) (2005)", para os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão e exatidão definidas para o ensaio em causa.

2. Material e Métodos

2.1. Materiais

O Ptx, o metanol, e a água ultrapura foram obtidos como descrito anteriormente, no Capítulo 2. O acetonitrilo da classe de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foi da VWR® CHEMICALS (Merck, Alemanha).

2.2. Métodos

Para o doseamento do Ptx, recorreu-se à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa. Atualmente, existem diversos métodos analíticos descritos na literatura para o doseamento do Ptx recorrendo ao HPLC (106-109).

No desenvolvimento do nosso método analítico teve-se como referência o método descrito na Farmacopeia Portuguesa e a Dissertação de Doutoramento da Prof.^a Mafalda Videira (24, 43, 110, 111).

Preparação da solução *standard*

A solução *standard* de Ptx foi preparada em acetonitrilo e armazenada em um frasco revestido com papel de alumínio a 4-6°C. As diluições obtiveram-se pela diluição de determinado volume da solução *standard* em acetonitrilo no intervalo de concentrações entre os 0.5 - 80µg/mL.

Condições cromatográficas

O método analítico foi desenvolvido no sistema HPLC Hitachi LaCrom, constituído por um forno de coluna (Modelo L2300), detetor UV/Vis (Modelo L2455), bomba (Modelo L2130) e um injetor (Modelo L2200). A fase móvel foi consistiu numa mistura de acetonitrilo e água ultrapura na razão de 55:45, tendo sido previamente filtrada em filtro de seringa de 0.22µm e degaseificada recorrendo ao banho de ultrassons durante 10 minutos, antes da respetiva corrida. A fase estacionária foi uma coluna Nova-Pack C-18 (diâmetro das partículas internas: 4 µm; dimensões: 3,9 x 150 mm; Waters).

Todas as corridas realizadas no HPLC foram em modo isocrático. O volume de injeção foi de 20 µl com uma taxa de fluxo de 1,2 ml/min. A temperatura da coluna foi mantida a 25°C e a eluição foi monitorizada a 227 nm utilizando um detetor de diodo.

Os dados cromatográficos foram adquiridos e processados com o software Agilent EZChrom Elite version 3.3.2 SP2.

2.2.1. Especificidade

A especificidade é o parâmetro que avalia a capacidade do método analítico em detetar de forma inequívoca e analítica a presença do analito de interesse na presença de outros componentes da matriz, tal como, produtos de degradação, impurezas, excipientes, etc. Este constitui o primeiro passo no desenvolvimento e validação de qualquer método, devendo ser reavaliado continuamente durante a validação e subsequentemente durante a aplicação do método, de modo a avaliar a exclusividade do método para a substância química em estudo (95, 112, 113).

Protocolo experimental

Injetou-se uma solução de fase móvel, de solvente, metanol, uma solução padrão de Ptx de concentração conhecida, uma solução de trabalho, Ptx encapsulado nas micelas com respetiva degradação do sistema, e uma solução de matriz, micelas vazias respetivamente. Com a finalidade, de verificar a inexistência de interferência no pico de absorvência máximo do Ptx, 227 nm, por parte do solvente e matriz usada.

2.2.2. Linearidade

A linearidade é o parâmetro que determina a capacidade do método em fornecer, dentro de determinada gama de concentrações pré-definidas, resultados diretamente proporcionais à concentração da substância química na amostra. Devendo ocorrer uma correlação linear entre a gama de concentrações e os valores do sinal do pico do cromatograma do analito em estudo (95, 112, 113).

Este parâmetro deve incluir as seguintes etapas:

- ✓ garantir que o intervalo linear definido abrange as concentrações a determinar;
- ✓ usar uma gama de padrões de concentrações crescentes, tendo no mínimo cinco concentrações diferentes;
- ✓ aplicar o método matemático da regressão linear, para determinar a curva de calibração que relaciona a concentração do padrão com a sua respetiva resposta (sinal do pico do cromatograma), segundo a equação da reta,

$$y = m \cdot x + b \quad \text{(Equação 4)}$$

onde y representa a absorvência, o sinal do pico, m o declive da curva e b o ponto de interseção na origem, quando o valor de concentração, x , for nulo.

No tratamento estatístico dos resultados o coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de determinação (r^2) é de extrema importância, pois refletem o grau de relação entre a concentração do analito e o sinal do pico obtido. O que nos permite aferir sobre a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo o valor de r^2 for de 1,0, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais, logo menor é a incerteza dos coeficientes estimados. Sendo recomendado um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,995, de modo a garantir a linearidade do método (95, 112, 113).

Protocolo experimental

Preparou-se uma solução-mãe de Ptx com a concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ em metanol.

Posteriormente preparam-se 14 soluções padrão da solução-mãe, obtendo-se as seguintes concentrações: 0,5 - 80 $\mu\text{g/mL}$.

As soluções padrão foram injetadas em triplicado, aleatoriamente.

2.2.3. Precisão

A precisão pode ser definida como a determinação do grau de desvio presente numa série de medições obtidas a partir de diferentes amostras retiradas de uma amostra uniforme do produto (95).

Este parâmetro permite avaliar a repetibilidade (precisão intra-dia) onde o método é efetuado nas mesmas condições (mesmo procedimento, analista, equipamento) sobre uma amostra, pela injeção de várias amostras de concentração conhecida, repetibilidade do ensaio, ou injeção da mesma amostra várias vezes, repetibilidade do sistema, num curto intervalo de tempo. Como também, a precisão intermédia (precisão inter-dia) onde a mesma é avaliada em condições diferentes sobre uma amostra, mantendo-se o procedimento e, alterando-se um de três parâmetros: o dia do ensaio, o analista ou o equipamento (95, 112, 113).

Protocolo experimental

Para o estudo de repetibilidade, foram realizadas 3 determinações da solução padrão de Ptx com as concentrações de 5, 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$.

A precisão intermédia foi efetuada com 9 determinações com a solução padrão de Ptx com 5, 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$, obtidas em três dias consecutivos.

2.2.4. Exatidão

A exatidão de um método traduz a proximidade dos valores obtidos experimentalmente em relação ao valor teórico. Sendo este válido apenas no intervalo de concentrações da gama de trabalho. O procedimento baseia-se na preparação de amostras de três concentrações padrão conhecidas diferentes (baixa, média e alta), com a respetiva injeção em triplicado. Após a análise é determinada a % de recuperação da amostra, devendo ser em média de $100 \pm 2\%$ (95, 112, 113).

Protocolo experimental

Para avaliar a exatidão utilizou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente para a linearidade nas concentrações de 5, 20 e 60 $\mu\text{g/ml}$.

2.2.5. Determinação do limite de deteção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de deteção (LD) refere-se ao teor mínimo a partir do qual é possível detetar a presença do analito, mas não necessariamente quantificado como valor exato.

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração medida a partir do qual é possível a quantificação da substância química em estudo, com precisão e exatidão. Normalmente, corresponde ao padrão de menor concentração usado ao longo do método.

Estes parâmetros foram determinados segundo as equações:

$$LD = 3 \times DP \quad LQ = 10 \times DP \quad (\text{Equações 5 e 6})$$

onde DP representa o desvio padrão determinado pelo desvio padrão residual e o declive da equação da reta.

3. Resultados e Discussão

3.1. Especificidade

Para critérios de aceitação presença de picos no solvente, fase móvel ou componentes presentes na matriz da formulação não devem interferir com o pico do Ptx.

A leitura da solução padrão de Ptx a 20 µg/ml, apresentou um pico de absorção máxima a 227 nm, valor que vai de encontro com o descrito na literatura. O mesmo foi detetado sem alterações, na solução de trabalho Mic-Ptx.

As análises da solução de solvente, da matriz e da fase móvel, não apresentaram qualquer sinal (pico) no comprimento de onda de absorção do Ptx. Concluindo-se que estes compostos não interferem na análise do pico do Ptx, cumprindo os critérios de aceitação para o parâmetro da especificidade do método.

Nas Figuras 14 a 18, encontram-se representados os cromatogramas das soluções analisadas, onde podemos confirmar a especificidade do método desenvolvido.

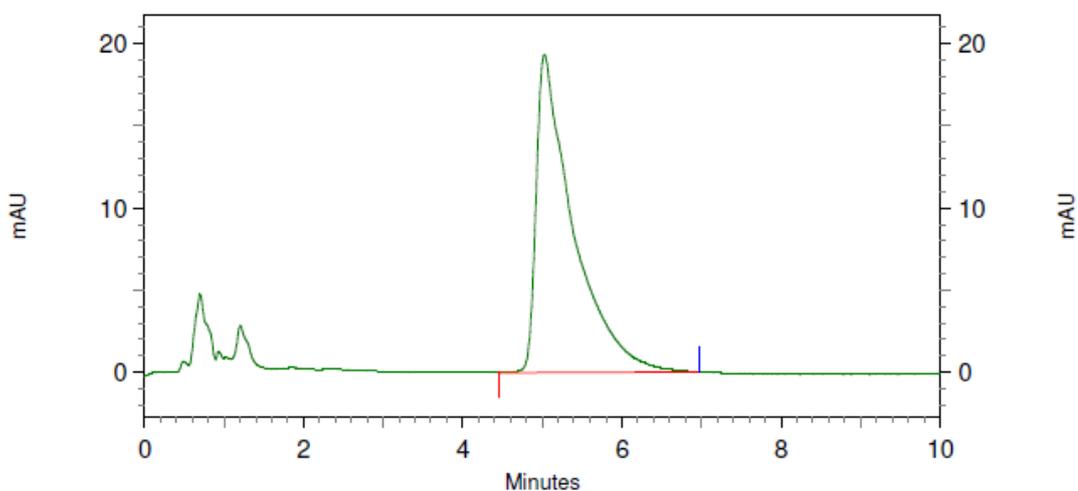


Figura 14 - Cromatograma da solução padrão de Ptx a 20 µg/ml.

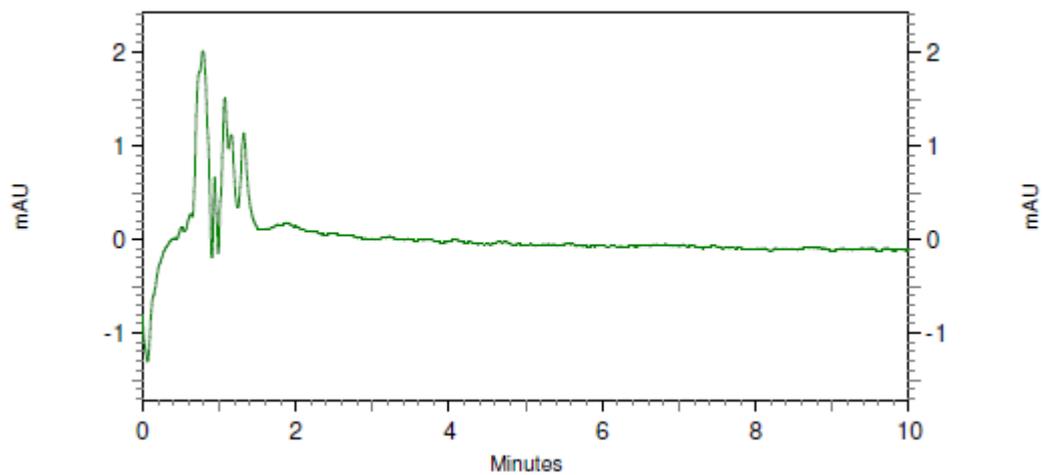


Figura 15 - Cromatograma da solução de solvente, metanol.

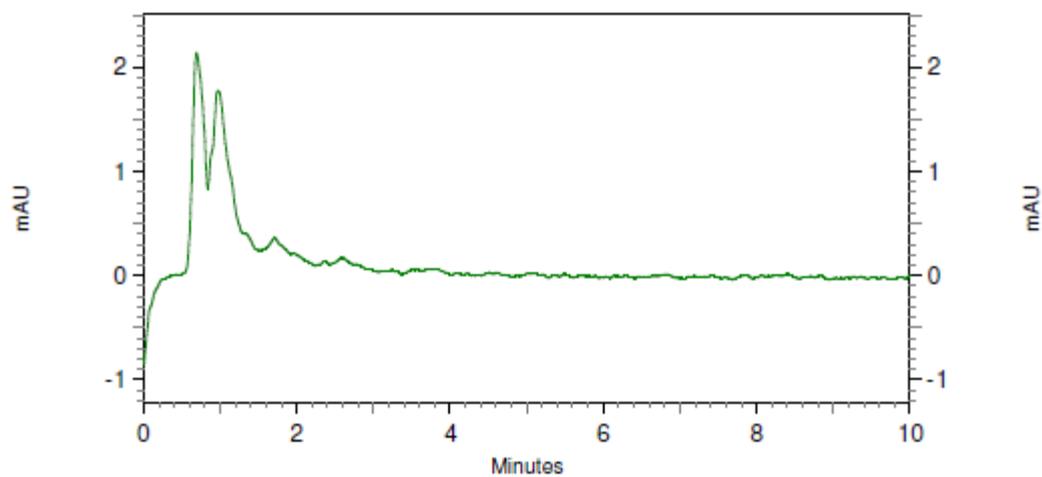


Figura 16 - Cromatograma da solução da matriz, micelas vazias.

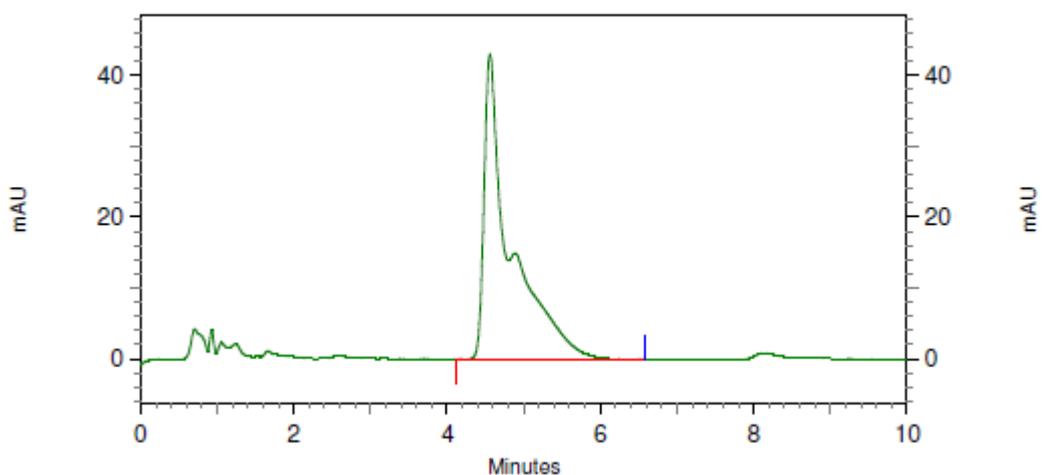


Figura 17 - Cromatograma da solução de trabalho, micelas com Ptx a 80 µg/ml (Mic-Ptx2).

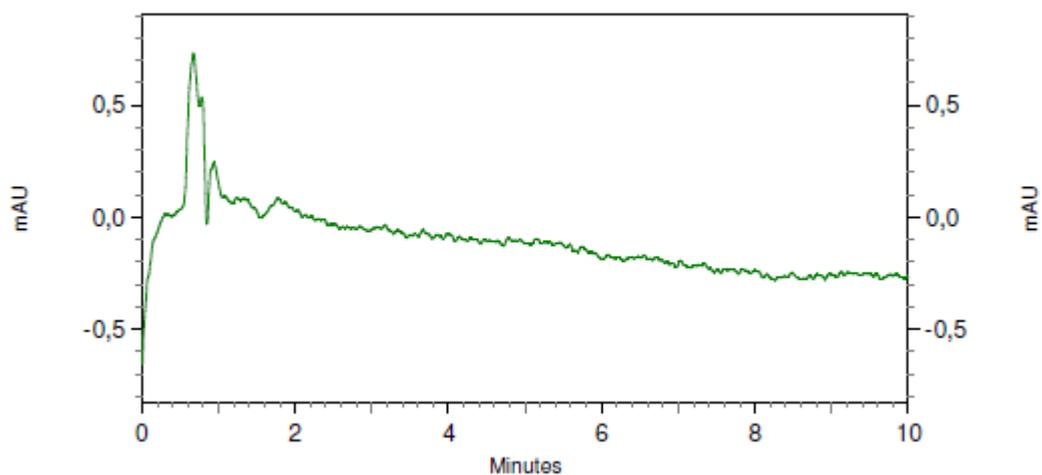


Figura 18 - Cromatograma da solução da fase móvel.

3.2. Linearidade

A linearidade é o parâmetro que relaciona a proporcionalidade entre a concentração teórica da amostra com o detetado. Este possui como critérios de aceitação um coeficiente de correlação $r \geq 0,995$.

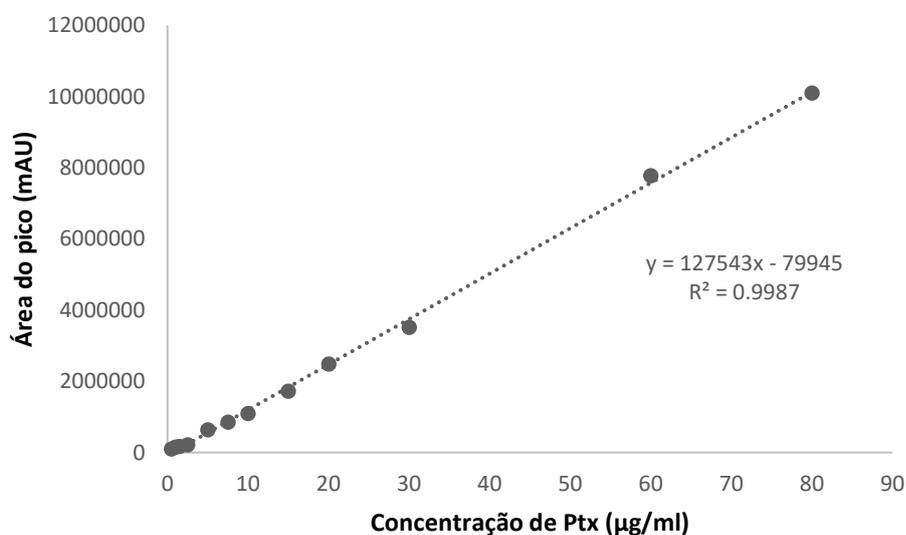


Figura 19 - Curva de Calibração da linearidade do método de doseamento do Ptx.

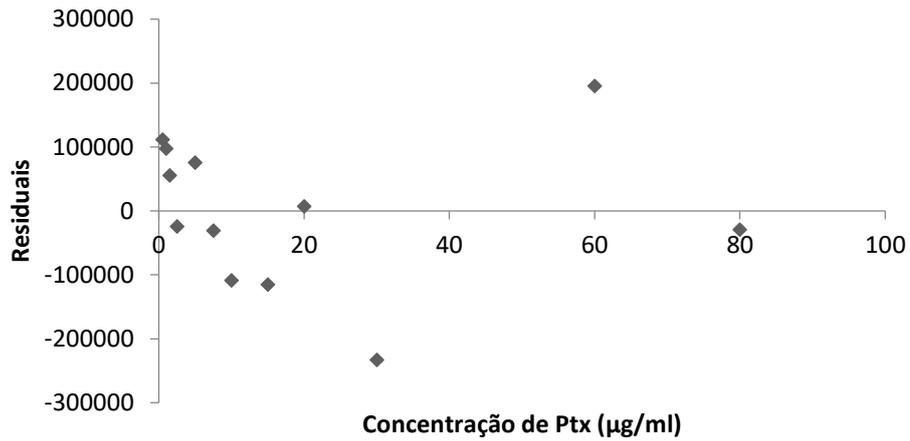


Figura 20 - Distribuição de resíduos da linearidade do método de doseamento do Ptx.

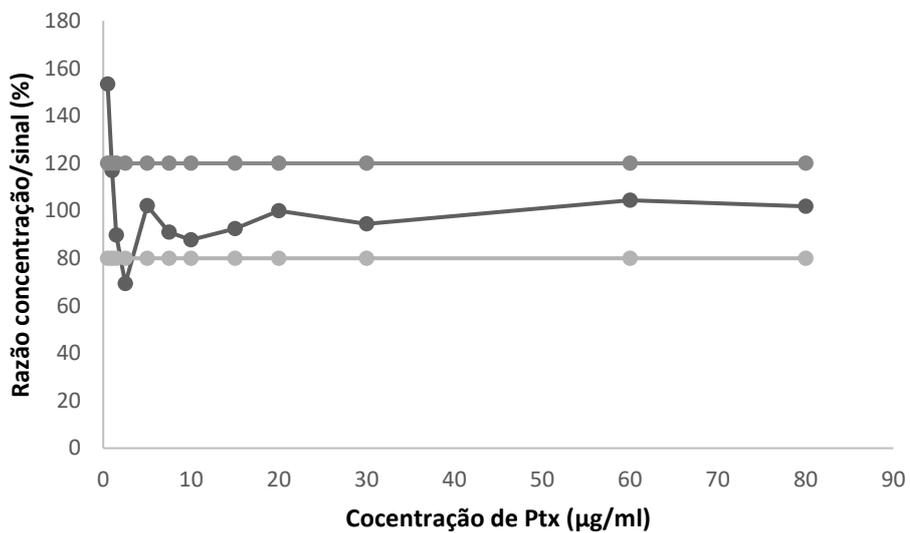


Figura 21 - Análise do teste de Rikilt em percentagem da linearidade do método de doseamento do Ptx.

Após o tratamento estatístico dos resultados podemos aferir que o método é linear para o Ptx a 227 nm. Este apresentou um coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,999 e, um coeficiente de correlação (r) de 0,999, tendo sido a soma do quadrado dos resíduos de 1,17.

3.3. Precisão

Para que um método analítico seja preciso, deve garantir um coeficiente da variação de repetibilidade $\leq 3\%$, e um coeficiente de variação de precisão intermédia de $\leq 4\%$.

Tabela 7 - Avaliação da repetibilidade e precisão intermédia do método de doseamento para a determinação do Ptx.

	Concentração teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração lida ($\mu\text{g/ml}$)	Repetibilidade CV (%)
Ptx	5	5,59	2,15
	10	9,15	0,47
	30	28,17	0,23

Os resultados obtidos apresentaram um CV inferior a 3% para a repetibilidade como para a precisão intermédia. Podendo-se concluir que o método é preciso em termos de repetibilidade e precisão intermédia.

3.4. Exatidão

Um método é exato apenas se a percentagem de recuperação for entre os 98 – 102% para todos os níveis de concentração.

Tabela 8 - Avaliação da exatidão do método de doseamento do Ptx.

	Concentração real ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração estimada ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperação (%)
Ptx	5	5,59	99,44
	20	20,05	99,73
	60	61,53	97,51

Pela análise dos resultados obtidos, verifica-se que a percentagem de recuperação se encontra dentro do intervalo descrito nas *guidelines* como critério de aceitação. Podendo afirmar que o mesmo é válido para este parâmetro no doseamento da substância ativa em análise,

3.5. Determinação do limite de deteção (LD) e quantificação (LQ)

Após o tratamento dos resultados obtidos, determinou-se o valor mínimo de deteção e quantificação, tendo-se obtido para LD um valor de 5,48 $\mu\text{g/ml}$, e de LQ 16,60 $\mu\text{g/ml}$.

4. Conclusões

Quando se realiza a determinação quantitativa de fármacos é necessário recorrer a métodos analíticos definidos e validados, de modo a obter resultados fidedignos. Assim, a obtenção de resultados que cumpram as especificações descritas nas linhas orientadoras constitui uma garantia de que o método é adequado para o fim pretendido.

O HPLC é um método analítico simples e fácil de executar. Este método apresentou-se eficaz relativamente ao doseamento do Ptx livre, como quando encapsulado em micelas. No que refere aos requisitos necessários para validar o ensaio, os resultados obtidos demonstraram que o método analítico utilizado cumpriu todos os requisitos de especificidade, linearidade, precisão e exatidão para a quantificação do fármaco usado ao longo deste estudo. Sendo por isso, considerado um método analítico viável para o doseamento do Ptx livre e encapsulado em micelas poliméricas.

Capítulo 4

Estudios *in vitro*

1. Introdução

Os nanossistemas como veículos para encapsular fármacos tem como objetivo não só permitir o direcionamento da substância para o alvo de interesse, como também, facilitar a sua internalização no tecidos e/ou células alvo, de modo a diminuir a dose terapêutica, bem como, os efeitos adversos associados à administração com doses elevadas e frequentes. Contudo, a sua internalização no interior das células e o seu percurso no interior da mesma é ainda hoje em dia um parâmetro difícil de estudar e de certo modo pouco descrito na literatura (114).

Como descrito anteriormente, todas as formulações provenientes de determinado sistema de entrega possuem características físico-químicas únicas e, dependendo da via de administração escolhida, influenciará as propriedades farmacológicas e toxicológicas (77). Sendo estas diferentes aquando da administração do fármaco livre.

Assim, surge a área da nanotoxicologia, que tem com o objetivo estabelecer protocolos rigorosos para a caracterização das formulações desenvolvidas, tendo em conta as propriedades referentes ao sistema, de forma a antever o comportamento do mesmo quando em contacto com o organismo como (115, 116):

- ✓ a formação de agregados que induzem a inflamações;
- ✓ a estabilidade desde a administração até atingir o local-alvo;
- ✓ a atividade biológica, ou seja, a sua interação quando em contacto com tecidos e células alvo.

Esta área tem como finalidade realizar estudos de toxicidade e citotoxicidade, de forma a tornar o protocolo padronizado e validado (117).

Atualmente, encontram-se descritas várias metodologias para a avaliação da toxicidade dos nanossistemas no organismo. Estas podem ser divididas em *in vivo* e *in vitro*, no nosso caso iremos apenas debruçar-nos sobre a citotoxicidade *in vitro*. As vantagens da avaliação da toxicidade *in vitro* são inúmeras, podendo destacar-se o baixo custo e as preocupações éticas reduzidas e de baixo impacto. As metodologias utilizadas para os estudos *in vitro* subdividem-se em ensaios de proliferação celular, ensaios de apoptose e necrose, ensaios de stress oxidativo e avaliação de danos no DNA (117).

Dentre os mecanismos mais comuns de citotoxicidade provenientes da interação e internalização dos nanossistemas, destacam-se (118, 119):

- ✓ lesão da membrana celular e citoesqueleto das células;
- ✓ interação na transcrição, o que leva a alterações do DNA e consequentemente a mutações;
- ✓ ação sobre as mitocôndrias, alterando o seu metabolismo, resultando num desequilíbrio energético celular;
- ✓ a formação de espécies reativas de oxigénio;

- ✓ alteração da estrutura das proteínas transmembranares, o que irá influenciar no transporte de substâncias entre o meio intra e extracelular.

Não devemos esquecer que os nanossistemas podem ser internalizados por difusão, endocitose, dependente de claterina e independente de claterina (mediada por caveolina), fagocitose ou pinocitose (118).

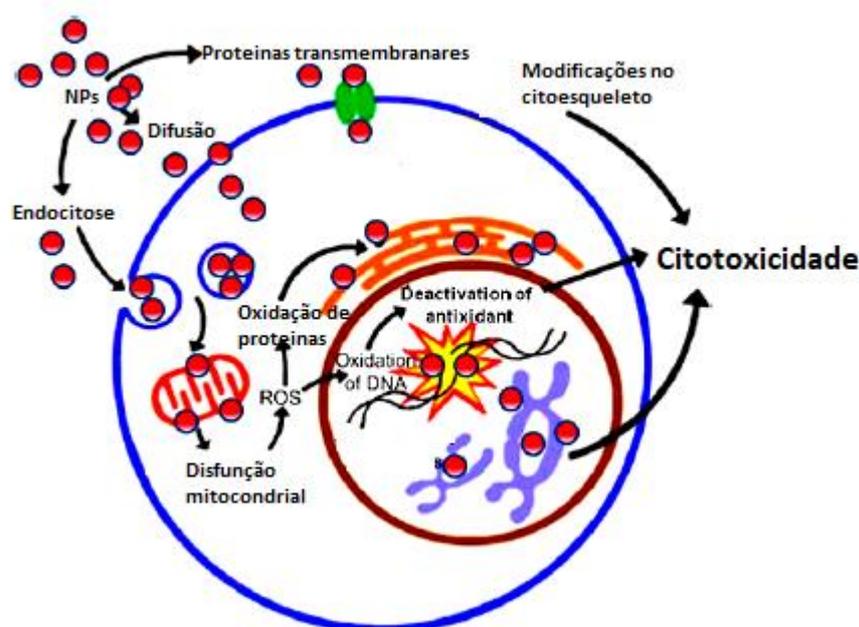


Figura 22 - Ilustração das diferentes vias de internalização dos nanossistemas e respectivos mecanismos de ação. Adaptado de Ajdary *et al.* (2018) (118).

No desenvolvimento de uma formulação, após a caracterização físico-química do nanossistema, torna-se necessário proceder à avaliação do seu efeito *in vitro*, usando culturas primárias de células ou linhas celulares padronizadas, que se encontram disponíveis e caracterizadas (como tipo de cultura, modo de cultura, proveniência) na *American Type Culture Collection* ou ATCC. Estes estudos podem ser realizados com células fagocíticas, como macrófagos e células dendríticas, epiteliais, endoteliais, hepáticas, neuronais, entre outras, provenientes de linhas celulares tumorais. A escolha da mesma deve ter em consideração o tipo de atividade biológica e ensaio que se pretende efetuar (115, 118).

Os ensaios *in vitro* são de extrema relevância, pois permitem obter informações como dose, dimensões e eficiência do sistema desenvolvido, além de que, os ensaios de toxicidade/viabilidade celular e internalização celular permitem determinar o efeito terapêutico (13).

Contudo, estes estudos são limitantes pois devido a estes serem modelos 2D em monocultura, não permitem mimetizar um organismo. Pois neste contexto as células coexistem em tecidos, onde a comunicação celular e respetiva ativação/inativação de vias de sinalização é

um fator predominante em termos fisiológicos, situação que pode ser avaliada erradamente em uma cultura celular 2D. Dependendo da via de administração o tipo de barreiras biológicas que o sistema terá de ultrapassar serão diferentes, sendo necessário passar para estudos em co-cultura e *in vivo* após a aprovação do sistema nos estudos *in vitro* (13).

Deste modo, após a caracterização físico-química do nosso sistema, procedeu-se à avaliação da citotoxicidade recorrendo a ensaios *in vitro*. O modelo celular escolhido foi uma linha celular tumoral, a HCT 116 (ATCC® CCL-247™), a nossa escolha recaiu sobre esta linha devido à mesma reproduzir o modelo *in vitro* da patologia de interesse, o CRC. Esta é uma linha celular representativa do adenocarcinoma colo-rectal, resistente à apoptose quando mantida em meio de cultura suplementado com soro fetal, glutamina e antibiótico (120). Esta linha é assim definida como um modelo ortotópico do cancro colorretal humano, comumente usada para estudar a biologia desta patologia (121).

2. Material e Métodos

2.1. Materiais

O Ptx, o metanol, e a água ultrapura foram obtidos como descrito anteriormente, no Capítulo 2. O DPBS, o soro fetal bovino e a penicilina-estreptomicina foram obtidos da biowest® (Nuaillé, France). O DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), a tripsina-EDTA e a ultraglutamina-1 foram obtidos da Biowhittaker® (Lonza, Suíça). O kit de detecção de Apoptose por FITC e o 5-([4,6-DICHLOROTRIAZIN-2-yl]amino)fluorecein hydrichloride (5-DTAF) foram adquiridos da Sigma Life Science (Sigma-Aldrich, EUA). O 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) foi da AMERESCO. O Dimetilsulfóxido (DMSO) e o Dimetilformamida (DMF) foram da VWR® CHEMICALS (Merck, Alemanha)

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação e caracterização das micelas poliméricas marcadas

O sucesso de uma formulação de sistemas de veiculação e entrega de fármacos, além das suas propriedades físico-químicas, depende da via de internalização utilizada para a entrega da substância ativa. Para que seja possível verificar a sua internalização é necessário recorrer a marcação da matriz ou do fármaco com um fluoróforo, molécula fluorescente usada comumente para este tipo de ensaios, esta molécula normalmente possui um grupo funcional que absorverá energia num determinado comprimento de onde e, posteriormente emitirá noutro comprimento de onda maior, sendo assim possível visualizar a sua localização no meio envolvente. No nosso estudo, optou-se por marcar a matriz, ou seja, o Pluronic® F127 com o fluoróforo 5-DTAF, (5-(4,6-diclorotriazina)aminofluoresceína), que possui comprimentos de onda de absorção e emissão máximos na ordem dos 492/516 nm, respetivamente. Os grupos diclorotriazinas da molécula 5-DTAF reage com os grupos amina e grupos reativos, como álcoois, presentes nas moléculas a marcar, em solução aquosa com um pH superior a 9 (122).

Protocolo experimental

A marcação do polímero com o 5-DTAF foi realizada na razão molar final de 1:2 (polímero:DTAF), tendo como base a metodologia descrita por Neelamegham *et al.*, 2001 (123). Primeiro preparou-se uma solução stock de 5-DTAF em DMF numa concentração de 20 mg/ml. Esta solução foi diluída posteriormente, em outra solução de 0,1 M de bicarbonato de sódio a pH 9,3. O polímero foi também diluído na mesma solução de bicarbonato de sódio numa

concentração a 6% (p/v). Ambas as soluções foram misturadas e deixadas a reagir durante a noite à temperatura ambiente. Para a eliminação do fluoróforo que se ligou ao polímero, recorreu-se à diálise por membrana, em água ultrapura.

Depois da diálise, o polímero marcado foi transferido para um balão de diluição de fundo redondo e foram adicionados 5 ml de metanol, o procedimento realizado foi o mesmo descrito no capítulo 2, para a obtenção das micelas pelo método da evaporação do solvente, também conhecido como o método da hidratação do filme.

2.2.2. Linha celular e condições de cultura

Como já referido a linha celular utilizada no nosso estudo foi a linha HCT-116, linha epitelial aderente do carcinoma colorretal. A linha celular foi cultivada a uma temperatura de 37°C, em um ambiente atmosférico de 5% de CO₂, em DMEM, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), 1% (v/v) de penicilina-estreptomicina e 1% (v/v) de ultra-glutamina.

2.2.3. Avaliação da citotoxicidade e determinação do IC50

Para determinar a citotoxicidade do sistema desenvolvido, recorreu-se a um ensaio que avalia a viabilidade e proliferação celular, o método colorimétrico (MTT) desenvolvido por Mosmann em 1983 (124). Este ensaio utiliza um sal de tetrazólio (de cor amarela e solúvel em água), que é convertido em cristais de formazan (de cor púrpura e insolúveis) pelas células metabolicamente ativas, devido à sua ação da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Estes cristais são posteriormente dissolvidos num solvente orgânico e, a absorbância é medida a 570 nm e convertida em percentagem de células vivas (124).

A percentagem da viabilidade celular foi expressa tendo como referência as células controlo, equação 5:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{Valor experimental}}{\text{Controlo positivo}} \times 100 \quad (\text{equação 7})$$

Este ensaio permite determinar o IC50 da formulação desenvolvida, isto é, a concentração de fármaco que tem metade do seu efeito terapêutico máximo em determinadas condições de exposição, como tempo e dose (117).

Protocolo experimental de uniformidade de massa

Cerca de 10.000 células foram semeadas em placas de 96 poços, com meio DMEM suplementado e incubadas a 37°C com uma humidade relativa de 95% e atmosfera de 5% de

CO₂, e deixadas a aderir durante a noite. Após a respetiva aderência, as células foram incubadas com diferentes volumes/doses de Ptx livre e Ptx encapsulado, concentrações entre os 10 e 0,01µM, durante 24, 48 e 72h.

Após a incubação, foi adicionado 20 µl de MTT e incubou-se durante entre 3h-4h nas condições já referidas. Por fim, aspirou-se o conteúdo dos poços e adicionou-se 150 µl de DMSO, de modo a ocorrer a disrupção da membrana celular e dissolução dos cristais formados. A absorbância foi lida num espectrofotómetro a 570 nm.

Os resultados foram expressos em termos de média ± desvio padrão.

2.2.4. Determinação do tipo de morte celular

A apoptose é um dos principais mecanismos avaliados *in vitro* na citotoxicidade de partículas. A geração excessiva de radicais livres e danos no DNA são considerados causas de morte celular provocada por sistemas particulados (117).

A apoptose pode ser definida como a morte celular programada, responsável pela homeostasia celular. Ela caracteriza-se por alterações morfológicas específicas na composição da membrana celular, pela translocação e exposição da fosfatidilserina (PS) no folheto extramembranar. Este processo é regulado por proteínas específicas, as caspases, por sinalização de fatores externos, ou pela libertação de fatores pro-apoptóticos pela mitocôndria, proveniente de mecanismos internos. Outro mecanismo de morte celular é a necrose, esta caracteriza-se por danos externos da membrana plasmática com disrupção dos organelos intracelulares e núcleo (2).

Para a avaliação do tipo de morte celular recorreu-se ao método da Anexina-V/PI. A anexina-V e o iodeto de propídeo (PI) são marcadores típicos de morte celular usados na avaliação da toxicidade celular. A anexina-V liga-se à fosfatidilserina quando esta é exposta no folheto externo da membrana celular. Enquanto que o PI é um corante impermeável que marca o núcleo quando a integridade do mesmo se encontra perdida. Assim, a marcação apenas com a anexina-V indica morte celular por apoptose, enquanto que, a marcação com PI é referente à morte por necrose (117, 125).

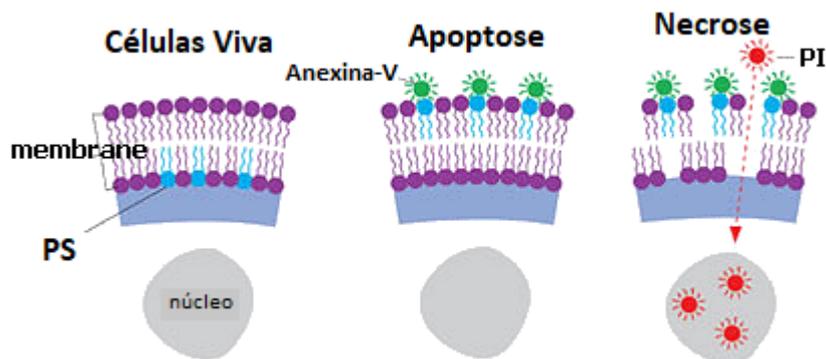


Figura 23 - Esquema ilustrativo da marcação com anexina-V e iodeto de propídeo (PI), para a determinação do tipo de morte celular por apoptose ou necrose, respectivamente (126).

Protocolo experimental

Cerca de 50.000 células foram semeadas em placas de 96 poços, com meio DMEM suplementado e incubadas a 37°C com uma humidade relativa de 95% e atmosfera de 5% de CO₂, e deixadas a aderir durante a noite. Após a respetiva aderência, as células foram incubadas com formulação de Ptx livre e Ptx encapsulado, na concentração de 10 µM, durante 24h. Após a incubação procedeu-se à marcação das células com a anexina-V e o PI.

O kit utilizado disponibiliza um protocolo para a utilização do mesmo para células em suspensão. Sendo a nossa linha de estudo uma linha aderente, para que as mesmas ficassem em suspensão, recorreu-se a tripsinização das mesmas, com posterior centrifugação. Após obter a suspensão celular o protocolo seguindo foi o fornecido pelo fabricante do Kit em uso.

2.2.5. Internalização celular das micelas

A avaliação da via envolvida na internalização do fármaco é de extrema importância para antever a sua eficácia terapêutica. A literatura descreve diversas técnicas para este tipo de estudos, como, a microscopia confocal de fluorescência ou eletrónica que, recorrendo a sondas fluorescentes permitem visualizar a internalização celular após a incubação com o sistema em estudo. Para a avaliação qualitativa recorreu-se à microscopia confocal de fluorescência, enquanto que, para a avaliação quantitativa foi por espectroscopia UV/Vis.

Protocolo experimental

Cerca de 50.000 células foram semeadas em placas de 24 poços, com meio DMEM suplementado e incubadas a 37°C com uma humidade relativa de 95% e atmosfera de 5% de CO₂, e deixadas a aderir durante a noite. Após a respetiva aderência, as células foram incubadas com as micelas marcadas, na concentração de 5 µM, num intervalo entre 30 minutos a 24h.

Avaliação quantitativa

Após a incubação o meio foi aspirado e as células foram lavadas com DPBS. Tendo sido posteriormente permeabilizadas com uma solução de 0,5% (v/v) de Triton X-100 em hidróxido de sódio (NaOH), durante 30 min. A fluorescência foi medida num leitor de placas, com comprimento de onda de excitação de 492 nm e de emissão de 516 nm.

Avaliação qualitativa

Após a incubação o meio foi aspirado e as células foram lavadas com DPBS. Tendo sido posteriormente fixadas com uma solução a 4% (p/v) de paraformaldeído (PFA) e permeabilizadas com uma solução de 0,1% (v/v) de Triton X-100, durante 10 e 30 min respectivamente. O núcleo das mesmas foi marcado com DAPI durante 20 min, e para a visualização da membrana marcou-se com vimentina, durante a noite. As lamelas foram visualizadas por microscopia confocal de fluorescência.

3. Resultados e Discussão

3.1.1. Caracterização das micelas poliméricas marcadas

As micelas fluorescentes foram obtidas pelo método de evaporação do solvente, com a marcação do Pluronic® F127 com o fluroforo 5-DTAF (Mic-DTAF). Estas micelas foram preparadas para determinar quantitativamente e qualitativamente a internalização celular das partículas pelas HCT-116.

A dispersão das Mic-DTAF foi caracterizada nos parâmetros de diâmetro médio, IP e potencial zeta, encontrando-se os resultados obtidos na Tabela 9.

Tabela 9 - Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta (ζ) determinado para as micelas poliméricas marcadas com 5-DTAF (Mic-DTAF). Os resultados são expressos em média \pm DP.

Formulação	Concentração de F127 (mg/ml)	Diâmetro (nm)	IP	Potencial ζ (mV)
Mic-DTAF	1,0	25,1 \pm 5,5	0,76	-0,74 \pm 3,25

Estes resultados permitem concluir que a conjugação do polímero com o 5-DTAF não afetou as propriedades físico-químicas das micelas, podendo comparar os resultados obtidos da internalização celular das Mic-DTAF com as das Mic-Ptx.

3.1.2. Avaliação da citotoxicidade e determinação do IC50

Para a avaliação do possível efeito das formulações desenvolvidas, procedeu-se à incubação da linha celular modelo do adenocarcinoma colorretal, HCT-116, com as micelas contendo o Ptx encapsulado (Mic-Ptx) e com o Ptx não encapsulado (Ptx), durante 24, 48 e 72h de incubação. As diferentes formulações apresentaram resultados variáveis, tendo ocorrido uma interação significativa entre os fatores dose e tempo de exposição ao tratamento, ($p < 0,0001$), Figura 24.

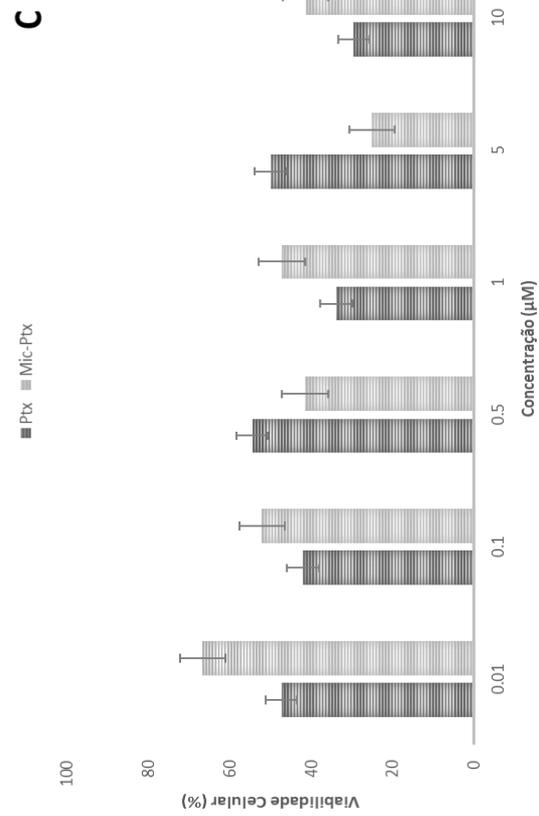
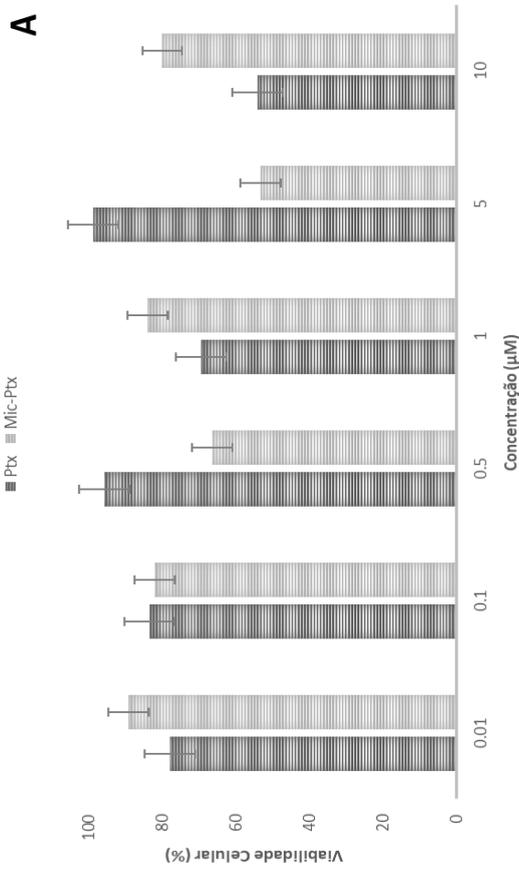
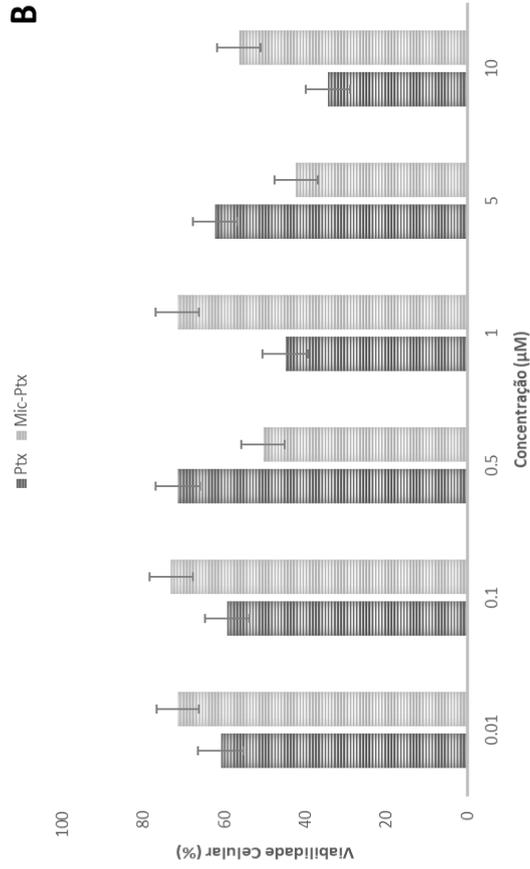


Figura 24 - Viabilidade celular da linha celular HCT-116 após o tratamento com a formulação de Ptx encapsulado (Mic-Ptx) e Ptx não encapsulado (Ptx) durante 24h (A), 48h (B) e 72h (C) de incubação, no intervalo de concentrações de 10 a 0.01 µM de Ptx. A viabilidade foi determinada pelo ensaio de MTT, usando as células não tratadas como control negativo. Os resultados foram expressos como média ± DP, para cada experiência das diferentes formulações de Mic-Ptx e de Ptx (p<0,0001).

No caso das Mic-Ptx observou-se que concentrações entre 10 e 1 μM de Ptx não afetaram de forma significativa a viabilidade celular (viabilidade > 50%) ao fim de 24h de exposição. Em contrapartida, doses intermédias 5 e 0,5 μM reduziram a viabilidade para menos de 50% após 48h de incubação e abaixo de 40% da viabilidade após 72h de incubação.

No entanto, a formulação de Ptx não encapsulado apresentou alterações na viabilidade celular em concentrações de fármaco superiores, quando comparados com a formulação de Ptx encapsulado nas micelas poliméricas. Isto é, a viabilidade foi reduzida para 50% a uma concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ às 24h de incubação e para 45 e 34% a uma concentração de 1 e 10 $\mu\text{g/ml}$ às 48h. Às 72h de incubação ambas as formulações apresentaram a viabilidade celular abaixo de 50% no intervalo de concentrações de 10 a 0,1 μM . Contudo, para que ocorra uma redução drástica da viabilidade celular, ou seja, a viabilidade celular apresentar-se abaixo dos 30%, é necessário 72h de incubação com uma concentração de 10 μM de Ptx livre e 5 μM de Ptx encapsulado.

Perante estes resultados podemos aferir que quando o Ptx se encontra encapsulado este apresenta maior eficácia a concentrações mais baixas, 5 e 0,5 μM , quando comparado com a sua administração livre.

Outro aspeto importante referir é o efeito não linear do Ptx sobre a viabilidade celular, onde em concentrações elevadas e baixas ele apresenta baixa eficácia, concluído assim, que aumentar a dose de Ptx administrado não resulta em toxicidade adicional após as 24h de incubação. Verificando-se que as células incubadas com a concentração mais elevada, 10 μM , apresentam um aumento de sobrevivência em comparação com as células tratadas com doses inferiores.

O prolongamento do tempo de exposição ao Ptx de 24h para 72h aumentou significativamente a citotoxicidade, sendo esta mais evidente na concentração de 5 μM para a Mic-Ptx e 10 μM para o Ptx livre.

Foi possível também verificar que o IC₅₀ para o Ptx é diferente para cada formulação, a formulação Mic-Ptx apresentou um IC₅₀ de 2,80 μM , enquanto o Ptx não encapsulado um IC₅₀ de 10,47 μM após 24h de incubação.

Estes resultados estão em concordância com o estudo realizado por Liebman, *et al.* (1993), que descreve este composto com um perfil de ação muito próprio, sendo o seu efeito terapêutico dependente da dose administrada, tempo de exposição e fase do ciclo celular em que se encontram as células. O estudo descreve o efeito do Ptx sobre oito linhas celulares tumorais diferentes com 24, 48 e 72h de incubação, para concentrações de Ptx entre 1 e 10.000nM. Este estudo descreve que para concentrações acima dos 10 μM ocorreu uma certa sobrevivência celular, que pode dever-se ao efeito da formulação que contém o Ptx ou à própria MDR adquirida pelas células. Concluindo, que este fármaco só tem efeito em células que se encontrem numa fase exponencial ou proliferativa, e não numa fase plateau, pois o Ptx é um fármaco antitumoral de fase celular que atua a nível mitótico (127).

Pela visualização das imagens de microscopia ótica de contraste de fase, representadas na Figura 25, é possível comprovar o efeito do Ptx e Mic-Ptx sobre as HCT-116. Após a incubação com o Ptx e as Mic-Ptx as HCT-116 adotaram uma morfologia arredondada e de reduzidas dimensões comparativamente às células não tratadas que mantiveram a sua morfologia “estrelada”. Esta alteração morfológica é indicativa de stress, ação do Ptx na polimerização dos microtúbulos pela inibição do ciclo celular e consequentemente morte.

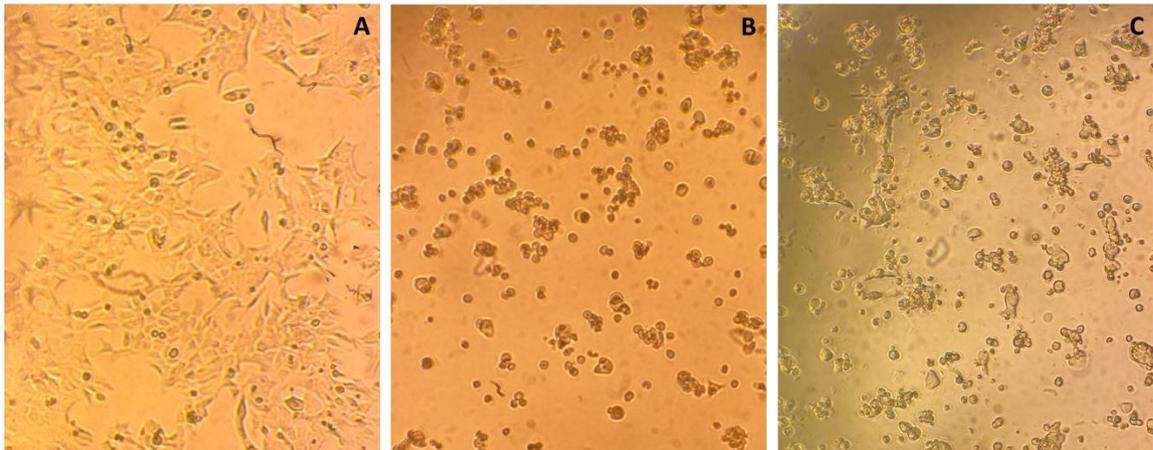


Figura 25 - Imagens da linha celular HCT-116 obtidas por microscopia ótica de contraste de fase (ampliação 10x). As células foram incubadas com a formulação de Ptx livre (B) e com a formulação de Ptx encapsulado (C) na concentração de 5 μ M. Após a incubação com as formulações ao fim de 24h observaram-se alterações na morfologia das células, comparativamente com as células não tratadas (A), controlo.

3.1.3. Determinação do tipo de morte celular

De forma a confirmar os resultados obtidos, como a nossa hipótese, de que é possível obter um melhor efeito terapêutico por parte da formulação de Ptx encapsulado, Mic-Ptx, quando comparado com o Ptx não encapsulado, determinou-se a percentagem (%) de apoptose das formulações estudadas na concentração de 1 e 10 μ M de Ptx.

A avaliação do tipo de morte celular foi obtida pela técnica de citometria de ligação à Anexina-V e exclusão do iodeto de propídeo (PI), após o tratamento com 24h de incubação.

Sendo a citometria de fluxo uma técnica quantitativa foi possível quantificar a percentagem de células viáveis (Anexina-V -/PI -), em apoptose (Anexina-V +/PI -), apoptose tardia (Anexina-V +/PI +) e necrose (Anexina-V -/PI +), após o tratamento na linha celular HCT-116.

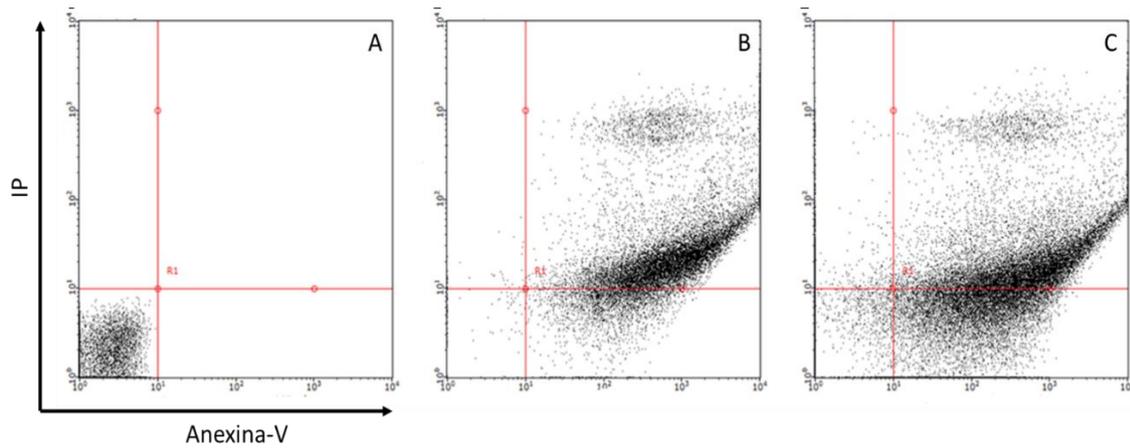


Figura 26 - Análise de apoptose celular da linha celular HCT-116 por citometria de fluxo, células controlo (A), incubadas com o PtX (B) e incubadas com as Mic-PtX (C) na concentração de 10 μ M ao fim de 24h, recorrendo à marcação com Anexina V-FITC e PI. As células que apresentaram marcação para o PI, mas não para a Anexina-V, apresentam uma morte celular por necrose (quadrante superior esquerdo); marcação positiva tanto para a Anexina-V como para o PI é apoptose tardia (quadrante superior direito); marcação positiva para Anexina-V e negativa para o PI é morte por apoptose (quadrante inferior direito); as células viáveis não apresentam qualquer marcação (quadrante inferior esquerdo).

A percentagem de apoptose precoce e tardia da linha celular HCT-116 foi de 16,4% e 82,9% para o PtX não encapsulado, e de 32,5% e 44,4% para o PtX encapsulado, Mic-PtX, na concentração de 10 μ M do fármaco. Para a concentração de 1 μ M as percentagens de apoptose são inferiores, no entanto, a formulação Mic-PtX apresenta uma maior percentagem de apoptose em estágio precoce em relação à formulação de PtX, 32,5% e 26,9%, respetivamente.

Estes resultados foram consistentes com os resultados observados no ensaio de citotoxicidade, onde o tratamento com o PtX livre induziu mais cedo a apoptose indicando que podemos estar perante uma biodistribuição intracelular de PtX superior.

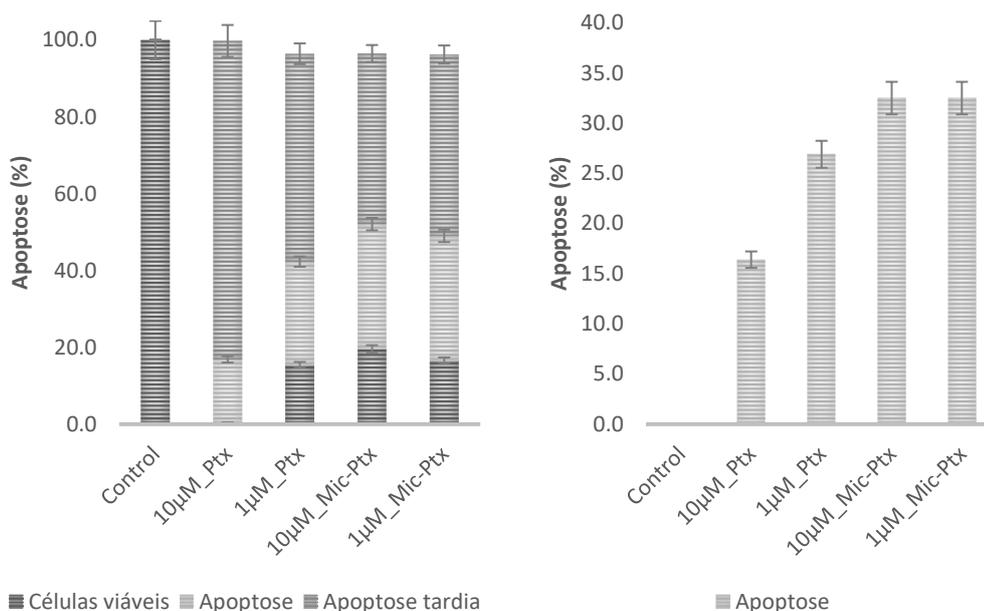


Figura 27 - Representação gráfica da percentagem de células viáveis e células com diferentes tipos de morte celular, tendo-se avaliado a percentagem de células em apoptose, induzida pelos diferentes tratamentos, Mic-Ptx e Ptx, após 24h de incubação. Os resultados foram expressos como média \pm DP.

A morte celular por necrose foi reduzida, tendo a mesma apresentado valores abaixo dos 4%, e por isso não se encontrar representada graficamente.

Para melhor interpretação dos resultados obtidos optou-se por representar em separado os dados referentes à apoptose e apoptose em estágio tardio, Figura 27, para cada um dos tratamentos.

Perante os resultados concluiu-se que a formulação de Mic-Ptx apresentou maior taxa de apoptose em relação ao Ptx livre para a apoptose de estágio precoce, sendo a percentagem de apoptose tardia superior no tratamento com o Ptx não encapsulado.

Estes resultados estão em concordância com a literatura que após a análise por anexina-V e PI as células cancerígenas tratadas com Ptx morrerem predominantemente por apoptose (128, 129). Outro estudo demonstrou que as HCT-116 tratadas com o Ptx e com o Ptx encapsulado em nanopartículas de copolímeros de PHO/PEG, evidenciaram maior morte por apoptose do que por necrose, o que confirma os resultados obtidos (130).

Como já referido, o ensaio por anexina-V é um método de avaliação da apoptose pela ligação deste marcador com a fosfatidilserina (PS). A PS é um fosfolípido que se encontra predominantemente no folheto interno de células vivas normais, sendo a sua exposição no folheto externo indicativo de morte celular e por isso ser usado como um marcador de apoptose em estudo *in vitro*. Em contraste, as células cancerígenas viáveis apresentam níveis elevados de PS na superfície externa da membrana celular (131). Segundo o exposto, permite-nos concluir que as células que apresentaram marcação para a anexina-V podem não se encontrar em apoptose, o que explicaria o facto de a viabilidade ao fim de 24h pelo ensaio de MTT

apresentar percentagens de viabilidade celular superiores a 50% e no ensaio de apoptose terem sido inferiores.

3.1.4. Internalização celular das micelas

Os estudos *in vitro* são importantes no desenvolvimento de novos nanossistemas, pois permitem prever a eficácia de internalização do sistema e conseqüentemente o seu efeito terapêutico. A internalização celular foi avaliada num intervalo de tempo de 30 min e 24h, para uma concentração de 5 μ M da formulação Mic-DTAF. Nesta fase de trabalho apenas se avaliou a internalização de Mic sem Ptx, de modo a identificar o destino intracelular das micelas sem o efeito terapêutico do Ptx. A avaliação qualitativa da internalização foi realizada por microscopia confocal.

A Figura 28 apresenta a internalização das Mic-DTAF após 30 min, 2 e 24h. Pela visualização dos resultados podemos verificar a presença de fluorescência por parte das micelas ao fim de 30 min, fluorescência que vai diminuindo com o aumento do tempo de incubação. A co-localização ao fim de 30 min de incubação é indicativo da internalização das Mic-DTAF nas células (Fig. 28 – B).

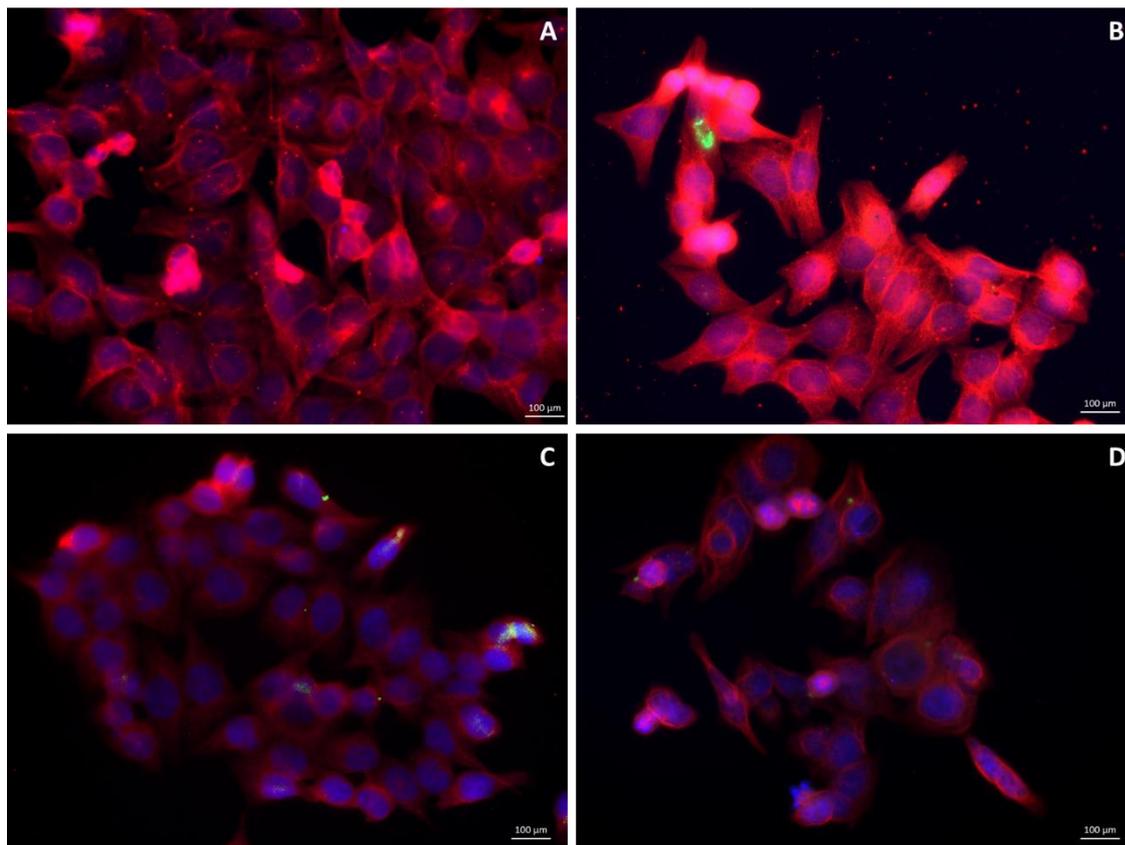


Figura 28 - Micrografias de microscopia de confocal representativas da internalização das Mic-DTAF pelas HCT-116, após 30 min (B), 2h (C) e 24h (D) de incubação, tendo (A) como controlo. As micelas foram previamente marcadas com DTAF, cor verde, e posteriormente os núcleos foram marcados com DAPI, cor azul, e a membrana com VIM, cor vermelha. As imagens foram obtidas para os diferentes tempos de incubação, tendo como controlo células não tratadas.

De modo a complementar os resultados obtidos na avaliação qualitativa das Mic-DTAF procedeu-se à quantificação da fluorescência por espectroscopia UV/Vis, em oito tempos diferentes num intervalo de 24h, para perceber o efeito das Mic-Ptx na eficiência de internalização.

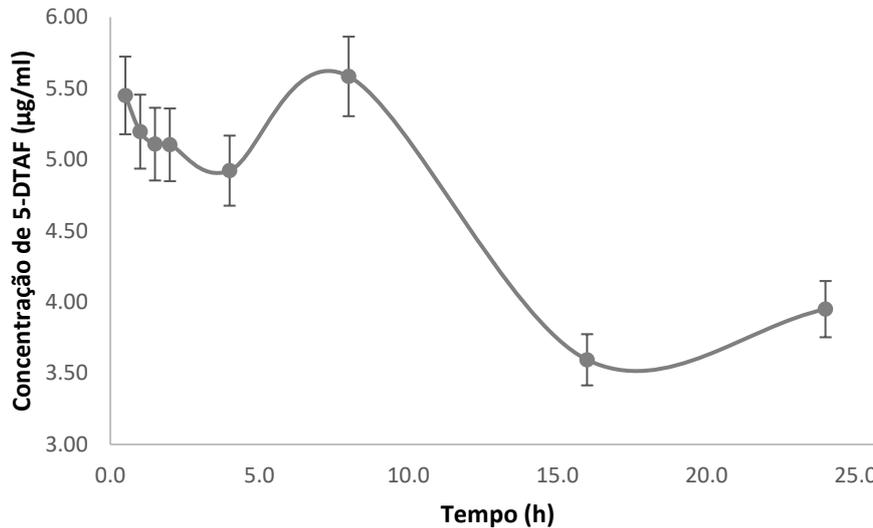


Figura 29 - Quantificação da internalização das Mic-DTAF após incubação com as HCT-116 em diferentes tempos de incubação. Os resultados foram expressos em termos de média \pm desvio padrão.

Pela observação da Figura 29, podemos verificar que ao fim de 30 min temos quase metade da concentração das Mic-DTAF no interior das células, concentração que vai diminuído até às 8h, aqui verifica-se novamente um aumento de fluorescência decaindo esta até as 24h. Os resultados estão em concordância com as imagens obtidas por microscopia confocal, onde a internalização é maior ao fim de 30 min em comparação com as 2 e 24h de incubação.

Perante estes resultados levantamos a hipótese de a internalização ser um processo dinâmico onde as micelas são internalizadas e posteriormente externalizadas. Estes resultados serão uma possível explicação para o fato de as micelas provocarem níveis de morte celular inferiores quando comparados com o Ptx na sua administração livre.

4. Conclusões

A conjugação do Pluronic® F127 com o 5-DTAF não alterou as propriedades físico-químicas das micelas, o que nos permitiu fazer uma extrapolação dos resultados obtidos com as Mic-DTAF e as Mic-Ptx no que se refere à internalização celular.

O efeito terapêutico das Mic-Ptx foi superior ao do Ptx administrado livremente em concentrações intermédias ao fim de 24h de incubação. O IC 50 foi menor para as Mic-Ptx em comparação com o Ptx livre, evidenciando um aumento do efeito terapêutico pela incorporação do Ptx nas micelas.

Tanto as Mic-Ptx como o Ptx provocaram uma morte celular por apoptose, tendo sido quase inexistente a presença de morte por necrose.

Na avaliação qualitativa da internalização as microfotografias demonstraram que ao fim de 30 min de incubação a fluorescência emitida pelas Mic-DTAF era maior em comparação com as 24h de incubação, provando que ao fim de 30 min já existe internalização das micelas. Estes resultados foram confirmados pela avaliação quantitativa, onde após 30 min de incubação a intensidade de fluorescência vai diminuído até às 24h.

Capítulo 5

Administração por Via Retal

Administração por Via Retal

Como referido anteriormente, esta secção tem como finalidade descrever a via de administração retal e tipos de veículos disponíveis, bem como exemplos descritos na literatura com nanossistemas para administração via retal, para que estudos na progressão deste trabalho sejam possíveis.

A administração por via oral é na prática a via mais usada na farmacoterapia, sendo a por via retal pouco frequente. Esta é normalmente utilizada como via alternativa à via oral para pacientes com dificuldades em deglutir (132, 133). Historicamente a via retal encontra-se descrita como via de tratamentos locais, de hemorroidas e para a administração de anti-piréticos. No entanto, o interesse nesta via tem vindo a aumentar para a administração de substâncias diretamente na circulação sistémica, aproveitando o desvio porto-sistémico (100).

Segundo a Farmacopeia Portuguesa as preparações para administração retal exercem uma ação local ou sistémica, ou são aplicadas para efeitos de diagnóstico (24).

O nosso interesse nesta via de administração deve-se em parte à localização da patologia em estudo. Tendo sido o nosso objetivo atingir as células neoplásicas presentes na zona reto-anal e colon, esta apresenta-se como uma mais valia na quimioterapia, pois além de ser uma terapêutica localizada, leva também à diminuição dos efeitos adversos, comumente associados à quimioterapia administrada por via intravenosa e oral.

Esta via apresenta algumas vantagens sobre a via oral, como (59, 100, 132, 133):

- ✓ proteção enzimática do fármaco, devido à ausência de enzimas no reto;
- ✓ prevenção da mucosa gástrica a medicamentos irritantes como os anti-inflamatórios não esteroides;
- ✓ metabolização de primeira passagem reduzido, dependendo do local de administração do medicamento no reto;
- ✓ terapêuticas mais eficazes quando localizados nessa região.

A absorção retal não é inferior à da mucosa gastrointestinal, apesar de diferirem em termos fisiológicos (ex: pH e conteúdo de fluído), tem a vantagem de ser mais rápida, podendo substituí-la em doses iguais de fármaco. No entanto, por motivos de ação irritativa a quantidade de fármaco não deve ultrapassar os 400-500 mg/toma (59, 100).

Outros fatores que influenciam a taxa e extensão de absorção dos fármacos administrados por esta via, e que se devem ter em consideração no desenvolvimento de uma formulação farmacêutica retal são (59, 61, 100, 133):

- ✓ o pH retal, que se encontra entre os 6,8-7,2;
- ✓ a taxa de libertação da substância e tempo de permanência, pois a absorção retal é normalmente por transporte passivo, logo dependente da difusão e lipossolubilidade do fármaco;
- ✓ quantidade de líquido retal, que varia entre 1 e 3 ml;
- ✓ características do fármaco, como a solubilidade em água e lípidos, fármacos lipossolúveis são preferíveis;
- ✓ veículo ou base utilizado, como o seu estado físico (veículo sólido, líquido ou semissólido), sendo as soluções e suspensões veículos favoráveis a absorção;
- ✓ sistema fármaco-excipiente, onde a substância terapêutica pode estar dissolvida, emulsionada ou suspensa, e a sua libertação não se processa de modo idêntico.

No desenvolvimento de um sistema farmacêutico deve-se garantir que o fármaco apresente maior afinidade para a mucosa retal do que para o excipiente, como considerar-se a presença de tensoativos, pois os mesmos facilitam o contacto entre o fármaco e a mucosa, incentivando a absorção. A coadministração destes agentes promotores de absorção representam uma abordagem na manipulação desta na administração retal (61, 132, 133).

Perante o exposto o uso de nanossistemas nesta via, torna-se uma mais valia, pois além de permitir aumentar a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis, permite obter uma libertação imediata ou prolongada, com ação local ou sistêmica, recorrendo a polímeros com propriedades muco-adesivas e/ou gelificantes (100).

Dentro das formas farmacêuticas destinadas à administração retal temos os supositórios; os reto-tampões, obtidos a partir de excipientes sólidos; os enemas e os micro-enemas, veículos líquidos; cápsulas retais; soluções, emulsões e suspensões retais; pós e comprimidos para soluções retais; preparações retais semissólidas; espumas e tampões retais. Estas preparações são de dose unitária com um ou vários fármacos, destinados a uma ação local ou à absorção para a corrente sanguínea, sendo a sua forma, volume e consistência adaptados ao tipo de administração que se pretende (24, 61).

No desenvolvimento de uma fórmula farmacêutica retal deve-se ter em atenção ao tipo de excipientes utilizados, pois os mesmos devem apresentar qualidades como (61, 132):

- ✓ ausência de efeitos terapêuticos e toxicidade;
- ✓ sem ação irritante, a irritação local é uma possível complicação na terapêutica retal;

- ✓ consistência apropriada, para uma fácil aplicação;
- ✓ viscosidade adequada ao tipo de ação desejada para o medicamento administrado;
- ✓ compatibilidade com o agente terapêutico;
- ✓ incolores e estáveis frente a variações ambientais e a microrganismos;
- ✓ liberação do fármaco de forma compatível com o tratamento.

Estes podem ser classificados em dois grupos, lipossolúveis e hidrodispersíveis. Os hidrodispersíveis dividem-se em compostos de baixo peso molecular, permitem obter soluções verdadeiras na presença de água, e os de elevado peso molecular, originam géis mais ou menos mucilaginosos, em contacto com a água. Exemplo de excipientes hidrodispersíveis são os polioxietilenoglicóis, sendo tanto melhor tolerados quanto mais elevado o seu peso molecular. Outro exemplo são os copolímeros de PEO-PPO, os Pluronic[®], que são excipientes aceites localmente, não apresentam toxicidade e apresentam um pH próximo de 7, pH compatível com o do colon-retto, quando em solução aquosa a 2,5% (p/v) (61).

Atualmente, e apesar da falta de aceitação e preferência do paciente por outras vias, vários estudos têm sido realizados com micro e nanossistemas para a entrega de fármacos por via retal, de modo a atingir locais específicos e controlados na zona colorretal.

Esta é uma abordagem inovadora, que tem como objetivo integrar a nanotecnologia a supositórios e enemas, adotado para a liberação direcionada de medicamentos antitumorais, como alternativa à terapêutica atualmente usada na quimioterapia.

Exemplos desta abordagem são os estudos realizados por Seo *et al.* 2013 e Neves *et al.* 2019. Seo *et al.* 2013, descreve um sistema de micelas termossensíveis e bioadesivas para melhorar a biodisponibilidade e efeito quimioterapêutico do docetaxel (agente antineoplásico anti-mitótico de taxano), utilizando o agente tensioativo Tween-80 como fase surfactante e a combinação dos copolímeros P188 e F407, como fase aquosa (134). Enquanto Neves *et al.* 2019, incorporou nanopartículas de PLGA num enema termossensível à base de poloxâmero P407 (135). Outros estudos encontram-se descritos, todos eles tendo como excipientes polímeros e copolímeros com propriedades anfífilas.

Capítulo 6

Conclusões Finais e Perspetivas Futuras

Conclusões Finais e Perspetivas Futuras

A eficácia de um fármaco antitumoral está diretamente relacionado com a sua capacidade em alcançar e permeabilizar o tecido tumoral, permitindo a interação fármaco-célula.

Devido às limitações que algumas terapêuticas têm apresentado no tratamento de neoplasias ao longo dos últimos anos, levou à realização de estudos no desenvolvimento de nanossistemas para o encapsulamento de fármacos devido à falta de seletividade destes entre o tecido normal e tumoral. O potencial desta estratégia é:

- ✓ aumentar a eficácia e direcionamento dos fármacos;
- ✓ diminuir a citotoxicidade e efeitos adversos associados ao fármaco livre.

Com este trabalho concluiu-se que a caracterização físico-química das micelas como transportadores de fármacos é o passo primordial para antever o seu sucesso terapêutico. O desenvolvimento de nanossistemas deve permitir obter micelas de diâmetro médio e carga de superfície favoráveis não só ao encapsulamento do fármaco, como ter a capacidade de mantê-lo em circulação até ao local-alvo.

As micelas preparadas neste trabalho apresentaram características físico-químicas favoráveis à internalização celular. Após a obtenção e caracterização das micelas a avaliação biológica das formulações foi determinada pela interação com a linha tumoral do adenocarcinoma colorretal, HCT-116.

Nos estudos *in vitro* as Mic-Ptx apresentaram maior eficácia terapêutica em doses intermédias (5 e 0,5 μM) quando comparadas com a administração do Ptx livre ao fim de 24h de incubação. A encapsulação do Ptx nas micelas não alterou o tipo de morte celular que foi maioritariamente por apoptose. Relativamente à internalização foi possível verificar que a mesma ocorre ao fim de 30 min, apresentando-se como um processo dinâmico de internalização e externalização das micelas ao longo de 24h de incubação.

Em conclusão, foram obtidas micelas com características apropriadas à veiculação e internalização do Ptx, como estáveis físico-quimicamente quando mantidas as condições de micelização.

Futuramente, pretende-se superar as limitações encontradas na preparação das micelas e posteriormente no enema, no conhecimento e caracterização físico-química do nanossistema e formulação farmacêutica final. Complementar os estudos de toxicidade com estudos de biodistribuição, de modo a antever a co-localização das micelas quando internalizadas no ambiente biológico e avaliar os efeitos terapêuticos em diferentes condições celulares e fisiológicas. Como a limitação associada ao efluxo do Ptx por parte da glicoproteína-P (P-gp).

De modo resumido, pretendem-se determinar a cinética de efluxo do Ptx livre e encapsulado nas micelas. Pois o Ptx é um substrato da P-gp e esta é uma proteína classificada como bomba

de efluxo, que transporta o fármaco para fora da célula após a sua internalização. Esta proteína encontra-se descrita na literatura como responsável pela resistência a múltiplos fármacos antitumorais pelas células cancerígenas.

Conseguindo ultrapassar estas limitações, será possível obter uma formulação seletiva, direcionada, eficaz e segura para o tratamento do CRC, com a redução dos efeitos adversos, progressão do tumor e conseqüentemente maior qualidade e tempo de vida para o doente.

Referências

1. Cancer World Health Organization 2019 [Available from: <https://www.who.int/topics/cancer/en/>].
2. Keith Roberts BA, David Morgan, Martin Raff, Julian Lewis, Peter Walter and Alexander Johnson Molecular Biology Of The Cell. Sixth edition ed.
3. Institute NC. What Is Cancer? [Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>].
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
5. Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2008;134(5):1296-310.
6. Cappell MS. The pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis of colon cancer and adenomatous polyps. *The Medical clinics of North America*. 2005;89(1):1-42, vii.
7. Medicine USNLo. Large intestine (colon): MedlinePlus; 2019 [Available from: <https://medlineplus.gov/ency/imagepages/19220.htm>].
8. VanPutte C RJ, Russo A, Seeley R, Stephens T, Tate P. Seeley's Anatomy & physiology. Seeley's Anatomy & physiology. 10a ed ed: New York; McGraw-Hill; 2014.
9. Summaries PCI. Colon Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version. PDQ Adult Treatment Editorial Board: Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2019 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65880/>].
10. De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P, et al. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep*. 2015;34(3):1087-96.
11. Peifer M. Developmental biology: colon construction. *Nature*. 2002;420(6913):274-5, 7.
12. Pereira I, Sousa F, Kennedy P, Sarmiento B. Carcinoembryonic antigen-targeted nanoparticles potentiate the delivery of anticancer drugs to colorectal cancer cells. *International journal of pharmaceutics*. 2018;549(1):397-403.
13. Feng S-S, Chien S. Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering Science*. 2003;58(18):4087-114.
14. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*. 2014;6(3):1769-92.
15. Leary M, Heerboth S, Lapinska K, Sarkar S. Sensitization of Drug Resistant Cancer Cells: A Matter of Combination Therapy. *Cancers (Basel)*. 2018;10(12):483.
16. Yasuhiro M. DDS in Cancer Chemotherapy. In: Chiellini E, Sunamoto J, Migliaresi C, Ottenbrite RM, Cohn D, editors. *Biomedical Polymers and Polymer Therapeutics*. Boston, MA: Springer US; 2002. p. 37-52.

17. Zahr AS, Pishko MV. Nanotechnology for Cancer Chemotherapy. In: de Villiers MM, Aramwit P, Kwon GS, editors. *Nanotechnology in Drug Delivery*. New York, NY: Springer New York; 2009. p. 491-518.
18. Serafim Guimarães DMePSdS. *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas*. 6 ed: Porto Editora; 2014.
19. Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2001;37(13):1590-8.
20. Tedjarati S, Baker CH, Apte S, Huang S, Wolf JK, Killion JJ, et al. Synergistic therapy of human ovarian carcinoma implanted orthotopically in nude mice by optimal biological dose of pegylated interferon alpha combined with paclitaxel. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002;8(7):2413-22.
21. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-57.
22. Sousa C, Gouveia LF, Kreutzer B, Silva-Lima B, Maphasa RE, Dube A, et al. Polymeric Micellar Formulation Enhances Antimicrobial and Anticancer Properties of Salinomycin. *Pharmaceutical research*. 2019;36(6):83.
23. Du X, Khan AR, Fu M, Ji J, Yu A, Zhai G. Current development in the formulations of non-injection administration of paclitaxel. *International journal of pharmaceutics*. 2018;542(1-2):242-52.
24. Medicamento IINdFed. *Farmacopeia portuguesa 9: edição oficial*. Lisboa: Infarmed.
25. Bannan CC, Calabró G, Kyu DY, Mobley DL. Calculating Partition Coefficients of Small Molecules in Octanol/Water and Cyclohexane/Water. *J Chem Theory Comput*. 2016;12(8):4015-24.
26. Singla AK, Garg A, Aggarwal D. Paclitaxel and its formulations. *International journal of pharmaceutics*. 2002;235(1-2):179-92.
27. Charalabidis A, Sfouni M, Bergstrom C, Macheras P. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Beyond guidelines. *International journal of pharmaceutics*. 2019;566:264-81.
28. Panchagnula R. Pharmaceutical aspects of paclitaxel. *International journal of pharmaceutics*. 1998;172(1):1-15.
29. Jang SH, Wientjes MG, Au JL. Determinants of paclitaxel uptake, accumulation and retention in solid tumors. *Investigational new drugs*. 2001;19(2):113-23.
30. Kumar GN, Walle UK, Bhalla KN, Walle T. Binding of taxol to human plasma, albumin and alpha 1-acid glycoprotein. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*. 1993;80(3):337-44.
31. Spencer CM, Faulds D. Paclitaxel. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. *Drugs*. 1994;48(5):794-847.
32. Schiller JH, Storer B, Tutsch K, Arzooonian R, Alberti D, Feierabend C, et al. Phase I trial of 3-hour infusion of paclitaxel with or without granulocyte colony-stimulating factor in patients with advanced cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1994;12(2):241-8.
33. Rizzo J, Riley C, von Hoff D, Kuhn J, Phillips J, Brown T. Analysis of anticancer drugs in biological fluids: determination of taxol with application to clinical pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1990;8(2):159-64.
34. Kampan NC, Madondo MT, McNally OM, Quinn M, Plebanski M. Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *BioMed research international*. 2015;2015:413076.
35. Arranja A, Gouveia LF, Gener P, Rafael DF, Pereira C, Schwartz S, Jr., et al. Self-assembly PEGylation assists SLN-paclitaxel delivery inducing cancer cell apoptosis upon internalization. *International journal of pharmaceutics*. 2016;501(1-2):180-9.
36. Gornstein E, Schwarz TL. The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions. *Neuropharmacology*. 2014;76:175-83.
37. Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene*. 2003;22(47):7280-95.
38. Corrias F, Lai F. New methods for lipid nanoparticles preparation. *Recent patents on drug delivery & formulation*. 2011;5(3):201-13.

39. Bilati U, Allemann E, Doelker E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2005;24(1):67-75.
40. Ulrich AS. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience reports*. 2002;22(2):129-50.
41. Das S, Ng WK, Tan RB. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2012;47(1):139-51.
42. Videira M, Almeida AJ, Fabra A. Preclinical evaluation of a pulmonary delivered paclitaxel-loaded lipid nanocarrier antitumor effect. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2012;8(7):1208-15.
43. Videira M, inventor Nanopartículas Semi-sólidas Contendo um Agente Antineoplásico e seu Processo de Preparação. Portugal 2009 January 27, 2019.
44. Peniche H, Peniche C. Chitosan nanoparticles: a contribution to nanomedicine. *2011;60(6):883-9*.
45. Jain V, Jain S, Mahajan SC. Nanomedicines based drug delivery systems for anti-cancer targeting and treatment. *Curr Drug Deliv*. 2015;12(2):177-91.
46. Borm PJ, Kreyling W. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles--potential implications for drug delivery. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2004;4(5):521-31.
47. Zhang J-X, Wang K, Mao Z-F, Fan X, Jiang D-L, Chen M, et al. Application of liposomes in drug development--focus on gastroenterological targets. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:1325-34.
48. Noble GT, Stefanick JF, Ashley JD, Kiziltepe T, Bilgicer B. Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations. *Trends in Biotechnology*. 2014;32(1):32-45.
49. Gao Y, Gu S, Zhang Y, Xie X, Yu T, Lu Y, et al. The Architecture and Function of Monoclonal Antibody-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles Loaded with Mifepristone: Repurposing Abortifacient for Cancer Metastatic Chemoprevention. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. 2016;12.
50. Cavaco MC, Pereira C, Kreutzer B, Gouveia LF, Silva-Lima B, Brito AM, et al. Evading P-glycoprotein mediated-efflux chemoresistance using Solid Lipid Nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;110:76-84.
51. Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Advances in Enzyme Regulation*. 2001;41(1):189-207.
52. Fang J, Sawa T, Maeda H. Factors and mechanism of "EPR" effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including SMANCS. *Advances in experimental medicine and biology*. 2003;519:29-49.
53. Prabu P, Chaudhari AA, Ko JA, Dharmaraj N, Park SY, Kim HY, et al. Cellular Uptake and In Vitro Drug Release Studies on Paclitaxel-Loaded Poly(caprolactone)-Grafted Dextran Copolymeric Nanoparticles. 2009;5(1):42-9.
54. Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, Hamaly MA, Alkawareek MY, Dreaden EC, et al. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem Soc Rev*. 2017;46(14):4218-44.
55. Saadat M, Zahednezhad F, Zakeri P, Heidari HR, Shahbazi-Mojarrad J, Valizadeh H. Drug Targeting Strategies Based on Charge Dependent Uptake of Nanoparticles into Cancer Cells. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2019;22:191-220.
56. Torchilin VP. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2001;73(2):137-72.
57. Bodratti AM, Alexandridis P. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. *Journal of functional biomaterials*. 2018;9(1).
58. Pitto-Barry A, Barry NPE. Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. *Polymer Chemistry*. 2014;5(10):3291-7.
59. Nogueira Prista L, Correia Alves, A., Morgado, R., Sousa Lobo, J. *Tecnologia Farmacêutica*. 8ª ed: Fundação Calouste Gulbenkian; 2011.

60. Güngör S, Kahraman E, Ozsoy Y. Polymeric Micelles for Cutaneous Drug Delivery. 2015. p. 369-87.
61. Nogueira Prista L, Correia Alves, A., Morgado, R., Sousa Lobo, J. Tecnologia Farmacêutica 8ª ed: Fundação Calouste Gulbenkian; 2011.
62. Jung YW, Lee H, Kim JY, Koo EJ, Oh KS, Yuk SH. Pluronic-based core/shell nanoparticles for drug delivery and diagnosis. *Current medicinal chemistry*. 2013;20(28):3488-99.
63. Batrakova EV, Kabanov AV. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2008;130(2):98-106.
64. Almeida M, Magalhães M, Veiga F, Figueiras AJJoPR. Poloxamers, poloxamines and polymeric micelles: Definition, structure and therapeutic applications in cancer. 2017;25(1):31.
65. Lucia A, Toloza AC, Guzman E, Ortega F, Rubio RG. Novel polymeric micelles for insect pest control: encapsulation of essential oil monoterpenes inside a triblock copolymer shell for head lice control. *PeerJ*. 2017;5:e3171.
66. Gaucher G, Dufresne M-H, Sant VP, Kang N, Maysinger D, Leroux J-C. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2005;109(1):169-88.
67. Anand Babu D, Ramesh P. Preparation and Characterization of Water-Soluble Prodrug, Liposomes and Micelles of Paclitaxel. *Current Drug Delivery*. 2005;2(1):75-91.
68. Valle JW, Armstrong A, Newman C, Alakhov V, Pietrzynski G, Brewer J, et al. A phase 2 study of SP1049C, doxorubicin in P-glycoprotein-targeting pluronics, in patients with advanced adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Investigational new drugs*. 2011;29(5):1029-37.
69. Xu W, Fan X, Zhao Y, Li L. Cysteine modified and bile salt based micelles: preparation and application as an oral delivery system for paclitaxel. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2015;128:165-71.
70. Acharya SR, Reddy PRV. Brain targeted delivery of paclitaxel using endogenous ligand. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;11(3):427-38.
71. Pepe D, Carvalho VF, McCall M, de Lemos DP, Lopes LB. Transportan in nanocarriers improves skin localization and antitumor activity of paclitaxel. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:2009-19.
72. Ranganath SH, Fu Y, Arifin DY, Kee I, Zheng L, Lee HS, et al. The use of submicron/nanoscale PLGA implants to deliver paclitaxel with enhanced pharmacokinetics and therapeutic efficacy in intracranial glioblastoma in mice. *Biomaterials*. 2010;31(19):5199-207.
73. Yang M, Yu T, Wang YY, Lai SK, Zeng Q, Miao B, et al. Vaginal delivery of paclitaxel via nanoparticles with non-mucoadhesive surfaces suppresses cervical tumor growth. *Advanced healthcare materials*. 2014;3(7):1044-52.
74. Lytton-Jean AK, Kauffman KJ, Kaczmarek JC, Langer R. Cancer nanotherapeutics in clinical trials. *Cancer treatment and research*. 2015;166:293-322.
75. Barenholz Y. Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;160(2):117-34.
76. Farrell D, Ptak K, Panaro NJ, Grodzinski PJPR. Nanotechnology-Based Cancer Therapeutics—Promise and Challenge—Lessons Learned Through the NCI Alliance for Nanotechnology in Cancer. 2011;28(2):273-8.
77. Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2008;26(1):57-64.
78. Hu CM, Zhang L. Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. *Biochemical pharmacology*. 2012;83(8):1104-11.
79. Kayser O, Lemke A, Hernandez-Trejo N. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2005;6(1):3-5.
80. Rawat M, Singh D, Saraf S, Saraf S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2006;29(9):1790-8.
81. Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, Langer R. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Lett*. 2010;10(9):3223-30.
82. Sahoo SK, Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug discovery today*. 2003;8(24):1112-20.

83. Surendiran A, Sandhiya S, Pradhan SC, Adithan C. Novel applications of nanotechnology in medicine. *The Indian journal of medical research*. 2009;130(6):689-701.
84. Adams ML, Lavasanifar A, Kwon GS. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2003;92(7):1343-55.
85. Kedar U, Phutane P, Shidhaye S, Kadam V. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2010;6(6):714-29.
86. Andrade F, Fonte P, Oliva M, Videira M, Ferreira D, Sarmento B. Solid state formulations composed by amphiphilic polymers for delivery of proteins: characterization and stability. *International journal of pharmaceutics*. 2015;486(1):195-206.
87. Rafael D, Gener P, Andrade F, Seras-Franzoso J, Montero S, Fernandez Y, et al. AKT2 siRNA delivery with amphiphilic-based polymeric micelles show efficacy against cancer stem cells. *Drug delivery*. 2018;25(1):961-72.
88. Zhang W, Gilstrap K, Wu L, K CR, Moss MA, Wang Q, et al. Synthesis and characterization of thermally responsive Pluronic F127-chitosan nanocapsules for controlled release and intracellular delivery of small molecules. *ACS nano*. 2010;4(11):6747-59.
89. Swami A, Shi J, Gadde S, Votruba AR, Kolishetti N, Farokhzad OC. Nanoparticles for Targeted and Temporally Controlled Drug Delivery. In: Svenson S, Prud'homme RK, editors. *Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery Applications: Imaging, Targeting, and Delivery*. Boston, MA: Springer US; 2012. p. 9-29.
90. Kaszuba M, Corbett J, Watson F, Jones A. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philosophical transactions Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*. 2010;368:4439-51.
91. Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(6):428-37.
92. Gustafson HH, Holt-Casper D, Grainger DW, Ghandehari H. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano Today*. 2015;10(4):487-510.
93. Coglitore D, Edwardson SP, Macko P, Patterson EA, Whelan M. Transition from fractional to classical Stokes-Einstein behaviour in simple fluids. *R Soc Open Sci*. 2017;4(12):170507-.
94. ICH. Harmonised Tripartite Guideline, Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2) 2003 [4:[Available from: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf].
95. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), Current Step 4 version (2005).
96. Olea A, Carrasco H, Espinoza L, Acevedo B. Solubilization of p-alkylphenols in Pluronic F-68 and F-127 micelles: Partition coefficients and effect of solute on the aggregate structure. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2014;29:2451-4.
97. Sotoudegan F, Amini M, Faizi M, Aboofazeli R. Nimodipine-Loaded Pluronic(®) Block Copolymer Micelles: Preparation, Characterization, In-vitro and In-vivo Studies. *Iran J Pharm Res*. 2016;15(4):641-61.
98. Shaikh S, Ray D, Aswal V, Sharma R. Incorporation of Lamotrigine Drug in the PEO-PPO-PEO Triblock Copolymer (Pluronic F127) Micelles: Effect of Hydrophilic Polymers. *Journal of Surfactants and Detergents*. 2017;20.
99. Davis ME, Chen Z, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008;7(9):771-82.
100. Purohit TJ, Hanning SM, Wu Z. Advances in rectal drug delivery systems. *Pharmaceutical development and technology*. 2018;23(10):942-52.
101. Gumustas M, Sengel-Turk CT, Gumustas A, Ozkan SA, Uslu B. Chapter 5 - Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems. In: Grumezescu AM, editor. *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*: Elsevier; 2017. p. 67-108.
102. Ermer J, Ploss HJ. Validation in pharmaceutical analysis. Part II: Central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. *J Pharm Biomed Anal*. 2005;37(5):859-70.

103. Harris DC. Quantitative chemical analysis. 8th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2010.
104. Bird IM. High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *BMJ*. 1989;299(6702):783-7.
105. Bélanger JMR, Jocelyn Paré JR, Sigouin M. Chapter 2 High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. In: Paré JRJ, Bélanger JMR, editors. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. 18: Elsevier; 1997. p. 37-59.
106. Xia XJ, Peng J, Zhang PX, Jin DJ, Liu YL. Validated HPLC Method for the Determination of Paclitaxel-related Substances in an Intravenous Emulsion Loaded with a Paclitaxel-Cholesterol Complex. *Indian J Pharm Sci*. 2013;75(6):672-9.
107. Jain A, Gulbake A, Jain A, Shilpi S, Hurkat P, Kashaw S, et al. Development and Validation of the HPLC Method for Simultaneous Estimation of Paclitaxel and Topotecan. *Journal of Chromatographic Science*. 2013;52(7):697-703.
108. Badea I, Ciutaru D, Lazar L, Nicolescu D, Tudose A. Rapid HPLC method for the determination of paclitaxel in pharmaceutical forms without separation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004;34(3):501-7.
109. Xavier Junior FH, Gueutin C, do Vale Morais AR, do Nascimento Alencar E, do Egito EST, Vauthier CJC. HPLC Method for the Dosage of Paclitaxel in Copaiba Oil: Development, Validation, Application to the Determination of the Solubility and Partition Coefficients. 2016;79(7):405-12.
110. Videira M. Nanopartículas Lipídicas como sistemas transportadores de fármacos para administração pulmonar: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa 2008.
111. Videira MA, Arranja AG, Gouveia LF. Experimental design towards an optimal lipid nanosystem: A new opportunity for paclitaxel-based therapeutics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;49(2):302-10.
112. Green JM. Peer Reviewed: A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry*. 1996;68(9):305A-9A.
113. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*. 2003;987(1):57-66.
114. Xu S, Olenyuk BZ, Okamoto CT, Hamm-Alvarez SF. Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: rationale and advances. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(1):121-38.
115. Jones CF, Grainger DW. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(6):438-56.
116. Sahu SC, Hayes AW. Toxicity of nanomaterials found in human environment:A literature review. 2017;1:2397847317726352.
117. Kumar V, Sharma N, Maitra SSJINL. In vitro and in vivo toxicity assessment of nanoparticles. 2017;7(4):243-56.
118. Ajdary M, Moosavi MA, Rahmati M, Falahati M, Mahboubi M, Mandegary A, et al. Health Concerns of Various Nanoparticles: A Review of Their in Vitro and in Vivo Toxicity. 2018;8(9):634.
119. Sukhanova A, Bozrova S, Sokolov P, Berestovoy M, Karaulov A, Nabiev I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Res Lett*. 2018;13(1):44-.
120. Crowley-Weber CL, Payne CM, Gleason-Guzman M, Watts GS, Futscher B, Waltmire CN, et al. Development and molecular characterization of HCT-116 cell lines resistant to the tumor promoter and multiple stress-inducer, deoxycholate. *Carcinogenesis*. 2002;23(12):2063-80.
121. Rajput A, Dominguez San Martin I, Rose R, Beko A, Levea C, Sharratt E, et al. Characterization of HCT116 human colon cancer cells in an orthotopic model. *The Journal of surgical research*. 2008;147(2):276-81.
122. [Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D16?SID=srch-srp-D16>.
123. Ahmed F, Alexandridis P, Neelamegham S. Synthesis and Application of Fluorescein-Labeled Pluronic Block Copolymers to the Study of Polymer-Surface Interactions. *Langmuir*. 2001;17(2):537-46.

124. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
125. van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. 1998;31(1):1-9.
126. 2019 [Available from: <https://www.sinobiological.com/flow-cytometry-fcm-facs-application-apoptosis.html>].
127. Liebmann JE, Cook JA, Lipschultz C, Teague D, Fisher J, Mitchell JB. Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines. *Br J Cancer*. 1993;68(6):1104-9.
128. Liao PC, Lieu CH. Cell cycle specific induction of apoptosis and necrosis by paclitaxel in the leukemic U937 cells. *Life sciences*. 2005;76(14):1623-39.
129. Wang T-H, Wang H-S, Soong Y-K. Paclitaxel-induced cell death. 2000;88(11):2619-28.
130. Kim HY, Ryu JH, Chu CW, Son GM, Jeong Y-IL, Kwak T-W, et al. Paclitaxel-incorporated nanoparticles using block copolymers composed of poly(ethylene glycol)/poly(3-hydroxyoctanoate). *Nanoscale Res Lett*. 2014;9(1):525.
131. Davis HW, Vallabhapurapu SD, Chu Z, Vallabhapurapu SL, Franco RS, Mierzwa M, et al. Enhanced phosphatidylserine-selective cancer therapy with irradiation and SapC-DOPS nanovesicles. 2019;10(8).
132. van Hoogdalem E, de Boer AG, Breimer DD. Pharmacokinetics of rectal drug administration, Part I. General considerations and clinical applications of centrally acting drugs. *Clinical pharmacokinetics*. 1991;21(1):11-26.
133. de Boer AG, Moolenaar F, de Leede LG, Breimer DD. Rectal drug administration: clinical pharmacokinetic considerations. *Clinical pharmacokinetics*. 1982;7(4):285-311.
134. Seo YG, Kim DW, Yeo WH, Ramasamy T, Oh YK, Park YJ, et al. Docetaxel-loaded thermosensitive and bioadhesive nanomicelles as a rectal drug delivery system for enhanced chemotherapeutic effect. *Pharmaceutical research*. 2013;30(7):1860-70.
135. Melo M, Nunes R, Sarmiento B, das Neves J. Colorectal distribution and retention of polymeric nanoparticles following incorporation into a thermosensitive enema. *Biomaterials science*. 2019;7(9):3801-11.